

## 考察

漢方処方には柴胡を主剤とした処方が幾つかあり、これらは「柴胡剤」と総称されている。今回検討した4方剤は構成生薬がよく似た「柴胡剤」であり、臨床においても慢性肝炎をはじめとする肝障害に用いられるほか、様々な症状の改善に用いられる。薬物代謝に対する疾病の影響を考慮した場合、小柴胡湯をはじめとする「柴胡剤」が特に肝機能障害の改善に用いられていることから、薬物代謝能を亢進させる作用があると想像する研究者も多い。これまでに、柴胡剤と薬物代謝酵素に関連した研究報告はわずかに存在するのみである。当研究室で既に明かにしているように、四塩化炭素やガラクトサミンなどによる実験的肝障害モデルでの肝障害抑制作用の指標として測定されることが多い。<sup>2)</sup> 最近になり、漢方方剤の副作用症例が報告されるようになったため、他剤との併用時を想定した薬物代謝への影響も検討されはじめた。

結果に示すように、雌性マウスにおいて、単回または1週間の比較的短い投与期間では、Pentobarbital誘発睡眠時間への影響がほとんどみられなかった。しかし、4週間にわたる長期間の投与を行った場合は、小柴胡湯、柴胡桂枝湯のそれぞれにPentobarbital誘発睡眠時間の短縮がみられた。この結果はこれら小柴胡湯、柴胡桂枝湯の示す作用の発現にはある程度の投与期間が必要であることを示唆している。これらの方剤に共通な点は柴胡剤の中でも、特に「中間証」から「虚証」に用いるとされることである。(Fig. 1)

「証」とは漢方医学的な診断を行った結果決定されるもので、西洋医学で診断された結果、決定される「病名」とは全く異なったものである。漢方では「証」が決まると同時に、その人の病気を治療する処方決定される。「虚証」とは体力が低下し、抵抗力の弱まった状態であると考えられる。一方、これに対するものとして「実証」がある。例えば、大柴胡湯や四逆散は「実証」に用いるとされるが、今回の検討では、これらの方剤は薬物代謝酵素に影響を及ぼさなかった。つまり、「虚した状態」があらゆる外来の異物に対して抵抗力をもたず、代謝能が低下した状態であると考えれば、これを改善するひとつのファクターとして、薬物代謝能の亢進が想定される。そして、小柴胡湯や柴胡桂枝湯はまさに、その作用をもつことが示唆された。

さらに、ラットにおいては雌性SDラットで小柴胡湯が投与期間2週間でピークに睡眠時間を短縮した。柴胡桂枝湯でも若干の短縮が認められ、大柴胡湯の結果を考え合わせると、その変化率は小さくなっているものの、マウスにおける結果をおおむね支持している。性差も含め、マウスとラットの種差が大きく存在し、ここまでの結果をまとめると、小柴胡湯、柴胡桂枝湯に予期される薬物代謝酵素の誘導作用は、マウスで、また雌に顕著に出現することが示唆された。

## 第2章 cytochrome P-450 mRNA の解析

近年、薬物間相互作用の臨床報告は代謝過程に関するものが多く、その95%にcytochrome P-450が関与することが明らかとなっている。cytochrome P-450はおもに肝の小胞体に存在している約500のアミノ酸からなる分子量約50,000のヘム蛋白質である。cytochrome P-450が発見された当時、P-450は一種類と考えられていた。しかし、研究の進展に伴い、現在ではcytochrome P-450には多くの分子種（アイソザイム）が存在することが広く知られている。これらはcDNAの一次構造の相同性から4つのファミリーに分類され、個々のファミリーはさらにCYP2A、CYP2B、CYP2Cのように細分化されており、これをサブファミリーと呼んでいる。

薬物の代謝に関わる分子種はそれぞれ異なるため、それぞれの薬物がどの分子種で代謝されていくのかを明らかにすることが、臨床において重要な課題である。西洋医薬品については広く検討されてきたが、漢方薬に関しては、この分野における研究が遅れている。漢方薬は特に長期間投与される場合が多く、その投与期間内には他の医薬品と併用されることも考えられるため、早急な解明が必要であると思われた。前章のPentobarbital睡眠時間に及ぼす作用から、小柴胡湯や柴胡桂枝湯に薬物代謝酵素を誘導する作用があると推定された。

そこで、小柴胡湯、柴胡桂枝湯が誘導した分子種の特定を、mRNAレベルで検討することを試みた。mRNAの解析は、定量的なPCR法として近年開発されたCompetitive RT-PCR法によって行い、ラットcytochrome P-450の主要な8分子種（CYP1A1/2、CYP2B1/2、CYP2E1、CYP3A1/2、CYP4A1）についてmRNAの定量を試みた。検討には用いるCompetitive RT-PCR assayの都合上、実験には雌性ラットを用いた。また、酵素誘導を引き起こさないと考えられる大柴胡湯についても同様の検討を行った。

### 第一節 雌性ラットのcytochrome P-450 mRNA 発現量について

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。

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。

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 Table. 2 に示す。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ので 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。

