

20000784

平成12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一生薬、漢方製剤一  
の安全性に関する研究

平成12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—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

小柴胡湯による間質性肺炎発症のメカニズムを明らかにする目的で、ICRマウスを用いた実験の肺について、マクロファージの表面マーカーであるMac-3とケモカインの一種であるmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)の免疫組織学的検索を行うとともに、小柴胡湯の各種サイトカイン発現への影響をみるために、肺組織でのTh1/Th2細胞サイトカイン、TNFシグナリング、炎症性サイトカイン及びMCP-1のmRNAシグナルのRT-PCR法による検索を行った。また、小柴胡湯をはじめとする「柴胡剤」の肝疾患に対する広範な作用を考慮して、薬物代謝酵素の代表的酵素である、cytochrome P450に及ぼす柴胡剤の影響を、長期間投与も考慮に入れて検討した。さらに、漢方薬の副作用が報告されている背景として、急速に普及した漢方エキス製剤に対し、漢方の十分な使い方の知識が普及していないことが指摘されている。そこで、漢方独特の「証」という診断法にそった治療を行っている北里研究所東洋医学総合研究所での副作用の頻度がどの程度あるかを検討した。

間質性腎炎の原因物質とされるアリストロキア酸については、生薬、生薬・漢方製剤の品質を確立するために、アリストロキア酸の定量法を公定書に収載するための研究を行った。また、動物実験に備えて、大量合成法を検討した。

アメリカのDietary supplementの動きを反映して、最近、多くのアミノ酸製品、ビタミン製品、ミネラル製品に加えてハーブ製品が出回っている。この中で、セントジョーンズ ワーツとの名称で売買されているものが薬物代謝酵素阻害により薬物相互作用に影響を与え、海外では治療中の患者に被害が発生している。そこでFDA情報を収集した。これに関しては安全対策課が副作用情報で警告を発した。

## A. 研究目的

生薬および漢方製剤は天然由来の医薬品であるので一般に無害であるとの誤った認識が世界的に広まっていたが、アリストロキア酸を含む製剤による間質性腎炎とその進行による発癌並びに小柴胡湯による間質性肺炎が報告され、安易な服用に警告がもたらされた。本研究では、発症のメカニズムを解明し、これらの副作用被害を阻止することを目的に検討を続けてきた。

まず、小柴胡湯の間質性肺炎誘発ないし修飾作用を検討するために、Th1 dominant strain で interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 高発現系の 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 マウスを用いて実験を行った。本年度は小柴胡湯による間質性肺炎発症のメカニズム検討の一環として、上記の ICR マウスを用いた実験の肺について、マクロファージの表面マーカーである Mac-3 とケモカインの一種である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の免疫組織学的検索を行うとともに、小柴胡湯の各種サイトカイン発現への影響をみるために、肺組織での Th1/Th2 細胞サイトカイン, TNF シグナリング, 炎症性サイトカイン及び MCP-1 の mRNA シグナルの RT-PCR 法による検索を行った。

一方、薬物代謝酵素が詳細に研究されて個人レベルでの酵素の多様性が明らかになっている。そこで、小柴胡湯の薬物代謝酵素への影響を検

討することにより薬効成分の体内での挙動を明らかにし、他の医薬品を服用している場合の薬物相互作用を検討した。

小柴胡湯による副作用については漢方医療独特の「証」の診断法を用いずに投薬したことによるとの議論がある。そこで、伝統漢方を継承し、証に基づき煎じ薬として患者治療を行い、したがって基本的に漢方薬の選択は証に基づいて行っている北里研究所東洋医学総合研究所での過去5年間の副作用例を調査研究した。

アリストロキア酸については、間質性腎炎などの有害な作用を引き起こすことからイギリス、カナダ、アメリカがそれぞれ生薬・生薬製剤の輸入時にはアリストロキア酸含有生薬はもとより、基原植物種が異なりアリストロキア酸は含有していないことが確認されている生薬であっても名称の類似したものについては証明書の提出を求めるという厳しい規制を打ち出した。これに応じて日本漢方生薬製剤協会は国内で製造または輸入販売される生薬および生薬・漢方製剤についてアリストロキア酸を含有しないことをかくにんし、品質を保証する目的で自主基準を策定した。そこでこの基準案を検討し、公定書に収載するための定量法を設定した。また、昨年度検討したアリストロキア酸類縁化合物について今年度は動物実験を前提に、大量合成法をさらに進めた。

## B. 研究方法

### (1)小柴胡湯に関する研究

#### (1-1) 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。

実験方法：実験1として，ICRマウスを用いてモノクロタリンを150mg/kgの割合で週1回，計5回皮下投与し，モノクロタリン投与開始時から11週ないし最終投与の1週間後から6週間，小柴胡湯を0.1%ないし2.0%の割合で各群15-16匹に混餌投与した(Figure 1)。次に実験2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2.0%の小柴胡湯の混餌投与期間中に IFN- $\alpha$  の隔日投与を行った。また，小柴胡湯の陰性対照も設けた(Figure 2)。これらの動物の肺について病理組織学的検索を行ったほか，実験1に関しては Mac-3 (macrophage-specific antibody, PharMingen International) 及び Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

の免疫組織学的検索を行った。さらに，実験1は溶媒対照群，モノクロタリン単独投与群，モノクロタリン+2.0%小柴胡湯6週間投与群及びモノクロタリン+2.0%小柴胡湯11週間投与群について，実験2は溶媒対照群及びモノクロタリン単独投与群について，病理組織学的に間質性肺炎の程度のグレーディングを行った結果をもとに，スコア値の高かった動物を各群5匹ずつ選択し，CytoExpress kit (Biosource)を用いて肺の Th1/Th2 細胞サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ ), TNF シグナリング (NF- $\kappa$ B, LICE (Caspase 3), TNF- $\alpha$ , bcl-2, I $\kappa$ B), 炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\alpha$ , GM-CSF), GAPDH の mRNA シグナルを検索するとともに MCP-1 mRNA シグナルについても RT-PCR 法にて検索を行った。

#### (1-2) 柴胡剤の肝薬物代謝酵素誘導に与える影響

##### 【使用動物】

ICR 雄性マウス 6~10 週齢（静岡実験動物センター、日本、浜松）  
ICR 雌性マウス 6~16 週齢（静岡実験動物センター、日本、浜松）  
ICR 雌性マウス 60、62 週齢（静岡実験動物センター、日本、浜松）  
Sprague Dawry 雄性ラット 6~10 週齢（日本チャールスリバー）  
Sprague Dawry 雌性ラット 6~10 週齢（日本チャールスリバー）  
これらの動物は水と食餌（CE-2）は

