

第3章 老齡マウスに与える影響

高齡者では肝機能の低下を伴うホメオスタシス維持機能が低下している。従って高齡者に薬物を投与した場合、腎臓や肝臓では代謝や排泄が抑制され長時間体内に滞留してしまう傾向がある。そのため、高齡者において投与した薬物の効果が予想以上に増強されることは、臨床において注目すべき問題になっている。一般に、老化に従い、動物の個体差が拡大されていくので、老化についての研究を進めるのは困難とされているが、老化（Aging）と代謝能の関与を示すために、Pentobarbital 誘発睡眠時間に与える影響を検討することにした。

また、これまでの結果から、小柴胡湯が薬物代謝酵素を誘導する作用があることが判明し、マウスにおいて投与期間に比例してその作用が高まると予想された。そこで、代謝機能が低下した動物に対して、小柴胡湯がこれを改善できるのではないかと考え、老齡化したマウスの睡眠時間に対する小柴胡湯の影響も合わせて検討した。

第一節 小柴胡湯の薬物代謝能亢進作用

老化 (Aging) に対し、実際に薬物代謝酵素活性が低下していることを確認しようと試みた。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、さらに本学実験動物飼育施設で飼育を続けたものである。

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。

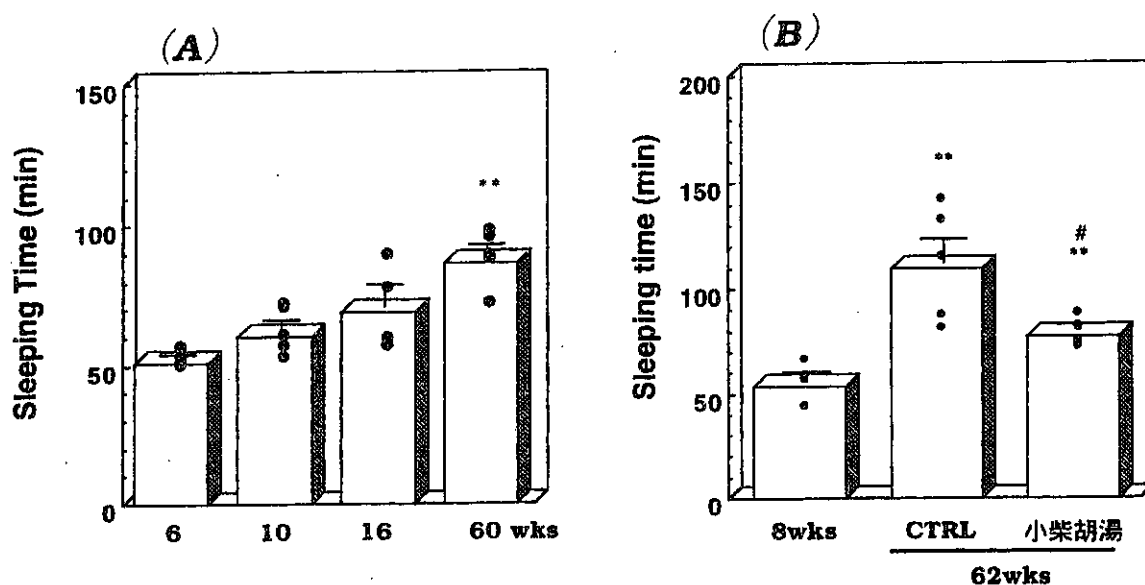


Fig.13 Effect of Shosaikoto on Pentobarbital-Na induced Sleeping Time in Aged Mice

Each column represents the mean \pm S.E.M. of 4-5 mice. ** $p < 0.01$ vs 8wks, # $p < 0.1$ vs CTRL

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。(Fig. 13(B)) 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。

第二節 補剤の影響

漢方には「不足するものにはこれを補い、過剰になったものはこれを損する」という治療の原則がある。補剤とは冒頭で説明したとおり、体力の衰えた状態を補って滋養強壯剤の役目を果たすものである。体力の衰えた状態は代謝能も低下していると考えられることから、これまで経験的に用いられてきた補剤にも薬物代謝酵素を亢進する作用があるのではないかと予想した。そこで、これまでの結果を振り返り、体力の低下した老齢マウスや比較的「中間証」から「虚証」に用いられる小柴胡湯、柴胡桂枝湯に薬物代謝酵素誘導能が認められたことから、補中益気湯、十全大補湯、人参養栄湯の3種の方剤を選び、薬物代謝酵素誘導能に与える影響を検討した。