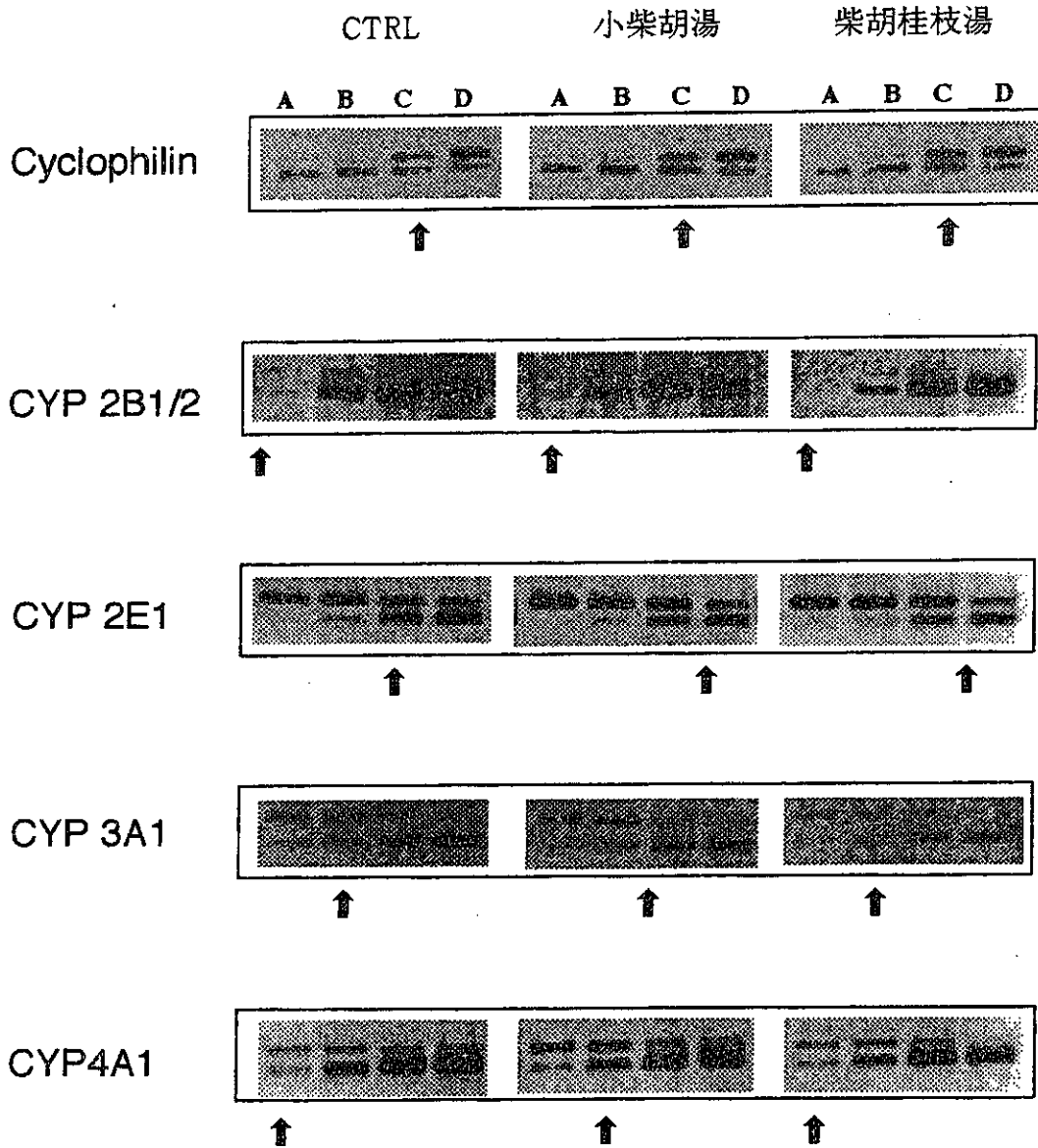
### 1 week

P-450 分子種	mRNA 推定発現量 (copies/ng total RNA)			誘導倍率	
	CTRL	小柴胡湯	柴胡桂枝湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯
CYP1A1	N.D.	N.D.	N.D.	±	±
CYP1A2	N.D.	N.D.	N.D.	±	±
CYP2B	$8.0 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	×2	×2
CYP2E1	$2.6 \times 10^6$	$7.4 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	×2.8	±
CYP3A1	$6.4 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$6.4 \times 10^5$	×2	±
CYP3A2	N.D.	N.D.	N.D.	±	±
CYP4A1	$1.6 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	×4	±

(N.D. : not detected)

Table.2 Effects of Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in Rats

**1 week**



**Fig.6 Effects of Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in female Rats**

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。

### 2 weeks

P-450 分子種	mRNA 推定発現量 (copies/ng total RNA)			誘導倍率	
	CTRL	小柴胡湯	柴胡桂枝湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯
CYP1A1	N.D.	N.D.	N.D.	±	±
CYP1A2	N.D.	N.D.	N.D.	±	±
CYP2B	$1.6 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	×4	×2
CYP2E1	$5.2 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$5.2 \times 10^6$	×2	±
CYP3A1	$6.4 \times 10^5$	$2.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	×4	×4
CYP3A2	N.D.	N.D.	N.D.	±	±
CYP4A1	$1.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$6.4 \times 10^5$	×8	×2

(N.D. : not detected)

Table.3 Effects of Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in female Rats