自由に与えてある。

#### 【漢方方剤の調製】

漢方方剤のヒト一日量に相当する各種生薬を紙パックに入れ、これを薬煎に入れて600mlの水で1時間加熱抽出した。この抽出液を凍結乾燥することにより、粉末エキスを得た。

#### 【各種漢方方剤の構成生薬】

小柴胡湯：柴胡 7 g、半夏 5 g、人参 3 g、黄芩 3 g、大棗 3 g、甘草 2 g、生姜 1 g

大柴胡湯：柴胡 6 g、半夏 4 g、黄芩 3 g、大棗 3 g、生姜 1 g、芍薬 3 g、枳実 2 g、大黄 1 g

柴胡桂枝湯：柴胡 7 g、半夏 5 g、人参 2 g、黄芩 2 g、大棗 2 g、甘草 2 g、桂皮 2 g、芍薬 2 g、生姜 1 g

四逆散：柴胡 5 g、芍薬 4 g、枳実 2 g、甘草 1.5 g

補中益气湯：黄耆 4 g、蒼朮 4 g、人参 4 g、当帰 3 g、柴胡 2 g、大棗 2 g、陳皮 2 g、甘草 1.5 g、升麻 1 g、生姜 0.5 g

十全大補湯：黄耆 3 g、桂皮 3 g、地黄 3 g、芍薬 3 g、川芎 3 g、蒼朮 3 g、当帰 3 g、人参 3 g、茯苓 3 g、甘草 1.5 g

人参養栄湯：地黄 4 g、当帰 4 g、白朮 4 g、茯苓 4 g、人参 3 g、桂皮 2.5 g、遠志 2 g、芍薬 2 g、陳皮 2 g、黄耆 1.5 g、甘草 1 g、五味子 1 g

川芎：センキュウ 黄芩：オウゴン

#### 【薬物の経口投与】

ラット、マウスに対する短期投与（単

回、1週間）の場合は強制飲水を行った。

各漢方方剤の粉末エキスを体重換算して、ヒト1日分の常用量の5または10倍量に相当する量を水に溶かしてマウスまたはラットの体重10gあたり0.1 mLをゾンデにより定められた期間経口投与し、各漢方方剤投与群とした。コントロール群には同量の水を経口投与した。

小柴胡湯：6.65 g ÷ 60 kg（日本人の平均体重60 kgとして）× 5（倍量）= 0.554 g/day

また、マウスに対する長期投与（4週間）の場合は、自由飲水を行った。

マウスは1日あたりおよそ10 mlの水を摂取するとして体重あたりの投与量を決め、ヒト1日分の常用量の5または10倍量に相当する量を水100 mLに溶解させることにした。ケージあたりのマウス平均体重が20gのとき、投与量は次のようにして求められる。

小柴胡湯：6.65 g ÷ 60 kg × 5（倍量）× 20 g（マウス平均体重）= 11.08 g/day

小柴胡湯 110.8 mg を水 100 mL に溶解すればよい。

（1 - 2 - 1）柴胡剤のPentobarbital 誘発睡眠時間に及ぼす影響

i) 種差について：マウスPentobarbital 誘発睡眠時間

柴胡剤として、大柴胡湯、四逆散、小柴胡湯、柴胡桂枝湯の4種を、それぞれヒト常用量の5倍量の投与量

で、雌性 ICR マウス 6 週齢に 1 週間、4 週間飲水投与した。その後、睡眠時間測定まで 48 時間通常の給水に戻し (wash out 期間)、Pentobarbital を 60 mg/kg 腹腔内投与し、正向反射の消失から回復までの時間を睡眠時間とした。ここで 48 時間の wash out 期間をおいたのは、投与した方剤による中枢神経系への影響を排除するためである。

ii) 種差について：ラット Pentobarbital 誘発睡眠時間

柴胡剤として、大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯の 3 種、それぞれヒト常用量の 5 倍量の投与量で、雌性 SD ラット 6 週齢に 2 週間、4 週間のそれぞれについて経口投与し、睡眠時間の測定に際し、Pentobarbital は 30 mg/kg を腹腔内投与した。【Sleepingtime の測定】飲水投与を中止して 48 時間後に Pentobarbital Sodium (ネンブタール, ダイナボット; Pentobarbital 50 mg/mL 溶液) をマウスに対しては 60 mg/kg、ラットに対しては 30 mg/kg で腹腔内投与した。その後、正向反射が消失してから回復するまでの時間を Sleeping-time として測定した。このときマウスを仰向けにして寝かせ、2 回連続で起き上がったことを確認してこれを回復の判断とした。

iii) 性差について

薬物代謝酵素の種類やその含量には、性差が存在することが知られており、特に性差はげっ歯類について

よく知られている。そこで小柴胡湯が雄性マウス、ラットに対しても、同様に睡眠時間を短縮させるかどうか、検討した。

(1-2-2) cytochrome P-450 mRNA 発現量の解析

本実験では、4 段階に濃度を変えた RNA competitor、A、B、C、D を目的とする RNA サンプルと同時に競合させて PCR を行った。サンプル RNA 由来のバンドと RNA competitor 由来のバンドが等しい competitor 濃度から、mRNA 推定発現量を求めている。

【全 RNA の抽出】

Total RNA Extration Kit (Pharmacia Biotech) を用いた。Extration Buffer 150  $\mu$ L と  $\beta$ -mercaptoethanol 3  $\mu$ L を入れたチューブに、凍結保存した肝臓をスパーテルで山盛り 1 さじ分加え、シリンジで攪拌した。Lithium Chloride Solution 350  $\mu$ L を加えてさらに攪拌し、Cs TFA 500  $\mu$ L を加えた。これを 4 $^{\circ}$ C、13000 rpm で 15 分遠心して上清を除き、Extration Buffer 75  $\mu$ L、Lithium Chloride Solution 175  $\mu$ L、Cs TFA 250  $\mu$ L を加えた。4  $^{\circ}$ C、13000 rpm で 10 分遠心して上清を除き、70 % Ethanol 1 mL を加えた。4  $^{\circ}$ C、12000 rpm で 10 分遠心し、上清を除いて DEPC 水 100  $\mu$ L を加え、全 RNA の抽出を終えた。これを 100 倍希釈して吸光度を測定し (Pharmacia Biotech)、RNA 濃度を求めた。

