

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14937

研究課題名（和文）オウゴン含有漢方処方による間質性肺炎を予防するための最適な生薬の配合研究

研究課題名（英文）Combination study of the optimal crude drugs to prevent interstitial pneumonia with Scutellaria Root-containing Kampo formulae

研究代表者

大嶋 直浩（OSHIMA, Naohiro）

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・研究員

研究者番号：30757133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、オウゴンの副作用を軽減できる新規オウゴン含有漢方薬の開発を最終目的に、生薬の組み合わせによる原因成分の抽出量並びに肺・肝細胞毒性の変動を評価した。その結果、オウゴンの肝細胞毒性を示す主要な成分はバイカリンであり、胆汁排出トランスポーターMRP2の阻害度で大きく変化することが明らかとなった。生薬の配合実験においては、オウバク、オウレン及びセッコウの各組み合わせでオウゴン由来バイカリンの含量が減少し、ハンゲやショウキョウの各組み合わせでバイカリン量が増加したことが明らかとなった。さらに、サイシンやショウキョウの各組み合わせではバイカリン量で説明できない肝細胞毒性の増強が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、オウゴンの副作用に関する原因成分が有効成分バイカリンであることを突き止め、バイカリンに關与する薬物排出トランスポーターの機能やエキス中のバイカリン含量で副作用が変化することを明らかにした。換言すれば、これらをうまく調節することで、オウゴンの副作用を効果的に制御できる可能性を示した。他方、オウゴンにショウキョウやサイシンを組み合わせると、バイカリンの含量だけでは説明できない毒性の増強が認められた。そのため、今後は毒性増強に起因する生薬を除いた漢方処方の検討を行い、安全性が担保された新規オウゴン含有漢方処方を創出していきたい。

研究成果の概要（英文）：Final goal of this study is a development of a new Scutellaria Root-containing Kampo medicine that can reduce side effects of Scutellaria Root to evaluate the changes in the causal constituent contents and pulmonary and hepatic cytotoxicity by combining the component crude drugs. As a result, we revealed that hepatotoxicity of Scutellaria Root can be explained by the baicalin content, which was affected by the function of bile-excretion transporter MRP2. Phellodendron Bark-, Coptis Rhizome-, or Gypsum-combinations decreased the baicalin contents in extracts whereas Pinellia Tuber- or Ginger-combinations decreased. Additionally, Pinellia Tuber- or Asiasarum Root-combinations showed the increased hepatotoxicity that can not be explained by the baicalin content.

研究分野：天然物化学

キーワード：オウゴン 副作用 改善策 バイカリン 含有量 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

漢方薬は、我が国で古くから独自に発展・使用されている医薬品である。最近では世界保健機関(WHO)がとりまとめている国際疾病分類(ICD)が改訂されたことから、今後漢方薬の使用は国外でも急激に増加することが予想されている。

1996年、漢方薬の安全神話は崩壊した。崩壊のきっかけは小柴胡湯による間質性肺炎の副作用報告に端を発する[築山ら, 日胸疾会誌, 1989]。その後、同様の報告が相次ぎ、緊急安全性情報が通達された[厚生省薬務局, 1996]。この一連の騒動は新聞などでも大きく取り上げられ社会問題となった。さらに原因究明の研究が進められ、小柴胡湯の構成生薬であるオウゴンが間質性肺炎を引き起こす起因生薬と推定され [富岡洋海, 最新医学, 1992]/ 西森ら, 日呼吸会誌, 1999]、その成分であるバイカレインが原因物質と考えられているものの、未だ全容解明には至っていない。

一般的に、オウゴン含有漢方処方による副作用(以下、副作用)が発症した場合、治療効果が得られていても即時に投薬を中止しなければならない[本間ら, 日東医誌, 1996]。投薬の中止により、一時的に軽減していた症状が再燃する可能性があるため、患者に身体的、精神的及び経済的に負担がかかることが懸念される。また、副作用の発症は気づきにくく、時間が経過すると重篤化して死亡する例もある[鈴木ら, 和漢医薬誌, 2000]。このようなことから副作用が発症する前にあらかじめ防止することが望まれるが、その解決策は現在のところ皆無である。したがって、本研究課題の核心をなす学術的問いは、オウゴンの副作用の原因は何か、そして副作用を改善できる方策はあるか、である。

2. 研究の目的

本研究は、オウゴンの副作用に関与する成分を解明すると共に、生薬の配合による原因成分の抽出量変化に関する情報を整備する。加えて、肺・肝細胞への毒性機序を明らかにし、オウゴンの副作用を制御するための手掛かりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞毒性実験

細胞毒性試験を Cell Counting Kit-8 で行った。即ち、種々の細胞株(1x10⁴細胞/well)を24時間培養後、サンプル(1 µL)を添加し再度5% CO₂存在下37 °Cで24時間インキュベートした。培養上清を除去しPBSで洗浄後、CCK-8溶液(10 µL)を添加しマイクロプレートリーダー(MTP-810, Corona Co.)で450 nmの吸光度を測定した。尚、MRP2阻害剤MK571 (100 µM, 1 µL)の前添加は、サンプル添加の2時間前に行った。