*2weeks*

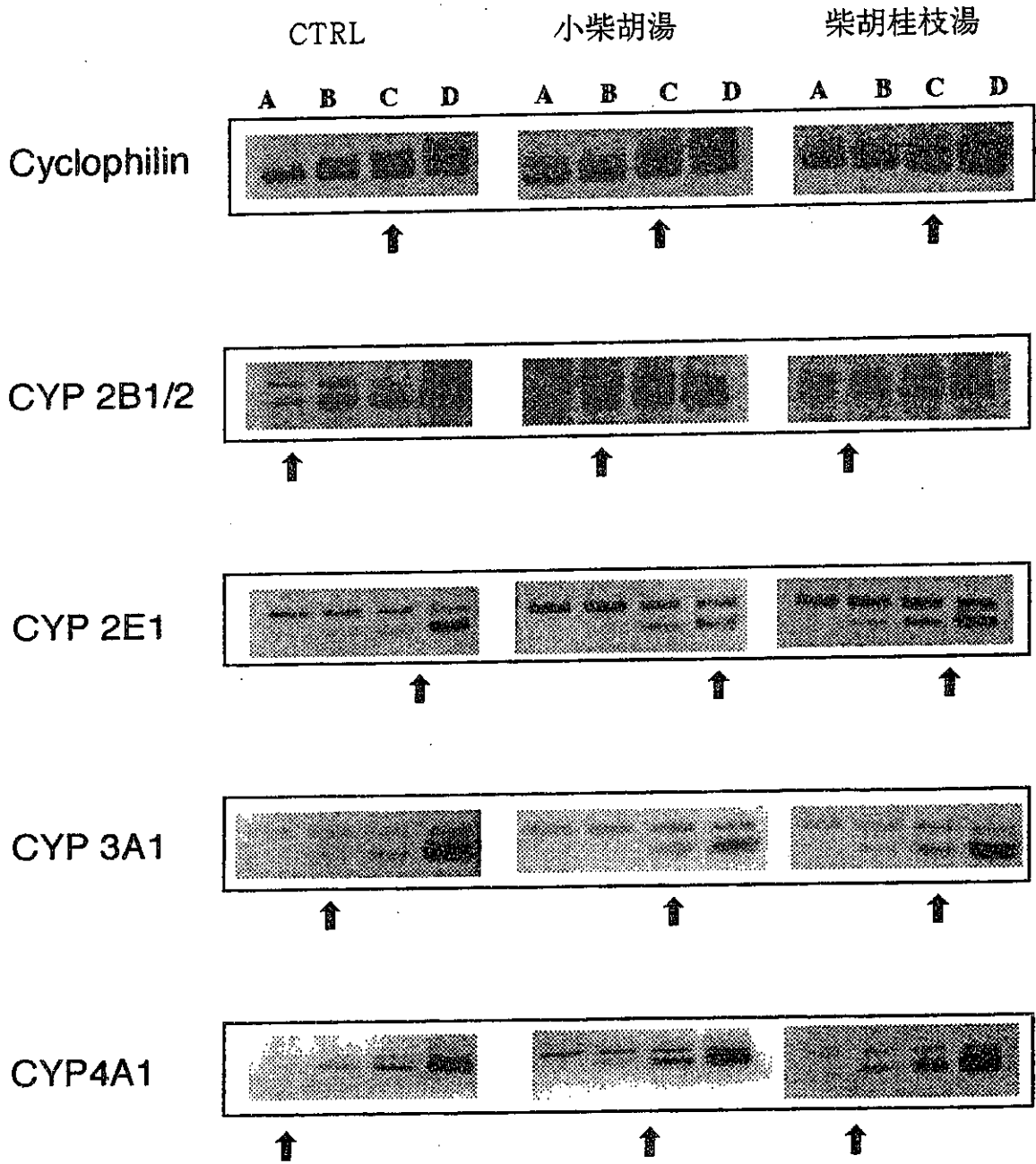


Fig.7 Effects of Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in female Rats

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。

Fig. 8、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った。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。

#### 4 weeks

P-450 分子種	mRNA 推定発現量 (copies/ng total RNA)				誘導倍率		
	CTRL	大柴胡湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯	大柴胡湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯
CYP1A1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP1A2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP2B	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	±	±	±
CYP2E1	$2.6 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$5.2 \times 10^6$	×0.5	×4	×2
CYP3A1	$1.3 \times 10^6$	$3.2 \times 10^5$	$2.6 \times 10^6$	$3.2 \times 10^5$	×0.25	×2	×0.25
CYP3A2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP4A1	$6.4 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$3.2 \times 10^5$	×0.5	×2	×0.5

(N.D. : not detected)

Table.4 Effects of Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in female Rats