### 【DNase 処理】

RT-PCR では特にゲノム DNA の混入が問題となるので、純粋な RNA を得るために抽出した RNA サンプルを Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (LIFE TECHNOLOGIES)を用いて処理した。1.5 mL チューブに以下の反応液を調製した。

total RNA	6 $\mu$ g
DNase I Amp Grade	6 $\mu$ L
10 $\times$ DNase I Reaction Buffer	6 $\mu$ L

DEPC treated water to 60  $\mu$ L

室温で 15 分インキュベートし、さらに 25 mM EDTA 6  $\mu$ L を加えて 65  $^{\circ}$ C で 10 分インキュベートした。次に DEPC 水 60  $\mu$ L、TE Saturated Phenol (ニッポンジーン) 120  $\mu$ L を加えてよく攪拌し、12000rpm で 1 分遠心した (除タンパク処理)。フェノール層が入らないように注意して上層を新しいチューブにピペットで移し、Sodium Acetate Buffer Solution 3 M (nacalai tesque) 32  $\mu$ L、99 % ethanol 150  $\mu$ L を加え、攪拌した。-75  $^{\circ}$ C で 1 時間おき、12000 rpm で 10 分遠心した。アスピレーターで上清を除いて、白色の RNA が沈殿していることを確認し、もういちど 99 % ethanol 1mL を加えて 12000 rpm で 2 分遠心した。アスピレーターで上清を除いて風乾し、DEPC 水 20  $\mu$ L を加えた。

◆ Competitive RT-PCR 法による

### RNA の定量

ラット チトクローム P450 Competitive RT-PCR Set (TaKaRa BIOMEDICALS)を用いた。

### 【RNA Competitor】

RNA Competitor は 1 分子中に使用するすべてのプライマーを含む。また、同一反応条件で各分子種の増幅効率が揃うように配列が設計されており、増幅効率は  $\pm 25$  % 以内である。

A :  $1 \times 10^7$  copies /  $\mu$ L

B :  $4 \times 10^7$  copies /  $\mu$ L

C :  $1.6 \times 10^8$  copies /  $\mu$ L

D :  $6.4 \times 10^8$  copies /  $\mu$ L

### 【cDNA の合成 (RT reaction)】

逆転写酵素 MMLV Reverse Transcriptase RNase H- (TOYOBO)で cDNA を合成した。

以下の反応液を調製し、1 サンプルにつき 4 段階に濃度を変えた RNA Competitor A、B、C、D を各々添加した反応液を 4 本作製した。

調製例) 1 サンプル当り (5 分子種分)

ピペッティング誤差をできるだけ少なくするため、RNA Competitor を除くその他の試薬を混合したマスターミックスを 1.5mL チューブに作製した。

### 最終濃度

5 $\times$ RNA PCR buffer 1  $\times$  30  $\mu$ L

dNTP (10 nM) 1 mM 15  $\mu$ L

Rever Tra ase (100 U/ $\mu$ L) 0.3 U/ $\mu$ L 0.45  $\mu$ L

oligo dT (2.64 pmol/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L

M 7.5  $\mu$ L  
 total RNA (OD 260 換算値  
 100 ng/ $\mu$ L) 3 ng/ $\mu$ L  
 4.5  $\mu$ L  
 RNACOMPETITOR 5% 7.5  $\mu$ L  
 DEPC treated water to 150  
 PCR チューブを 4 本用意し、作製  
 したマスターミックスをそれぞれ 30  
 $\mu$ L ずつ分注した。RNA Competitor  
 A、B、C、D をそれぞれチューブあ  
 たり 1.5  $\mu$ L ずつ分注した。サーマ  
 ルサイクラーにセットし、以下の反  
 応を行った。  
 30  $^{\circ}$ C 10 min  
 42  $^{\circ}$ C 30 min 1 cycle  
 72  $^{\circ}$ C 5 min  
 5  $^{\circ}$ C 5 min

【PCRによる増幅 (PCR reaction)】  
 各サンプルにつき 1A1、1A2、2B1/2、  
 2E1、3A1、3A2、4A1 のそれぞれの  
 分子種と cyclophilin を合わせた  
 計 8 種について反応を行った。  
 cDNA を鋳型とし、Taq DNA  
 polymerase と各分子種の primer  
 を用いて以下に示す PCR 反応液で  
 増幅した。

調製例) 1 サンプル当り (1 分子  
 種の調製)

ピペッティング誤差をできるだけ少  
 なくするため、逆転写反応液を除く  
 その他の試薬を混合したマスターミ  
 ックスを 1.5 mL チューブに作製し  
 た。

最終濃度

10 $\times$ LA PCR buffer 1  $\times$ 10  $\mu$ L  
 LA taq (5 U/ $\mu$ L) 0.025 U/ $\mu$ L

0.5  $\mu$ L  
 primer 2% 2  $\mu$ L  
 RT 液 20% 20  $\mu$ L  
 DEPC treated water to 100  $\mu$ L  
 PCR チューブを各 primer につき  
 4 本用意し、作製したマスターミッ  
 クスをそれぞれ 20  $\mu$ L ずつ分注し  
 た。そこに逆転写反応液 4 種類を各  
 チューブに 5  $\mu$ L ずつ分注した。サー  
 マルサイクラーにセットし、以下の  
 反応を行った。  
 92 $^{\circ}$ C 9 min  
 94 $^{\circ}$ C 30sec  
 56 $^{\circ}$ C 30sec 24cycle  
 72 $^{\circ}$ C 30sec  
 72 $^{\circ}$ C 5min  
 4 $^{\circ}$ C  $\infty$

【電気泳動】

PCR 反応終了後、反応液 25  $\mu$ L に  
 gel-loading buffer (ニッポンジ  
 ーン) 6  $\mu$ L を加え、そのうちの 15  $\mu$   
 L を 2% アガロースゲル (Agarose S,  
 ニッポンジーン) にのせた。DNA 分  
 子量マーカーを 1.5  $\mu$ L のせ、電気  
 泳動した。(Mupid-21、コスモ・バ  
 イオ株式会社) 電気泳動終了後、  
 ethidium bromide で検出した。染  
 色後のゲルを UV トランスルミネ  
 ーターで照射し写真撮影した。