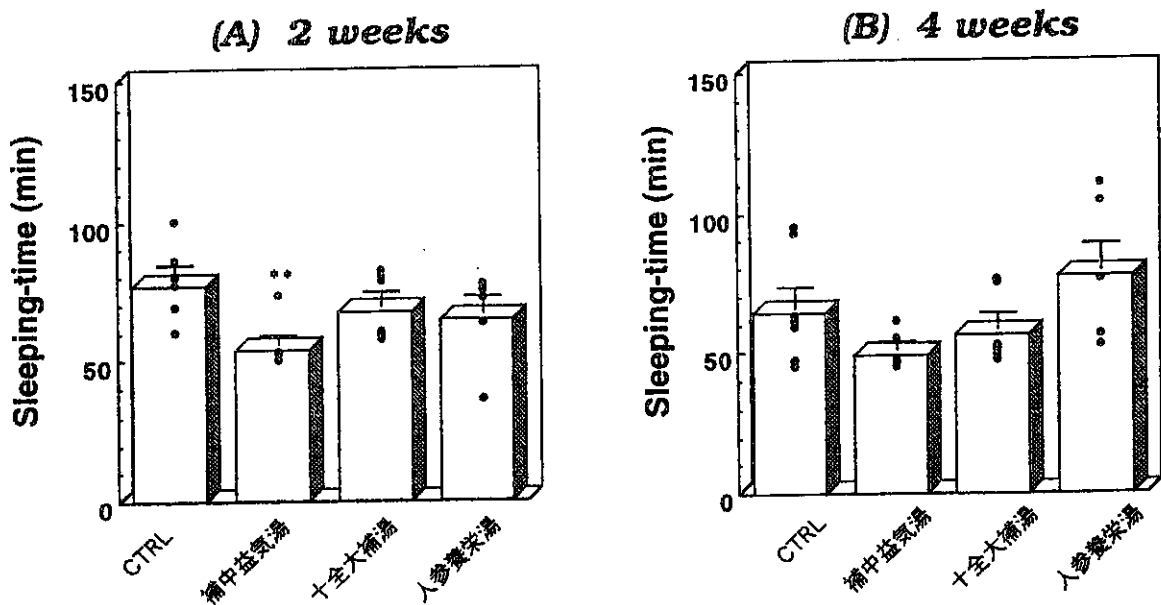


Fig.14 Effects of "Ho-zai" administered orally on Pentobarbital-Na induced Sleeping Time

Each column represents the mean \pm S.E.M. of 4-6 mice. ** $p < 0.01$, vs CTRL

補中益気湯、十全大補湯、人参養栄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。(Fig.14 (A)) すると、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。(Fig.14 (B)) 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。(Fig. 15) したがって、薬物代謝能を亢進すると思われる漢方方剤のうち、Aging に対する効果のみられたものは小柴胡湯のみであった。

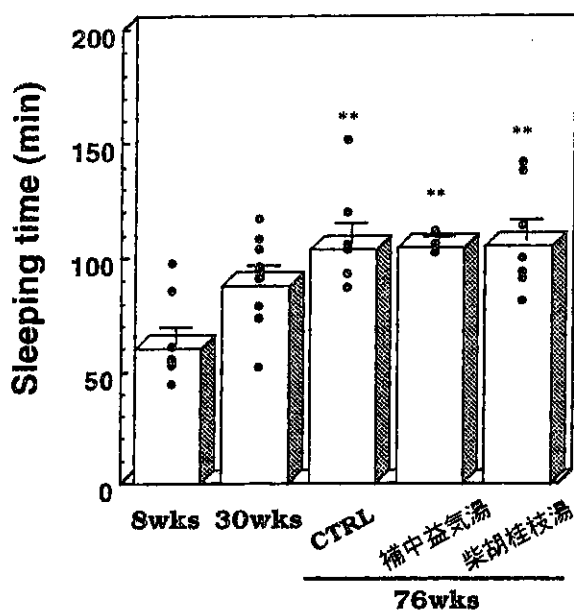


Fig.15 Effects of Hotyu-ekki-to and Saiko-keishi-to on Pentobarbital-Na induced Sleeping Time in Aged Mice