これらの結果から、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。



4weeks

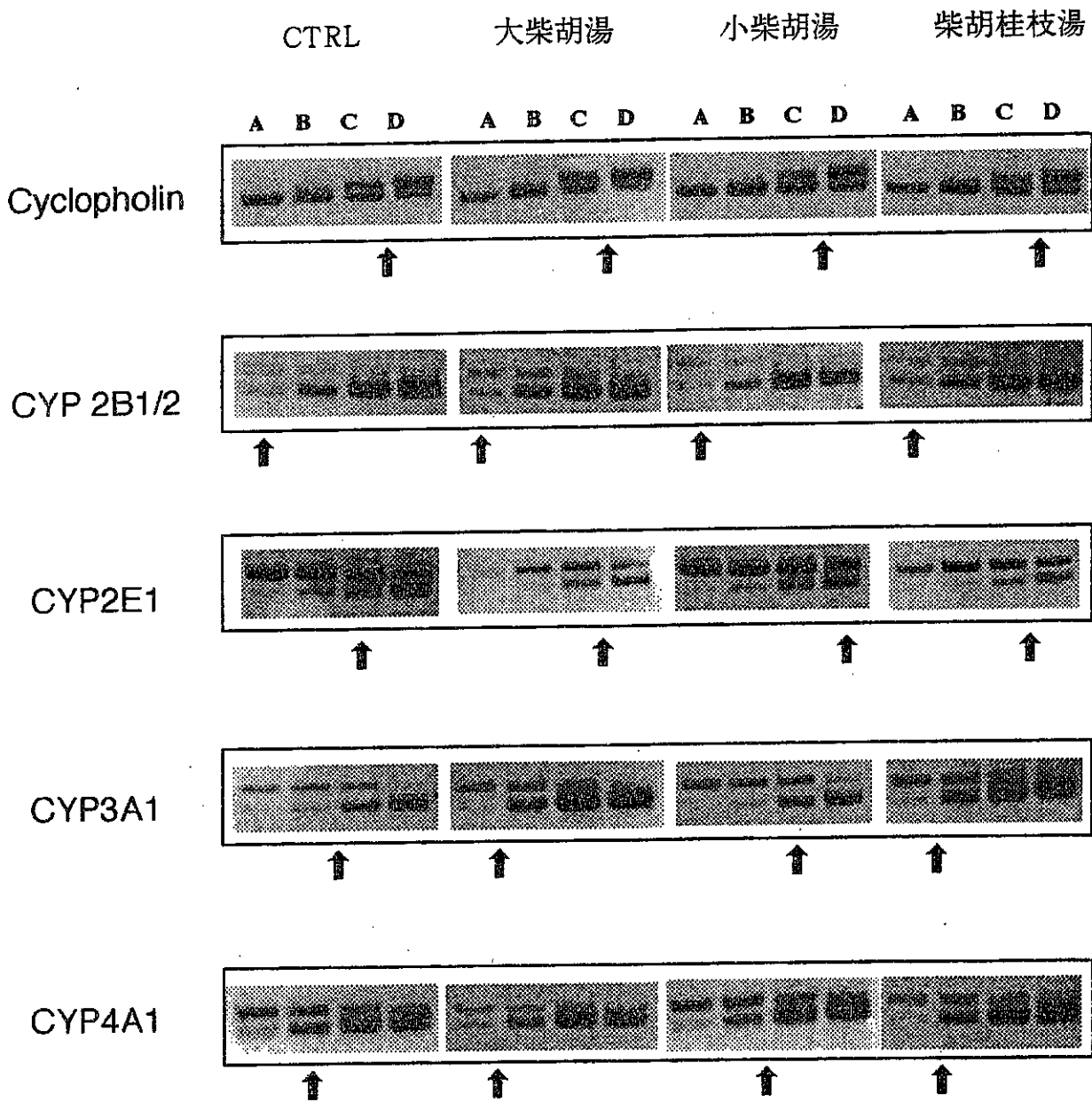


Fig.8 Effects of Dai-saiko-to, Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in female SD Rats

## 第二節 雄性ラットの cytochrome P-450 mRNA 発現量について

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。

2週間投与を行った場合の変化を次に示す。(Fig. 9、Table. 5) 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。

小柴胡湯投与によって CYP2B1/2 が 4 倍、CYP2E1 が 1.4 倍、CYP3A1 が 1.4 倍それぞれ増加した。雌性ラットの場合と比較するとその増加率は低く、特に CYP4A1 については 8 倍増加した雌性ラットと変化のみられなかった雄性ラットの間に大きな差がみられた。柴胡桂枝湯でも 2 倍増加した雌性ラットと比較して雄性ラットの CYP4A1 は 0.5 倍に減少しており、性差の存在を示唆している。大柴胡湯は CYP2E1 を 0.5 倍、CYP3A1 を 0.7 倍にそれぞれ減少させた。

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。

### 2 weeks

P-450 分子種	mRNA推定発現量 (copies/ng total RNA)				誘導倍率		
	CTRL	大柴胡湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯	大柴胡湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯
CYP1A1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP1A2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP2B	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	±	×4	±
CYP2E1	$5.2 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	$7.4 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	×0.5	×1.4	±
CYP3A1	$3.7 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	×0.7	×1.4	×1.4
CYP3A2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP4A1	$6.4 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	±	±	×0.5

(N.D. : not detected)

Table.5 Effects of Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in male Rats.