【判定方法】

染色後のゲルをアナライザーでコン  
 ピューターにとりこみ、発現したバ  
 ンドの体積を検出した。(Image  
 Quant) 各サンプルで mRNA 由来  
 のバンドと RNA competitor 由来の  
 バンドが 1:1 に近いレーンを探し、



求めた RNA competitor の濃度から mRNA 推定発現量を次のようにして求めた。

mRNA 推定発現量 [copies /ng total RNA]

= RNA competitor の濃度 [copies / $\mu$ L]  $\times$  5 [ $\mu$ L] / 300 [ng total RNA]

また、サンプル間の RNA 量について発現量を定量するために、cyclophilin プライマーを用いた。サンプル間で発現量が異なった場合 (4 倍以内) は補正して比較した。

#### 【 P450 各分子種の増幅サイズ】

各プライマーは各分子種を特異的に増幅するように設計されている。ただし、CYP 2B1 および CYP 2B2 mRNA はその配列が 97% 一致しているため、CYP2B1/2 として合わせて増幅した。

鑄型の種類	増幅サイズ (bp)	
	competitor	mRNA
CYP 1A1	264	332
CYP 1A2	266	237
CYP 2B1/2	438	550
CYP2E1	378	474
CYP 3A1	456	581
CYP 3A2	141	117
CYP 4A1	275	345
Cyclophilin	320	266

#### i) 雌性 SD ラット

柴胡剤として、大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯の 3 種、それぞれヒト常用量の 5 倍量を、雌性 SD ラット 6 週齢に 1 週間、2 週間、4 週間のそれぞれの期間、経口投与で与えた。最終投与から 24 時間後の肝

臓を採取して mRNA を抽出し、先に述べたそれぞれの分子種について定量を行った。

#### ii) 雄性 SD ラットについて

先に述べたように、Pentobarbital 誘発睡眠時間に与える柴胡剤の影響は、マウスで雌だけに、ラットでは雌雄ともに認められた。そこで、mRNA の解析を雄性ラットについて同様に行い、比較した。柴胡剤として、大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯の 3 種、それぞれヒト常用量の 5 倍量を、雄性 SD ラット 6 週齢に 2 週間、4 週間経口投与し、最終投与から 24 時間後の肝臓を採取して mRNA を抽出し、先に述べたそれぞれの分子種について定量を行った。

#### iii) フェノバルビタールによる cytochrome P450 分子種の誘導

competitive RT-PCR 法による mRNA の定量が正しく行われていることを確認するために、cytochrome P450 分子種、特に CYP2B1 および 2B2、CYP2B1/2、CYP3A1 が実際に誘導されてくるかどうかを確かめることにした。【フェノバルビタールの投与】Phenobarbital Sodium 精製水に溶かし、80 mg/kg となるよう雌性 SD ラット、雄性 SD ラット 6 週齢にそれぞれ 1 週間経口投与した。最終投与から 24 時間後の肝臓を摘出し、サンプルとした。

#### (1-2-3) 老齢マウスに与える影響

使用動物は 6 週齢、10 週齢、16 週齢、60 週齢の雌性 ICR マウスを

用いた。60週齢の動物はおよそ35週齢でリタイアとなったものを購入先から譲り受け、さらに実験動物飼育施設で飼育を続けたものである。

i) 小柴胡湯の薬物代謝酵素亢進作用

これらの老齢マウスにPentobarbitalを投与した。

ii) 老齢マウスに小柴胡湯を2週間投与し、その効果を検討した。

iii) 補中益気湯、十全大補湯、人參養榮湯はそれぞれヒト常用量の5倍量を雌性ICRマウスに2週間投与した。

(1-3) 証に基づく漢方薬選択における副作用調査

1997年から2001年までの5年間に北里研究所受診患者で肝機能障害、間質性肺炎他の重篤な副作用を起こした例を把握できる範囲で検討し、その起因漢方薬との関係につき調べた。北里研究所東洋医学総合研究所を受診する初診患者数は年間2500～3000人、延べ受診者数は35,000人～40,000人である。

(2) アリストロキア酸に関する研究

(2-1) アリストロキア酸の定量法

対象生薬はモクツウ、モッコウ、ボウイ、サイシン、さらにこれらの生薬が配合されている生薬・漢方製剤とした。なお、輸入製剤も対象とする。生薬は納入口ット毎に、製品については定期的に検査を実施し、輸入製剤については製品ロット毎に試験する。定量法は高速液体クロマ

トグラフ法とした。

(2-2) アリストロキア酸の大量合成法

昨年度は、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Aristolactam, Cepharanone-Aをそれぞれ合成し、分離精製した。本年度は大量合成法について検討した。

C. 研究結果

1) 小柴胡湯に関する研究

(1-1) 動物実験による小柴胡湯起因間質性肺炎解明

実験1では、昨年報告した通りモノクロタリン投与によりII型肺胞上皮の減少、残存上皮細胞の巨核化、肺胞壁の線維索性肥厚、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・集簇、血管周囲炎ないし血管炎の変化が認められた。各個体で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、モノクロタリンとともに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。また、肺胞壁の線維索性肥厚、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・集簇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。免疫組織学的検索の結果、Mac-

3抗体で検出されるマクロファージ数はモノクロタリン単独投与群に比較して、肺傷害の強い、モノクロタリン+小柴胡湯 11 週間投与群に多くなる傾向が認められた。MCP-1 の発現は浸出マクロファージ、肺胞上皮及び血管平滑筋に認められ、MCP-1 immunostaining score の高い動物で Mac-3 陽性マクロファージ数が多く、モノクロタリン+2.0%小柴胡湯 11 週間投与群で MCP-1 陽性細胞の出現も多くなる傾向を認めた。さらに、これらの動物の肺での Th1/Th2 細胞サイトカイン、TNF シグナリング、炎症性サイトカイン、MCP-1 などの mRNA シグナルを検索した結果、肺傷害の強い例で IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 及び NF- $\kappa$ B mRNA の発現が増加したが、群間では発現パターンに差は認められなかった。実験 2 においては、モノクロタリン投与の後 IFN- $\alpha$  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 1 とほぼ同様に明らかではなかった。これらの動物の肺での各種サイトカイン mRNA シグナルを検索した結果、モノクロタリン単独投与群の TNF シグナリング及び炎症性サイトカインの値は溶媒対照群に比較して小さかった。