Each column represents the mean \pm S.E.M. of 5-8 mice. ** $p < 0.01$ vs 8wks

考察

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。老齢動物や高齢者では薬物代謝の変化がおり、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、老齢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齢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齢者にあたると思われる。60 週齢の老齢マウスは 6 週齢の若齢マウスと比較して 60 % 高い睡眠時間を示し、この事実は加齢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、老齢マウスの 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齢マウスには効果を示さなかった。

結論

1. 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。
2. 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。
3. 小柴胡湯、柴胡桂枝湯の投与は CYP2B、CYP3A1、CYP4A1などの薬物代謝酵素を mRNA レベルで誘導した。
4. 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。
5. 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。

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

【漢方方剤の調製】

漢方方剤のヒト1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 7g、半夏 5g、人参 3g、黄芩 3g、大棗 3g、甘草 2g、生姜 1g
- 大柴胡湯 : 柴胡 6g、半夏 4g、黄芩 3g、大棗 3g、生姜 1g、芍薬 3g、枳実 2g、大黄 1g
- 柴胡桂枝湯 : 柴胡 7g、半夏 5g、人参 2g、黄芩 2g、大棗 2g、甘草 2g、桂皮 2g、芍薬 2g、
生姜 1g
- 四逆散 : 柴胡 5g、芍薬 4g、枳実 2g、甘草 1.5g
- 補中益气湯 : 黄耆 4g、蒼朮 4g、人参 4g、当帰 3g、柴胡 2g、大棗 2g、陳皮 2g、甘草 1.5g、
升麻 1g、生姜 0.5g
- 十全大補湯 : 黄耆 3g、桂皮 3g、地黄 3g、芍薬 3g、川芎 3g、蒼朮 3g、当帰 3g、人参 3g、
茯苓 3g、甘草 1.5g
- 人参養栄湯 : 地黄 4g、当帰 4g、白朮 4g、茯苓 4g、人参 3g、桂皮 2.5g、遠志 2g、芍薬 2g、
陳皮 2g、黄耆 1.5g、甘草 1g、五味子 1g

【各種漢方方剤の平均収量】

- | | | | |
|-------|---------------------|-------|---------------------|
| 小柴胡湯 | : 6.65 ± 0.14 g/day | 大柴胡湯 | : 6.92 ± 0.18 g/day |
| 柴胡桂枝湯 | : 6.00 ± 0.22 g/day | 四逆散 | : 4.39 ± 0.07 g/day |
| 補中益气湯 | : 7.20 ± 0.95 g/day | 十全大補湯 | : 8.42 ± 0.58 g/day |
| 人参養栄湯 | : 8.89 ± 0.33 g/day | | |

【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0.1mL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。

$$\begin{aligned} \text{小柴胡湯} &: 6.65 \text{ g} \div 60 \text{ kg (日本人の平均体重 60 kg として)} \times 5 \text{ (倍量)} \\ &= 0.554 \text{ g/day} \end{aligned}$$

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10ml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100mL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。

$$\text{小柴胡湯} : 6.65 \text{ g} \div 60 \text{ kg} \times 5 \text{ (倍量)} \times 20 \text{ g (マウス平均体重)} = 11.08 \text{ g/day}$$

小柴胡湯 110.8 mgを水 100mL に溶解すればよい。

【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-Dawley 雄性ラット 6～10週齢 （日本チャールスリバー）

Sprague-Dawley 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。

【フェノバルビタールの投与】

Phenobarbital Sodium（和光）を精製水に溶かし、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。

【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。

【肝臓の抽出】

ラット腹部を開き、下行大静脈から生理食塩水を肝臓に送った。肝臓が十分に脱血されるのを確認し、肝門脈を切って肝臓を抽出した。直ちに液体窒素中で凍結して乳鉢で粉末状になるまでつぶし、 -80°C で保存して全 RNA の抽出の抽出に用いた。