2 weeks

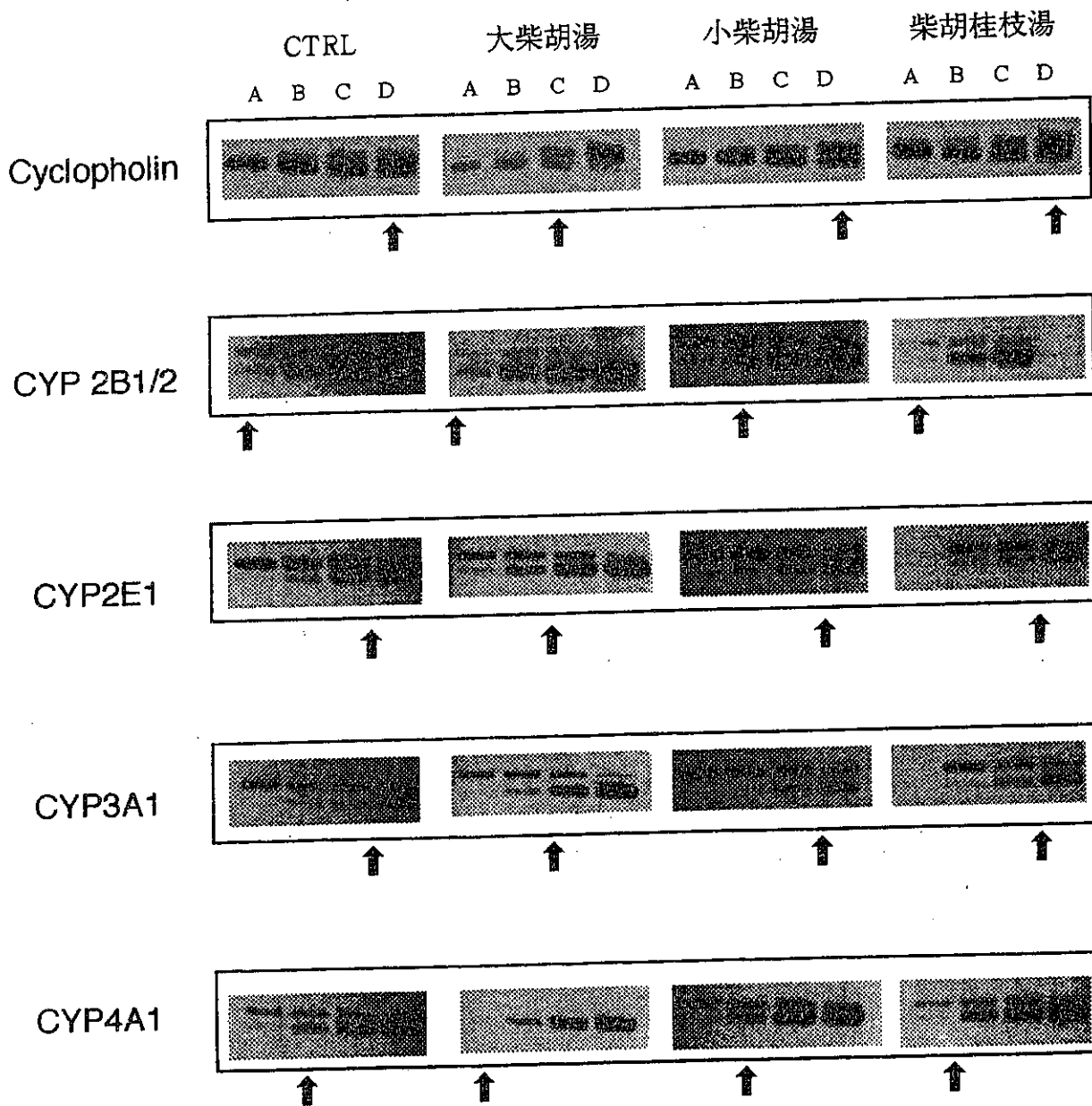


Fig.9 Effects of Dai-saiko-to, Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in male Rats

4週間投与を行った場合の変化を次に示した。(Fig. 10、Table. 6) 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。このように、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。

#### 4 weeks

P-450 分子種	mRNA推定発現量 (copies/ng total RNA)				誘導倍率		
	CTRL	大柴胡湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯	大柴胡湯	小柴胡湯	柴胡桂枝湯
CYP1A1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP1A2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP2B	$6.4 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	±	±	±
CYP2E1	$5.2 \times 10^6$	$2.2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	×4	×2.8	×2
CYP3A1	$2.6 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	×4	×4	×4
CYP3A2	D.	N.D.	N.D.	N.D.	±	±	±
CYP4A1	$6.4 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$6.4 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	×2	±	±

(N.D. : not detected)

Table.6 Effects of Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in male Rats