( 1 - 2 - 1 ) 柴胡剤の Pentobarbital 誘発睡眠時間に及ぼ

す影響

1 週間の投与期間ではいずれの投与群においても睡眠時間は 70 分から 80 分であり、有意な変化は認められなかった。しかし、4 週間にわたる長期投与では小柴胡湯、柴胡桂枝湯に投与群にそれぞれ有意な睡眠時間の短縮が認められた。小柴胡湯は対照群に対し 65.6 %、柴胡桂枝湯は 63.6 %の睡眠時間を示した。また、これらの漢方方剤の投与は各群の体重増加率に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、雌性マウスに対して投与 4 週間で小柴胡湯、柴胡桂枝湯に有意な睡眠時間の短縮が認められ、薬物代謝酵素が誘導されていることが推測された。

雌性 SD ラットについては投与 2 週間で小柴胡湯投与群に有意な睡眠時間の短縮が認められた。柴胡桂枝湯についてはやや、睡眠時間の短縮がみられたが有意な変化ではなかった。マウスに比べ、ラットでは睡眠時間の短縮が小さく、小柴胡湯などの薬物代謝酵素への作用に種差があることを示唆している。一方、投与 4 週間ではいずれの漢方方剤においても有意な変化は認められなかった。しかし、大柴胡湯にはまったく変化が認められず、小柴胡湯、柴胡桂枝湯にやや短縮作用が認められており、この傾向はマウスと同様であった。以上のことから、柴胡剤の薬物代謝酵素に対する作用は、マウスでは 4 週間以上、ラットでは 2 週間で最も顕著な変化がみられると予測された。

雄性 ICR マウスについては小柴胡湯のみについて検討した。投与 2 週間でも、投与 4 週間でも、小柴胡湯投与による睡眠時間の変化は認められなかった。また、雌雄の対照群の平均睡眠時間は 4 週間投与を行った 10 週齢と比較すると、雌性マウスで 100 分、雄性マウスで 103 分であった。すなわち、先の結果と考え合わせると、ICR マウスにおいては Pentobarbital の代謝に関わる酵素活性に性差はないが、小柴胡湯の投与により雌にのみ薬物代謝酵素が誘導されると示唆された。また、雄性 SD ラットにおける Pentobarbital 誘発睡眠時間への影響を検討した。ラットでの睡眠時間の変動は 2 週間の方が大きかったため、雄では 2 週間のみで検討した。先に述べた雌性ラットと異なり、有意ではないがすべての群で対照群と比較して若干短くなっていた。

#### (1-2-2) cytochrome P-450 mRNA 発現量の解析

投与 1 週間のサンプルについて行った電気泳動写真を Fig. 6 に、mRNA 発現量と誘導倍率についてまとめた結果を示す。サンプルは先に述べた睡眠時間に影響のあった小柴胡湯と柴胡桂枝湯について検討した。電気泳動写真については各レーンのバンドの体積比をコンピューターによって解析し、1:1 と判定したレーンを矢印で示した。各レーンの中間に位置する矢印はその中間の濃度と判定したものである。また、内

部標準物質として house keeping gene のひとつである Cyclophilin を用い、これによってサンプル間の RNA 量を補正した。例えば Fig. 6 の場合、Cyclophilin の定量を行った結果、すべてのサンプルにおいて C レーンで一致しているため CYP の発現量には補正を必要としない。

小柴胡湯は CYP2B1/2 を 2 倍、CYP2E1 を 2.8 倍、CYP3A1 を 2 倍、CYP4A1 を 4 倍それぞれ mRNA レベルで増加させていた。一方、柴胡桂枝湯は CYP2B1/2 のみを 2 倍増加させ、他の分子種には影響を及ぼさなかった。

次に投与 2 週間のサンプルについて行った電気泳動写真を Fig. 7 に、mRNA 発現量と誘導倍率についてまとめた結果を Table. 3 に示す。

小柴胡湯は CYP2B1/2 を 4 倍、CYP2E1 を 2 倍、CYP3A1 を 4 倍、CYP4A1 を 8 倍それぞれ mRNA レベルで増加させていた。これは CYP2E1 を除き、投与 1 週間による変化に比べてさらに 2 倍の増加率であった。一方、柴胡桂枝湯は CYP2B1/2 を 2 倍増加させ、さらに投与 1 週間では変化のなかった CYP3A1 を 4 倍、CYP4A1 を 2 倍増加させていた。Table. 4 に 4 週間投与した場合の結果を示した。小柴胡湯は CYP2E1 を 4 倍、CYP3A1 を 2 倍、CYP4A1 を 2 倍それぞれ mRNA レベルで増加させていたが、1、2 週間投与で増加した CYP2B1/2 には変化がみられなかつ

た。また、対照群と比較したこの誘導倍率は、CYP2E1 を除きすべて 2 週間投与した場合より低下していた。一方、柴胡桂枝湯は 2 週間投与で 3 種の分子種が増加したにもかかわらず、4 週間投与では CYP2E1 が 2 倍増加し、CYP3A1 が 0.25 倍、CYP4A1 は 0.5 倍に減少するという結果となった。大柴胡湯は CYP2E1、CYP3A1、CYP4A1 をそれぞれ減少させた。2 週間投与を行った場合の変化を次に示す。Cyclophilin の発現量によると、CTRL、小柴胡湯、柴胡桂枝湯は D レーンと判定されたが、大柴胡湯は C レーンと判定され、mRNA 量が他のサンプルと比較して少なかったため、補正を行う必要があった。つまり、大柴胡湯については実際の発現量を 4 倍したコピー数で比較してある。4 週間投与を行った場合の変化を次に示した。Cyclophilin の発現量によると、CTRL、小柴胡湯、大柴胡湯は D レーンと判定されたが、柴胡桂枝湯は C レーンと判定され、mRNA 量が他のサンプルと比較して少なかったため、補正を行う必要があった。つまり、柴胡桂枝湯については実際の発現量を 4 倍したコピー数で比較してある。小柴胡湯投与によって CYP2E1 が 2.8 倍、CYP3A1 が 4 倍それぞれ増加した。柴胡桂枝湯については投与期間の延長によって、CYP3A1 の増加率が 1.4 倍から 4 倍に増加していた。また、雌性ラットでは 0.25 倍