【全 RNA の抽出】

Total RNA Extration Kit (Pharmacia Biotech) を用いた。

Extration Buffer 150 μL と β -mercaptoethanol 3 μL 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 μL を加えてさらに攪拌し、Cs TFA 500 μL を加えた。これを 4°C 、13000 rpm で 15 分遠心して上清を除き、Extrtion Buffer 75 μL 、Lithium Chloride Solution 175 μL 、Cs TFA 250 μL を加えた。 4°C 、13000 rpm で 10 分遠心して上清を除き、70% Ethanol 1 mL を加えた。 4°C 、12000 rpm で 10 分遠心し、上清を除いて DEPC 水 100 μL 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, 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 μg
DNase I Amp Grade	6 μL
<u>10×DNase I Reaction Buffer</u>	<u>6 μL</u>
DEPC treated water to	60 μL

室温で15分インキュベートし、さらに25 mM EDTA 6 μ 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 μ L、TE Saturated Phenol (ニッポンジーン) 120 μ Lを加えてよく攪拌し、12000 rpm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 μ L、99 % ethanol 150 μ 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 1 mL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 μ 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しており、増幅効率は $\pm 25\%$ 以内である。

A : 1×10^7 copies / μ L

B : 4×10^7 copies / μ L

C : 1.6×10^8 copies / μ L

D : 6.4×10^8 copies / μ 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 × RNA PCR buffer	1 ×	30 μL
dNTP (10 nM)	1 mM	15 μL
Rever Tra ase (100 U/μ L)	0.3 U/μ L	0.45 μL
oligo dT (2.64 pmol/μ L)	0.125 μ M	7.5 μL
total RNA (OD 260 換算値 100 ng/μ L)	3 ng/μ L	4.5 μL
RNA Competitor	5 %	7.5 μL

DEPC treated water to 150 μL

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 μL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 μL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 °C	10 min	
42 °C	30 min	1 cycle
72 °C	5 min	
5 °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×LA PCR buffer	1 ×	10 μL
LA taq (5 U/μL)	0.025 U/μL	0.5 μL
primer	2 %	2 μL
RT 液	20 %	20 μL

DEPC treated water to 100 μL

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 μL 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 μL 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°C 9 min

94°C 30sec

56°C 30sec 24cycle

72°C 30sec

72°C 5min

4°C ∞

【電気泳動】

PCR 反応終了後、反応液 25 μL に gel-loading buffer (ニッポンジーン) 6 μL を加え、そのうちの 15 μL 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 μL 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。

$$\begin{aligned} & \text{mRNA 推定発現量 [copies /ng total RNA]} \\ & = \text{RNA competitor の濃度 [copies /}\mu\text{L]} \times 5 [\mu\text{L}] / 300 [\text{ng total RNA}] \end{aligned}$$