4 weeks

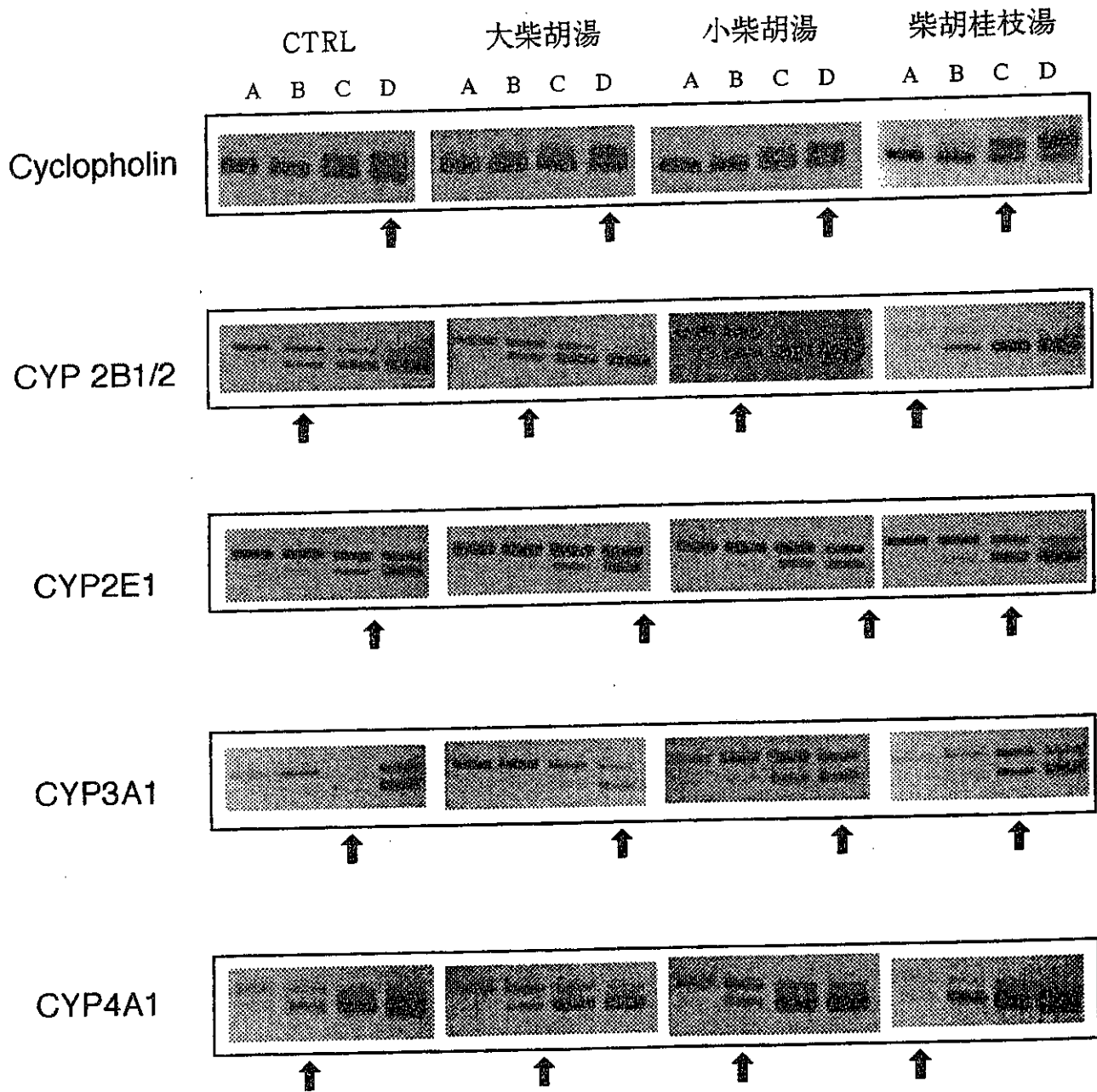


Fig.10 Effects of Dai-saiko-to, Sho-saiko-to and Saiko-keishi-to on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in male Rats

### 第三節 フェノバルビタールによる cytochrome P450 分子種の誘導

フェノバルビタール、および ペントバルビタール を含む数種のバルビツール酸系薬物を実験動物に投与すると、いくつかの cytochrome P450分子種、特に CYP2B1 および 2B2 対応の mRNA の肝臓内濃度が著しく増加する。<sup>20)</sup> CYP2B1/2 は、フェノバルビタールによって誘導される主な cytochrome P450 であるが、CYP3A1をはじめ他のいくつかの同族の cytochrome P450 も、この誘導物質によって誘導されることも明らかになっている。<sup>21)</sup> また、この誘導作用は既存のタンパク質前駆体を安定化したり、あるいは翻訳効率を上げたりすることより、むしろ転写を増大することによって、特異的 mRNA 量を増やすことによるものであるといわれている。

そこで、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も、これらの分子種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 80mg/kg をSD ラットに 1 週間経口投与し、同様の検討を行った。

雌性ラットにおける CYP2B1/2 と CYP3A1 の誘導を示した電気泳動写真を Fig. 12 に示した。CYP2B1/2 はフェノバルビタール投与によって 16 倍、CYP3A1 は 4 倍それぞれ増加していた。(Table. 7)

雄性ラットにおいても CYP2B1/2 が 32 倍、CYP3A1 が 4 倍それぞれ増加し、フェノバルビタール投与により CYP2B1/2 が主に誘導されることが確認された。(Table. 8)

この結果により、Pentobarbital の代謝には主に CYP2B1/2 が関与しており、柴胡剤の睡眠時間の変動はこの CYP2B1/2 の変動と平行すると考えられる。

## Female

P-450 分子種	mRNA推定発現量 (copies/ng total RNA)		Phenobarbital による誘導
	CTRL	Phenobarbital	
CYP1A1	N.D.	N.D.	±
CYP1A2	N.D.	N.D.	±
CYP2B	$6.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^7$	$\times 16$
CYP2E1	$2.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	±
CYP3A1	$2.6 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$\times 4$
CYP3A2	N.D.	N.D.	±
CYP4A1	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	±

(N.D. : not detected)

Table.7 Effects of Phenobarbital on the Expression of  
Cytochrome P450 mRNA in female Rats