に減少していたので性差が CYP3A1 についても観察された。一方、大柴胡湯は 2 週間投与で CYP2E1 や CYP3A1 をやや減少させていたが、CYP2E1 を 4 倍、CYP3A1 を 4 倍、CYP4A1 を 2 倍にそれぞれ増加させており投与期間による変化を示した。

(1-2-3) 老齢マウスに与える影響

Fig.13 (A) に示すように、Pentobarbital 誘発睡眠時間に与える加齢の影響を検討した結果である。6 週齢、10 週齢、16 週齢、60 週齢と加齢に伴い、睡眠時間が長くなっていくことがわかる。60 週齢では 6 週齢の若齢マウス群に対し有意に睡眠時間を延長し、老化による薬物代謝酵素活性の低下が確認された。次に老齢マウスに小柴胡湯を 2 週間投与し、その効果を検討した。

その結果、小柴胡湯を投与した老齢マウス群は、投与しない群に対し睡眠時間を短縮する傾向を認めた。この結果から、小柴胡湯には老化による代謝能低下を改善する作用があることが示唆された。補中益気湯、十全大補湯、人参養栄湯の 3 剤のうち補中益気湯が対照群に対し有意に睡眠時間を短縮させた。また、補剤を 4 週間投与したところやはり補中益気湯のみに睡眠時間を短縮させる傾向があった。つまり、補剤の中でも補中益気湯のみに、薬物代謝酵素を亢進する作用があることがわかった。さらに、補中益気湯、柴胡桂枝湯の老化 (Aging) に対する作用を検討

したところ、小柴胡湯にみられたような回復作用は認められなかった。

(1-3) 証に基づき漢方薬選択における副作用調査

1995年から2001年までの間に重篤な副作用を呈した症例は15例で男性4例、女性11例であった。年齢は42歳から69歳(55±8.8歳であった)。

その内訳は間質性肺炎が3例、うち2例は肝機能障害を合併していた。肝機能障害のみの症例が12例うち2例は間質性肺炎を合併していた。1例は偽アルドステロン症を合併していた。その他1例は汎血球減少症と脱毛をきたし、もう1例は65%にもおよぶ好酸球増多症を来した。

間質性肺炎の原因として考えられた漢方薬は半夏瀉心湯1例、大柴胡湯合半夏厚朴湯1例、黄連解毒湯1例であった。肝障害をきたした起因薬剤としては、12例中柴胡剤が4例あったが一定の処方傾向はなかった。黄<sub>2</sub>を含む処方では間質性肺炎をきたした3例はいずれも黄<sub>2</sub>を含む処方である可能性が高かった。肝障害をきたした12例中8例は黄<sub>2</sub>を含む処方であった。症例⑩の乙字湯で肝障害を来した例は黄<sub>2</sub>を去ることにより、肝障害の改善を認めた。起因薬剤服用から間質性肺炎、肝障害の発症に至る日数は平均59日であった。血小板減少症と脱毛は茵<sub>1</sub>蒿湯合桂枝茯苓丸服用開始後50日で発症した。好酸球増多症は味麦益気湯服用開始後30日で発症した。いずれの症例も漢方薬服用中止により症状の改善を見た

が、間質性肺炎の3例中2例はステロイド治療をした。

## 2) アリストロキア酸に関する研究

### (2-1) アリストロキア酸の定量法

試料調整：粉末とした試料2.0gをとり、メタノール・水混液(3:1)50mLを加えて15分間振り混ぜ(超音波の場合は20分間)、ろ過し資料溶液とする。

標準溶液：標準品はSigma社製のAristolochic acidを用いる。アリストロキア酸I 10mg相当量X mgを正確に量り、メタノール/水混液(3:1)に溶かし、正確に200mlとする。この液2mLを正確に量り、メタノール/水混液(3:1)を加えて正確に250mLとし、標準溶液とする。

ラベルに表示されているアリストロキア酸Iの純度：F(%)により補正する。 $X\text{ mg} = 10 \times 100 / F$

### 標準的な試験法および試験の判定

試料溶液および標準溶液10μLずつを性格にとり、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行うとき、資料溶液には標準溶液のアリストロキア酸Iに対応する保持時間にピークを認めない。認めた場合は、条件を変更して分析し、このピークがアリストロキア酸でないことを確認する。

### 操作条件

検出器：紫外吸光光度計(測定は超：400nm)

カラム：内径4.6mm、長さ25cmのステンレス管に5μmの液体クロマト

グラフ用オクタデシル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：25 ～40 °C の一定温度

移動相：0.05mol / L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  2mL / L)  $\text{CH}_3\text{CN}$  混液 (11:9)

流量：1.0ml / min

リン酸二水素ナトリウム二水和物 7.8g リン酸 2mL に水を加えて溶かし、1L とする。

操作条件は「日局」一般試験法・液体クロマトグラフ法の範囲内で変更してもよい。

(2-2) アリストロキア酸の大量合成法

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、あと処理することなく、引き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。合成はワンポットで行った。

#### 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生薬製剤であるが、この処方患者での間質性肺炎の誘発が問題となり、平成12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)。

マウスを用いたモノクロタリン誘発肺傷害モデルは、頻回投与終了後一定の潜伏期間を経て間質性肺傷害を主体とした病変を誘発し、慢性経過により線維化に至らしめるモデルであるc)。モノクロタリンにより誘発される肺傷害に対しては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(ラットでは血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)、また今回の検索により3)傷害に血管炎の介在していること(新知見)、4)傷害の強い例でMCP-1をはじめ数種類のサイトカインの発現増強を認めたこと、等が示される。今回の検索では、モノクロタリンの5週間皮下投与(1回/週)と小柴胡湯の11週間混餌投与を同時に開始した群で、モノクロタリン単独投与群に比較して病理組織学的に肺傷害の程度が増強し、免疫組織学的にMac-3陽性マクロファージ及びMCP-1陽性細胞の出現率に増強傾向を認めた。一方、