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。

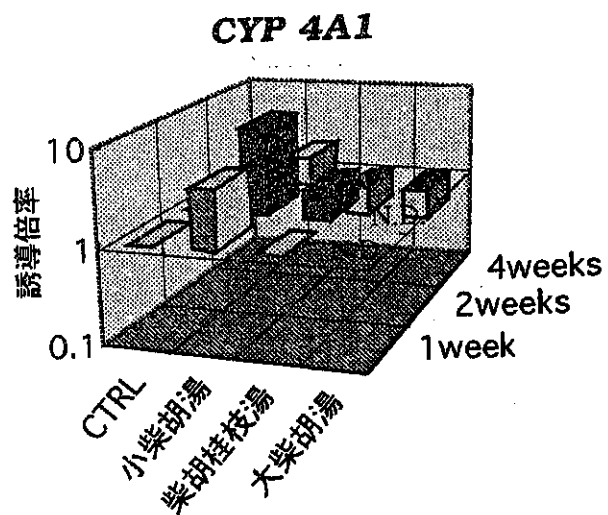
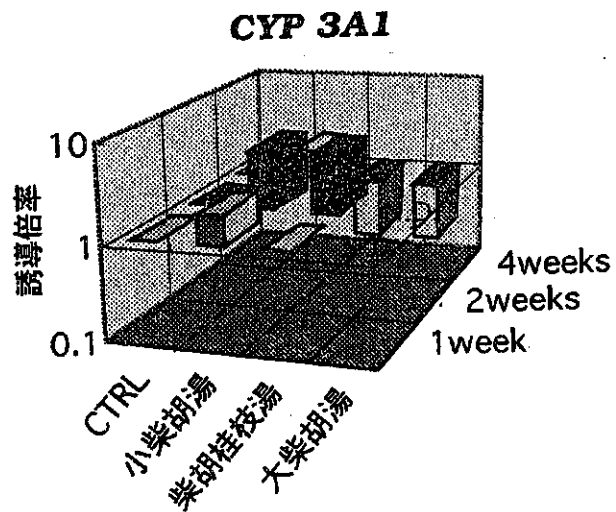
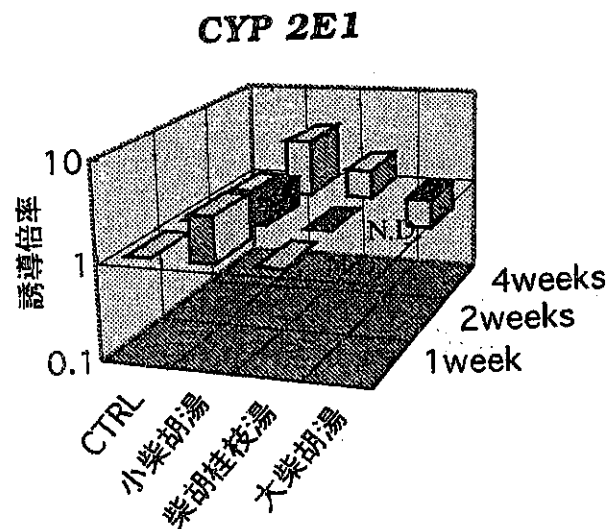
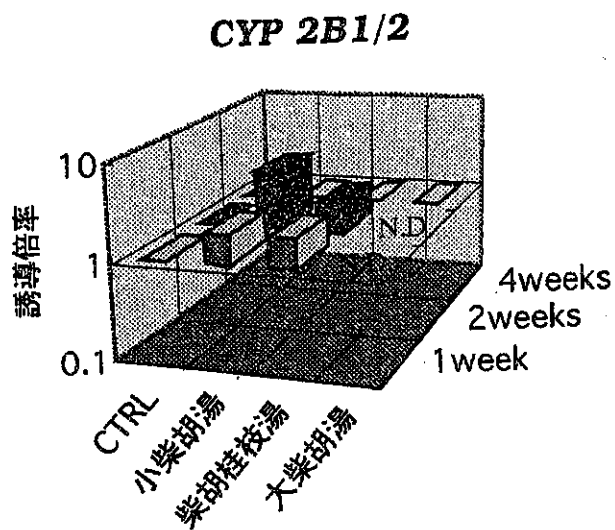
【 P450 各分子種の増幅サイズ】

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
CYP 2E1	378	474
CYP 3A1	456	581
CYP 3A2	141	117
CYP 4A1	275	345
Cyclophilin	320	266