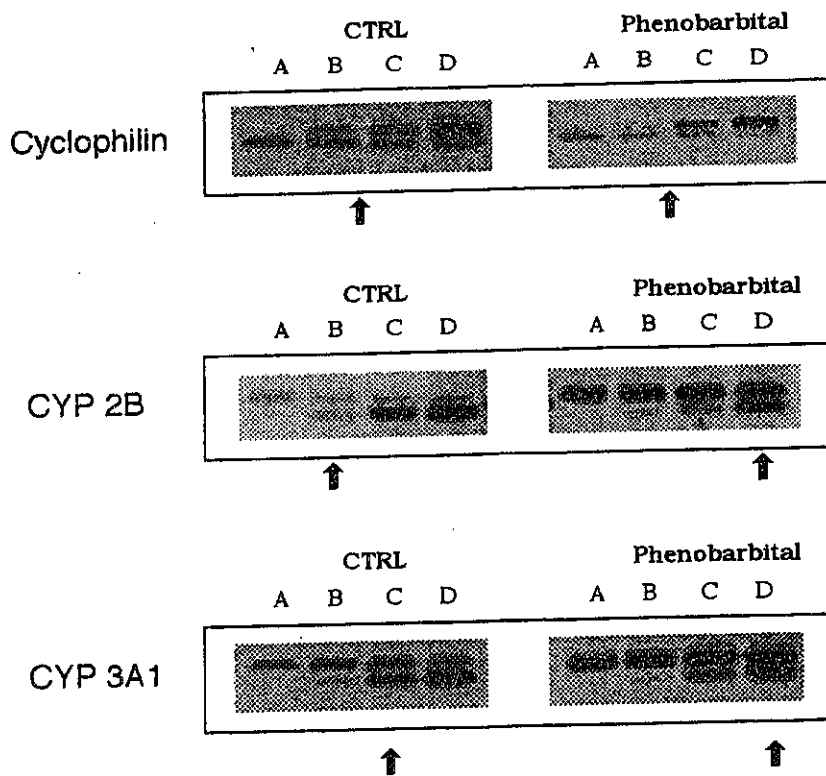


Fig. 11 Effects of Phenobarbital on the Expression of  
Cytochrome P450 mRNA in female Rats



**Male**

P-450 分子種	mRNA推定発現量 (copies/ng total RNA)		Phenobarbital による誘導
	CTRL	Phenobarbital	
CYP1A1	N.D.	N.D.	±
CYP1A2	N.D.	N.D.	±
CYP2B	$3.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^7$	×32
CYP2E1	$1.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	±
CYP3A1	$2.6 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	×4
CYP3A2	N.D.	N.D.	±
CYP4A1	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	±

(N.D. : not detected)

Table. 8 Effects of Phenobarbital on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in male Rats

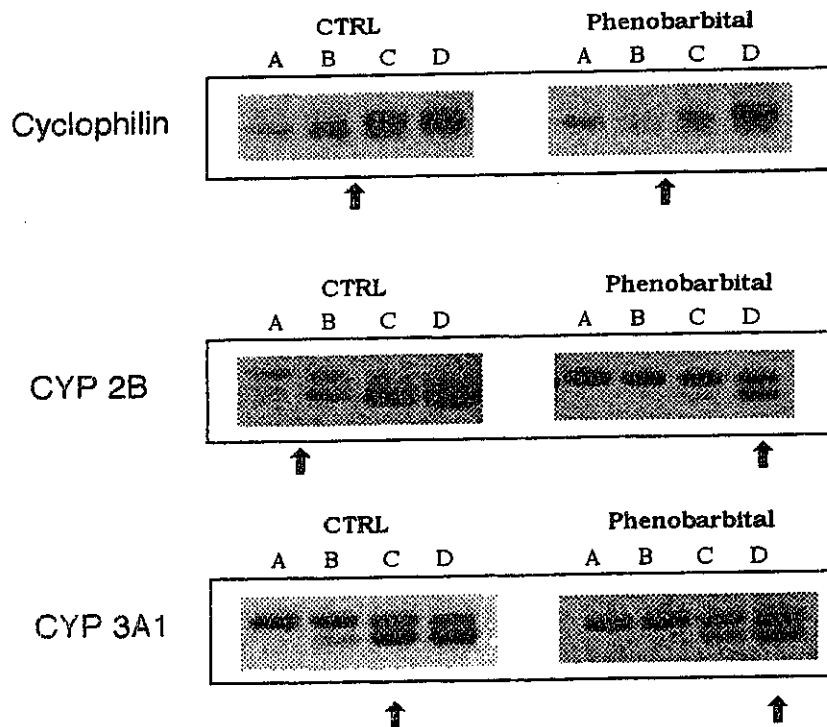


Fig. 12 Effects of Phenobarbital on the Expression of Cytochrome P450 mRNA in male Rats

## 考察

実験動物、とくにラットやマウスは薬物代謝の実験によく用いられている。これらの実験でえられたデータはヒトにおける代謝と薬物相互作用を予測する基礎情報となっている。<sup>21)</sup>

実験動物で薬物相互作用が観察された場合、ヒトでも同様の薬物相互作用が起こると予測する必要がある。この場合、薬物相互作用が観察されるときに血中薬物濃度やラットあるいはマウスの P-450 分子種の情報調べ、対応するヒトに関する情報と比較することによって予測の精度が向上する。今回検討した分子種、CYP1A1/2 および CYP2E1 は実験動物種とヒトで相同分子種が肝に発現している。このことから、上記分子種がおもに関与する反応は基質特異性を含め、実験動物からヒトへの外挿がある程度可能と考えられる。

CYP1A はがん原物質の活性化、中でも CYP1A1 はベンツピレンなどの芳香族多環炭化水素の活性化、CYP1A2 は焼けこげなどに含まれるヘテロサイクリックアミンの活性化に関わる酵素として知られている。<sup>21)</sup> 薬物代謝能を亢進する薬物の中には、CYP1A を誘導してがん原物質を活性化させる作用をもつものもあるため、第 1 章で、薬物代謝能を亢進する作用があると示唆された小柴胡湯や柴胡桂枝湯についてもこの点が危惧された。しかし、これらの漢方方剤は CYP1A1 や 1A2 の誘導を起こさなかったため、その危険性はないと思われる。さらに、発癌物質である 3-methylcolanthrene による P-450 の増加に小柴胡湯は影響を及ぼさなかったという報告もあり<sup>18)</sup>、mRNA レベルのみでなく、酵素活性レベルでも影響を及ぼさないといえる。