各種サイトカイン mRNA の発現解析においては肺傷害の強い例で MCP-1 をはじめ数種類のサイトカインの発現増強が認められたものの、小柴胡湯投与に特異的なサイトカインの誘導性は証明できなかった。今回のサイトカインの発現解析は、モノクロタリン投与各群で肺傷害の明らかな症例を選択したにもかかわらず、病変程度の弱い例（多巣性の病変からなる）では明らかなサイトカインの誘導性を示さなかった。モノクロタリン誘発肺傷害が、この様な小病変から急性転帰をたどって全葉性の肺傷害に進展してゆく過程を考慮すると、このモデルでは病理組織学的に強い修飾作用を示す場合でのみ、サイトカイン mRNA 発現の変動を検出できるものと考えられた。本研究で用いたモノクロタリンの 150mg/kg を 5 回投与する実験モデルは投与終了後 6 週前後で発症するように設定したモデルであるが、サイトカインの発現を含めた小柴胡湯と IFN- $\alpha$  の修飾作用を検討するためには、モノクロタリンの投与条件をより弱く設定しモノクロタリン投与終了後発症までの期間を延長させ、小柴胡湯ないし IFN- $\alpha$  の投与期間を長期化する工夫が必要であると考えられた。

柴胡剤投与によりラットでは雌雄にかかわらず薬物代謝酵素が誘導される可能性が示唆された。また、投与 2 週間の雌雄の対照群の平均睡眠時間は 2 週間投与を行った 8 週齢

で比較した場合、雌性ラットで 158 分、雄性ラットで 79 分であった。すなわち、SD ラットにおいてペントバルビタールの代謝に関わる酵素活性には性差が存在し、雄は雌よりも多くの酵素を有していることが確認された。

実際に雄ラットは雌ラットよりも多くの代謝酵素を有することが知られている。特に cytochrome P-450 の全量については雄ラットは雌ラットよりもおよそ 30 % 多く含むことが明らかとなっており 18)、本実験による結果はこれを裏付けたといえる。

雌性 SD ラットの cytochrome P-450 mRNA 発現量については、投与 1 週間、2 週間で各分子種に起こる変化はすべて誘導を増加するというものであり、またその増加率は投与期間に比例していた。雌性ラットにおける睡眠時間の影響は小柴胡湯投与 2 週間で最も顕著であったので、mRNA レベルの解析結果と一致する。さらに、誘導した分子種には Pentobarbital の代謝に関わることで知られる CYP2B1/2 や CYP3A1 が含まれており、Pentobarbital 誘発睡眠時間の短縮はこれらの分子種が投与した漢方方剤によって引き起こされたと考えられる。一方、先に述べた雌性ラットの睡眠時間は投与 4 週間では各投与群についていずれも影響を与えなかった。薬物代謝酵素は長期間投与するほど誘導されると考えていたため、この結果に疑問がもたれた。そこで、mRNA レベル



における変化は実際に誘導が抑制されているのか、次に投与 4 週間における変化をサンプルとして検討した。大柴胡湯は投与 2 週間、4 週間のいずれにおいても睡眠時間について変化が見られなかったが、mRNA レベルではどうなのか、比較検討する必要があると思われたのでサンプルに加えることにした。

その結果、検討した 3 方剤について、投与 4 週間で Pentobarbital 誘発睡眠時間の短縮が認められなかったのは、CYP2B1/2 が誘導されなかったからだと推測される。しかし、先に述べた睡眠時間の測定でやや短縮傾向がみられた小柴胡湯については CYP3A1 が増加していた。他の 2 方剤の睡眠時間についてまったく変化が認められなかったのは、CYP3A1 に起因するのではないかと考えられた。

雄性 SD ラットの cytochrome P-450 mRNA 発現量については、先に述べたように、Pentobarbital 誘発睡眠時間に与える柴胡剤の影響は、マウスで雌だけに、ラットでは雌雄ともに認められた。そこで、mRNA の解析を雄性ラットについて同様に行い、比較した。先の睡眠時間の検討では、この大柴胡湯にも雄性ラットでは若干の短縮が認められた。この mRNA の発現パターンを見ると雌性ラットでは、睡眠時間の変動を支持する mRNA の変動が確認されたが、雄性ラットでは平行せず、先の睡眠時間の結果には疑問が残る結果とな

った。雄性ラットについては投与期間の延長にともなって mRNA 発現量が増しており、雌性ラットと異なる変化をみせた。

現在のところ、臨床において他の医薬品との相互作用は報告されていない。これは、小柴胡湯を含む漢方方剤の作用が比較的マイルドであり、cytochrome P-450 に与える影響も西洋医薬品ほど大きい作用がないからだ、考えることもできるだろう。しかしながら、漢方方剤と他の医薬品との相互作用を検討することは、その作用機序を解明する上でも重要である。本研究では、行動薬理学的検討と、分子レベルでの検討として mRNA の解析にとどまったが、今後さらにタンパクレベルでの変動や、酵素活性レベルでの変動もあわせて検討が必要であると思われる。

#### 実験の部

多くの動物において、年少期の動物、特に新生仔、および老齢期の動物が、薬物に高い感受性を示すことは昔から知られている。薬物代謝能の発達過程に関する研究から、新生仔が薬物に対して高い感受性を示すことは、非常に低い、時として検出できないほどの薬物代謝能しかもたないことに関係があり、この薬物代謝能は、動物種、系統、性の違いによって異なる様式で、その酵素活性が成熟動物レベルになるまで発達していくことがわかっている。老齢期の動物における薬物代謝能の低下にも、これらの因子が関係していると思われる。

老齡動物や高齢者では薬物代謝の変化がおこり、ラットではテストステロンの水酸化反応にみられるように、薬物代謝全般にわたって著しい低下がおこる。

ヒトでは一般に高齢になると薬物代謝処理能力が低下していくと受け止められているが、明瞭な薬物代謝の減少を示す証拠はない。高齢者における薬物処理能力の見かけ上の低下は、おおむね活動している肝臓容積の減少、肝血流量の減少や血しょうタンパク質結合の変化によるものと考えられる。したがって、老齡化に伴って薬物処理能力が低下することは、まだ確立された一般的な事実として受け入れられていない。

しかし、老化（Aging）に対する Pentobarbital 誘発睡眠時間の変動は老齡動物における薬物代謝能の低下を間接的に示していた。マウスの寿命はおよそ 18 ～ 24 カ月であるので、実験に用いたマウスはヒトの高齡者にあたると思われる。60 週齡の老齡マウスは 6 週齡の若齡マウスと比較して 60 % 高い睡眠時間を示し、この事実は加齡と薬物代謝処理能力の関与を明らかなものにしたといえる。