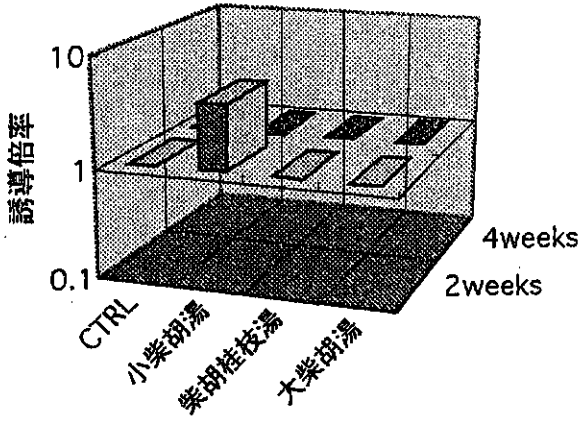
引用文献

- 1) 千葉 寛, "ファルマシア", vol.31, 992-996 (1995)
- 2) Amagaya S., Hayakawa M., Ogihara Y., Fujisawa K., *J Ethnopharmacol*, 25, 181-187 (1989)
- 3) 金本 郁男, 小太刀 真人, 堀内 勇, 小泉 保, 日本薬理学雑誌, 108, 772-776 (1988)
- 4) Hosoya J., Nagaoka H., Nakagawa Y., *Jpn J Hosp. Pharm.* 19 (1) 203-208 (1993)
- 5) 油田 正樹, 竹田 秀一, *Methods in kampo Pharmacology*, vol. 1, 76-84 (1997)
- 6) 相原 直樹, 田妻 進, 大屋 敏透, 胆道, 8, 9-13 (1994)
- 7) Oka H., Fujisawa K., Oda T., *Extara Medica, Amsterdam*, 232-237 (1984)
- 8) Kakumu S., Yoshida K., Wakita T., et al, *Int.J. Immunopharmac.*, 13, 141-146 (1990)
- 9) Yamashiki M., Kosaka Y., Nishimura A., et al, *Current Therapeutic Research*, 54, 86-97 (1993)
- 10) Yamashiki M., Asakawa M., Kosaka Y., et al, *J.Clin.Lab.Immunol.*, 37, 83-90 (1992)
- 11) 荻原 幸夫, 井上 誠, 能勢 充彦, *Fragrance Journal*, 5, 90-97 (1995)
- 12) 井上 誠, *Methods in kampo Pharmacology*, vol. 2, 61-69 (1997)
- 13) 佐藤昇志, 漢方医学, vol. 21, No.6 (1997)
- 14) 細川 康, *Therapeutic Res.*, 2, 31-36 (1985)
- 15) 大原 毅, 恩田 昌彦, 二川 俊二, 薬理と治療, 21, 4423-4434 (1993)
- 16) 立野 育郎, 平 栄, 多田 明, 薬理と治療, 19, 3363-3371 (1991)
- 17) R.S.Leeuwijn, *Arch.int.Pharmacodyn.*, 197, 382-384 (1972)
- 18) Ohnishi T., Yoneyama H., Hamamoto T., Ishida T., Takahara J., Ichikawa Y., *Am. J. Chin.Med.*, 24, 143-151 (1996)
- 19) 山本 郁男, 加藤 隆一, 鎌滝 哲也, "薬物代謝学", 東京化学同人 (1995)
- 20) 永田 清, 山添 康, "医学のあゆみ", vol.182, No.11, 803-811 (1997)
- 21) 鎌滝 哲也, 佐久間 勉, "ファルマシア", vol.33, No.1, 29-33 (1997)
- 22) Sakuma T., Kamataki T., *Drug News Perspectives*, 7, 82 (1994)
- 23) Sawada M., Kitamura R., Kamataki T., *Mut. Res.*, 265, 23-29 (1992)
- 24) Iwata H., Fujita K., Kushida H., Suzuki A., Konno Y., Nakamura K., Fujino A., Kamataki T.,