CYP2E1 はエタノールの代謝に関わることでよく知られている。さらに、臨床においては糖尿病との関連についても注目されている。CYP2E1 はウサギを除き現在まで一つの動物種に一つの分子種しか存在が確認されていないが、これは動物種の進化に応じて分化が進行したためと考えられている。CYP2E1 は小柴胡湯、柴胡桂枝湯は投与 1 週間でやや増加し、その後 2 週間でその増加率は減少したが、4 週間投与すると再び増加を示した。また、大西らは小柴胡湯を雌性ラットに 2 週間投与すると、生体異物の代謝においては CYP2E1 の基質の代謝率を有意に増大したと報告している。<sup>18)</sup> このことから、CYP2E1 の誘導には mRNA レベルからタンパクレベルで活性が示されるまでに時間的な差があると考えられる。しかし、CYP2E1 は転写調節を受けない分子種であるという報告もあり、このような mRNA レベルでの変動は推測にとどまるといえる。

CYP2B1/2 はバルビツール酸誘導体であるフェノバルビタール、ペンタバルビタールによって誘導される主な分子種である。したがって、第 1 章でみられた、Pentobarbital 誘発睡眠時間の短縮は、主に

CYP2B1/2 の誘導に起因すると考えられる。実際に、小柴胡湯や柴胡桂枝湯の投与により、CYP2B1/2 の mRNA 発現量は増大しており、これは投与 2 週間でピークを示した。この結果は Pentobarbital 誘発睡眠時間の検討結果と一致し、4 週間では変化がみられなかった原因ではないかと考えられる。

また、ラットの Pentobarbital 誘発睡眠時間において、マウスのように顕著な性差が認められなかった要因として、Pentobarbital の代謝に主に関わる CYP2B1/2 mRNA の誘導倍率が雌雄で 4 倍（投与 2 週間）と同程度であったためと考えられる。しかしながら、本章の実験で、CYP3A1、CYP4A1 に明らかな性差が出現した。CYP3A に属する cytochrome P-450 は、ヒト肝ミクロソームの 30 % を占める分子種であるだけでなく、CYP3A によって代謝される薬物を併用すると薬物相互作用が発現するところから、この酵素の変動は臨床的にも注目されている。ただし、CYP3A は各動物種に分岐進化した後、その動物種の中で独自に分化したと考えられており、cDNA のクローンが得られた順に番号がつけられているため、ヒトに存在するのは CYP3A3、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 であり、CYP3A1 はラットに独自に存在する分子種である。CYP3A1 は小柴胡湯や柴胡桂枝湯の投与によって変動し、2 週間で増大をみせた。しかし、4 週間投与では柴胡桂枝湯、大柴胡湯によって減少をみせた。

また、CYP4A1 についても小柴胡湯や柴胡桂枝湯の投与によって、2 週間投与で最も顕著な変動を示した分子種であるが、やはり投与 4 週間で増加率は低下した。性差による mRNA 発現の誘導率の違いは、小柴胡湯、柴胡桂枝湯投与群ともに CYP4A1 で顕著であった。CYP4A ファミリーは脂質、とりわけ脂肪酸を基質とするため、薬物をほとんど代謝できないとされる。抗高脂血症薬として知られるクロフィブラートに CYP4A6 を誘導する作用が報告されており、クロフィブラートがペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) と呼ばれるステロイドホルモンスーパーファミリーの一つと結合し、この PPAR が CYP4A 遺伝子の PPAR 応答を介して転写を活性化するというメカニズムが明らかとなってきている。小柴胡湯などの示した変動の詳細については現在のところ不明であり、今後の検討が望まれる。

また、これらの変動の経時変化についてみると、一般に薬物代謝酵素は長期間投与するほど誘導されてくるのではないかと、という推測があったのだが、Pentobarbital 誘発睡眠時間の測定結果についても、投与 4 週間では 2 週間のような薬物代謝能が表われなかった。したがって、これら漢方方剤を長期間投与した場合、その作用はフィードバック様の調節がされているのかもしれない。

これまでに、薬物代謝酵素に関する研究の最大のテーマとして、動物種差の問題が取り上げられてきた。つまり、実験動物から得たデータをヒトへ外挿するところが、可能であるか否かという問題である。本研究でもとりあげたマウスとラットのように、薬物代謝には動物種によって量的・質的な違いがあり、ヒトへの外挿を考える場合、実験動物にはよりヒトに近い動物を選択すべきである。肝 cytochrome P-450 の

cDNA クローニングによって得られた塩基配列から種間相同性を比較すると、マウスで78%、ラットで79%であるのに対し、カニクイザルで95%、マーモセットで91%の相同性を示し、これらサルがかなりヒトに近いことから、薬物代謝研究におけるサルの有用性が提案されてきた。<sup>25)</sup>しかし、これらの動物を用いるのは困難であるため、基礎的な研究において、現在もマウスやラットが薬物代謝の研究に取り上げられる。

また、ヒト P450 をコードする cDNA が得られたのを契機に、得られた cDNA を用いてヒト P450 を遺伝子工学的な手法を駆使して簡単につくれるようになってきた。大腸菌、酵母、培養細胞などにヒト P450 が発現され、実用化されている。<sup>26) -27)</sup>本研究についても、ヒトにおける漢方方剤の薬物代謝への影響を直接的に知るために、このような検討が必要であると思われる。