さらに、老齡マウスの Pentobarbital 誘発睡眠時間は小柴胡湯によって短縮される傾向が認められ、小柴胡湯に老化によって低下した薬物代謝能を回復させる作用があると示唆された。これまでに述べたとおり、小柴胡湯は特に成熟した雌性動物におい

て薬物代謝能を亢進する作用があり、この作用は老化した動物にも当てはまるといえそうだ。

また、漢方医学において体力が低下し、抵抗力が乏しい状態に用いるとされる補剤にも薬物代謝能を高める働きが予想されたが、効果が認められたのは補中益気湯のみであった。また、補中益気湯は薬物代謝能の低下した老齡マウスには効果を示さなかった。

漢方薬による副作用が証にしたがっていけば起こらないと言う議論もあるが今回の調査では証にしたがって治療をしている施設である、北里研究所東洋医学総合研究所においても間質性肺炎、肝機能障害などの重篤な副作用が散見された。その他、好酸急増多症及び汎血球減少症などの重篤な副作用も見られた。

これらは臨床経過から漢方薬によるという可能性が強く示唆されたものの DLST などの手法を用いても確信を得られたものではなく、その因果関係を明らかに証明する事は不可能である。

小柴胡湯による間質性肺炎の発症のまとめによると、高齢者に多く肝障害を背景に持つものが多い<sup>4)</sup>。平均服薬期間は 50 日と言う報告であった。今回の検討でも平均年齢は 55 歳（42 歳～69 歳）と高齢者に多く平均服薬期間も 59 日と従来<sup>4)</sup>の報告にほぼ一致する。男女比では従来<sup>4)</sup>の報告では男性が多いという報告であったが、今回の調査では女性の方が多かった。これは

北里研究所東洋医学総合研究所を受診する患者は女性の方が多という背景があるものと推定される。原疾患としては SLEMCTD などの自己免疫疾患や気管支喘息などのアレルギー疾患を持つものが多かったが、これに関しても明らかな傾向は見られなかった。

発症の機序として、アレルギーの関与が示唆され、特にオウゴンを含む漢方薬に多い事が指摘されている。今回の禁薬物の中でもオウゴンを含む漢方薬は多く 1 例はオウゴンを除くことによって肝障害の改善を見ている。

しかしオウゴンを含まない漢方薬でも、肝機能障害は見られており、明らかな因果関係は認められなかった。

#### (2-1) アリストロキア酸の定量法

現在純度の確立したアリストロキア酸標準化合物を設定できないことから市販のアリストロキア酸混合物を利用した定量法を設定した。しかし、市販品は表示しているアリストロキア酸 I と II 以外の類縁化合物を含有している。また、I と II の比率もそれぞれを単離精製した化合物を基に測定すると表示は正確ではないことは明らかである。今後、早急にこれらの点を解決する必要がある。また、分析学上からは対応するピークの認定が極めて難度の高い表現になっているが、有害物質の含有に関することであるため取上げて厳くした。

#### (2-2) アリストロキア酸の大量合

#### 成法

昨年度は報告したように、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。今回は昨年度とは別に、ワンポットで簡便で、効率的な方法で合成を行った。本法は大量合成に適している。

#### E. 結論

生薬である小柴胡湯の間質性肺炎誘発性ないし修飾作用を検討する目的で、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検討した結果、モノクロタリン+小柴胡湯 11 週間投与群において、モノクロタリン単独群と比較して病理組織学的に肺傷害の程度が増強し、免疫組織学的にも病変部位で Mac-3 陽性マクロファージ及び MCP-1 陽性細胞の出現に増強傾向を認めた。小柴胡湯の肺組織でのサイトカイン発現への影響に関しては、発現パターンの明らかな変化は認められなかった。小柴胡湯と IFN- $\alpha$  との併用では肺病変部位に一致して強いリンパ球浸潤を認めたものの、小柴胡湯による肺傷害の増強作用は認められなかった。以上の結果、小柴胡湯の長期間投与により血管周囲炎及び血管炎の程度が増強し、また Mac-3 陽性マクロファージと同様 MCP-1 陽性細胞の出現に増強傾向を認めたことから、小柴胡湯投与

はモノクロタリン誘発肺傷害発生を早める何らかの免疫学的バックグラウンドの変調に関与することが予測された。

雌性動物に柴胡剤として大柴胡湯、四逆散、小柴胡湯、柴胡桂枝湯の4種の漢方方剤を投与したところ、小柴胡湯、柴胡桂枝湯に特にPentobarbital誘発睡眠時間の短縮が認められ、大柴胡湯や四逆散投与群では変化が認められなかった。この結果は偶然にも「柴胡剤」の「実・虚」による分類と一致しており「中間証」から「虚証」に用いられる「柴胡剤」に薬物代謝酵素誘導能が存在することが示唆された。

小柴胡湯をはじめとする「柴胡剤」の作用には性差が認められ、雌性動物は雄性動物よりもこれらの漢方方剤にたいする感受性が高いことがわかった。また、マウスでは投与4週間で、ラットでは投与週間でそれぞれ薬物代謝酵素が亢進されていた。

小柴胡湯、柴胡桂枝湯の投与はCYP2B、CYP2E1、CYP3A1、CYP4A1などの薬物代謝酵素をmRNAレベルで誘導した。

薬物代謝酵素活性は老化によって確かに低下することを確認した。さらに、小柴胡湯の投与は老化による代謝能の低下をも回復させることが可能であると示唆された。

また、衰えた体力を補い、生体防御機能をもつといわれる補剤の投与では、十全大補湯、人參養榮湯投与では効果が認められず、補中益気湯

にのみ薬物代謝酵素誘導能の存在が示唆された。

漢方薬による副作用は証にしたがって事業をしても稀ではあるが、起こりうる事は示唆された。いずれの症例も漢方薬の中止により症状の改善を見ており、早期に発見して対処する事が重要である。

こうした症例から定期的な検査の必要性が示唆され、漢方薬の適正使用が推進されるべきと考えられた。

生薬、生薬・漢方製剤に有害なアリストロキア酸が混入することを避けるために定量法を設定し、第14改正日本薬局方の参考情報として収載すべく整備した。

Aristolochic acids I, IIを出発原料としワンポットでAristolactam, Cepharanone-Aをそれぞれ合成した。これにより大量合成が可能になった。今後、これを用いて、毒性実験等を行う予定である。