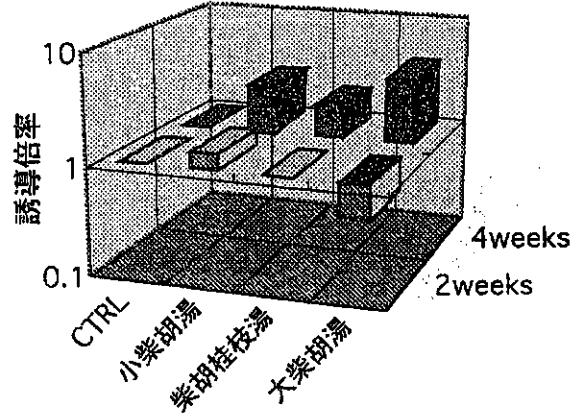


Appendix.1 各投与期間における mRNA 発現量の変動～ female

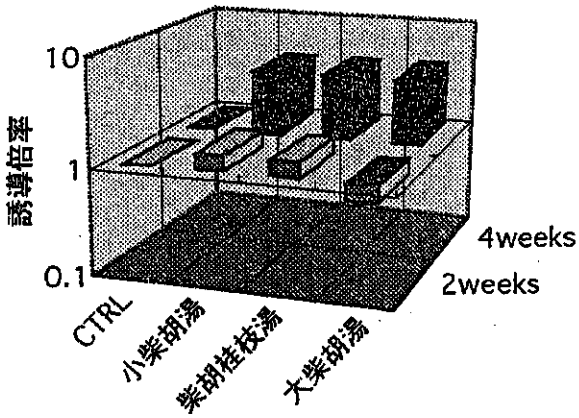
CYP 2B1/2



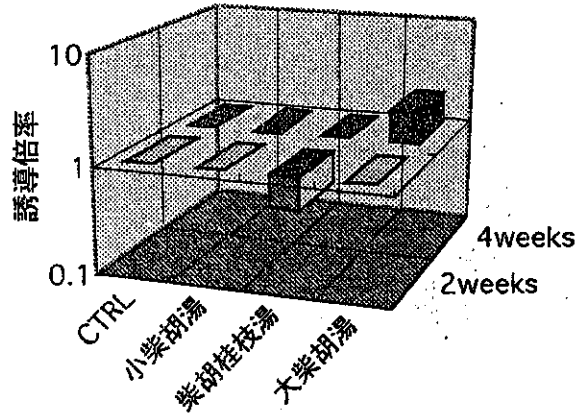
CYP 2E1



CYP 3A1



CYP 4A1



Appendix.2 各投与期間における mRNA 発現量の変動～ male

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所有機化学部室長

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の合成研究を行った。Aristolochic acids I, IIを出発原料としワンポット（one-pot）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の合成研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

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

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、

引き続き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

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

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Conformational Study of Heteropentapeptides Containing an α -Ethylated α,α -Disubstituted Amino Acids: (*S*)-Butylethylglycine (= 2-Amino-2-ethylhexanoic Acid) within Dimethylglycine (= 2-Aminoisobutyric Acid) Residues

M. Tanaka, M. Oba, N. Imawaka, Y. Tanaka, M. Kurihara, H. Suemune
Helv. Chim. Acta., **84**, 32-46 (2001)

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)

Synthesis, Biological Evaluation, and Conformational Analysis of A-Ring Diastereomers of 2-Methyl-1,25-dihydroxyvitamin D₃ and Its 20-Epimers.

K. Konno, T. Fujishima, S. Maki, Z. Liu, D. Miura, M. Chokki, S. Ishizuka, K. Yamaguchi, Y. Kan, M. Kurihara, N. Miyata, C. Smith, H. F. DeLuca, H. Takayama
J. Med. Chem., **43**, 4247-4265 (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)

A Concise and Efficient Route to 2 α -(ω -Hydroxyalkoxy)-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃: Remarkable High Affinity to Vitamin D Receptor

A. Kittaka, Y. Suhara, H. Takayanagi, T. Fujishima, M. Kurihara, H. Takayama
Org. Lett., **2**, 2619-2622 (2000)

Synthesis, Conformation, and Chemical Properties of New Mini Parallel Double-Stranded Peptides Conjugated with -Phe-Phe- and -Phe-Phe-X-Sequences

S. Kobayashi, H. Kobayashi, T. Yamaguchi, M. Nishida, K. Yamaguchi, M. Kurihara, N. Miyata, A. Tanaka,
Chem. Pharm. Bull., **48**, 920-934 (2000)

Molecular mechanics study on conformational analysis of homooligopeptides prepared from α,α -disubstituted amino acids.

M. Kurihara, M. Tanaka, N. Imawaka, H. Suemune and N. Miyata
Peptide Science 1999, 329-330 (2000)

Molecular mechanics study on conformational analysis of homooligopeptides prepared from α,α -disubstituted amino acids.

M. Kurihara, M. Tanaka, N. Imawaka, H. Suemune and N. Miyata
Peptide Science 1999, 329-330 (2000)

2 α -(ω -ヒドロキシアルコキシ) 活性型ビタミンD誘導体の効率的合成法
橘高敦史、須原義智、高柳仁、藤島利江、高山浩明、栗原正明
ビタミン, **74**, 190 (2000)

2. 学会発表

Computational Study on Conformation of Oligopeptides Prepared from α,α -Disubstituted Amino Acids

M. Kurihara, M. Tanaka, M. Oba, H. Suemune, N. Miyata
26th European Peptide Symposium (10-15 September 2000, Montpellier, France)

L-696,474のHIVプロテアーゼ阻害機構に基づいた新規阻害薬の設計と合成

栗原正明, 志茂雅敏, 梶谷亜沙子, 篠原秀美, 寒水壽朗, 宮田直樹
第26回反応と合成の進歩シンポジウム (2000年11月20,21日 大阪)

G. 知的所有権の取得状況

なし