(2) 煎じ液の作製

生薬、生薬の組み合わせ(生薬重量比率は1 : 1)、もしくは漢方処方(日本薬局方の規定に準じた配合比)をそれぞれ計20 g量り取り、自動薬煎器に入れ、400 mLの精製水で約半量になるまで煎じ、pHを測定した。固液分離後の煎じ液を10分間、3000 rpmで遠心分離した後、上澄み液を凍結乾燥し熱水エキスとした。

(3) HPLCによるバイカレインの定量

調製したHPLC分析用試料を10 µLもしくは5 µL(試料濃度によって調整)注入し、逆相ODSカラム(4.6 mm i.d. x 150 mm)で分離し、バイカレインのピーク面積値(波長277 nm)を測定した。バイカレインの標品(98.0%)をメタノールに溶解後、希釈して検量線用試料を調整した。10-800 µg/mLの濃度範囲で(10, 50, 100, 250, 500, 800 µg/mL)、決定係数0.999の検量線を作成した。

HPLC条件は日本薬局方に規定されているオウゴン中バイカレインの定量法に従い、下記のように設定した。

溶媒 リン酸(1 : 146) / アセトニトリル混液(18 : 7)

流量 バイカレインピークが6 min前後に流出するよう調整

測定波長 277 nm

カラム温度 50 °C

試料1種につき3回分析を行い、その3回の平均バイカレインピーク面積値から作成した検量線を用いて定量した。

(4) 細胞内バイカレイン分析の前処理法

バイカレイン添加後の細胞上清を除去した後、PBSで3度洗浄し、1xLysis buffer Mを1 mL添加し、細胞を溶解した。細胞の溶解物(200 µL)にアセトニトリル(800 µL)を加えて懸濁した後、遠心分離機(KUBOTA3740, 3000g, 15分, 4 °C)で得られた上澄み液を注意深く分取し、窒素、40

で吹き付けた。得られた乾固物をメタノール(200 µL)に溶解し、内部標準物質(tricin (500 µg/mL))2 µLを加え、遠心フィルターに付し、遠心分離後(10000g, 20min)の溶液を分析用試料とした。

(5) バイカリン除去オウゴンエキスの予備調製

オウゴン熱水乾燥エキス(101.80 mg)を純水に懸濁し、ODS Hi-Flash カラム(20 x 75 mm)に付した後、純水 メタノール系にてメタノール 0% 100% のグラジエントモードを 20 分間、10 mL/min で行い、計 7 つのフラクション[Fr. 1; 53.3 mg, Fr.2; 3.7 mg, Fr. 3; 3.2 mg; Fr. 4; 19.7 mg, Fr. 5; 7.0 mg, Fr. 6; 2.9 mg, Fr. 7; 1.4 mg]に分離し、TLC パターンに基づき Fr. 2-4 以外をまとめてバイカリン除去オウゴンエキス (69.6 mg)を得た。

4. 研究成果

(1) オウゴンの肺・肝毒性に關与するバイカリンと有機アニオン性胆汁排出トランスポーターについて

オウゴンの副作用に關する原因成分を解明するため、オウゴン熱水エキスの肝細胞毒性を検討した。その結果、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 において 2.5 mg/mL, 5 mg/mL の濃度で有意な細胞毒性が現れ、濃度依存性も認められた。オウゴンの主成分であるバイカリンに着目し同毒性を検討したところ、500 µg/mL で有意な毒性が認められ、1000 µg/mL で 50%程度の生存率を示した。オウゴンエキス中のバイカリンを HPLC で定量した結果、バイカリンの含有率は 25%であり、エキス相当量のバイカリンがオウゴンエキスの毒性と一致したことから、オウゴンエキスの肝細胞毒性はバイカリンの含量で説明できることが示された。*in vivo*によるバイカリンの肝毒性を評価するため、マウスにバイカリン(40, 400 mg/kg)を腹腔内投与し、体重、ALT、AST 値を測定したところ、投与開始 6 時間で ALT 及び AST 値が有意に増加し、体重減少も認められたことから、バイカリンは高濃度で肝毒性を示すことが明らかとなった。次に、オウゴンエキスからバイカリンを除去し肝細胞毒性が軽減するか検討した。バイカリンが除去されたオウゴンエキスを分取 HPLC により簡易的に調製し、HPLC 及び TLC でバイカリンが除去されたことを確認した。同エキスの肝細胞毒性を検討したところ、オウゴンで認められた肝細胞毒性がバイカリンの除去により有意に減弱した。これらのことから、オウゴンの肝細胞毒性の本体はバイカリンであることが明らかとなった。

次に、肝細胞以外の細胞におけるバイカリンの毒性を評価した。イヌ腎臓尿管上皮細胞由来 MDCK 及びヒト肺胞基底上皮細胞膜 A549 で検討したところ、どちらも肝細胞より同濃度で強い毒性が認められた。特に MDCK は有機アニオン性胆汁排出トランスポーター MRP2 を発現していないため、バイカリンの毒性がより強く現れた原因が、MRP2 の欠如による細胞内バイカリン濃度の増加によるものと考えられた。そこで MRP2 の選択的阻害剤 MK571 を前添加しバイカリンの肝細胞毒性が増強するか確認したところ、バイカリン単独添加よりも強い毒性が認められた。その際の細胞内バイカリン濃度を測定すると、単独添加よりも約 2 倍増加した。これらのことから、バイカリンは主に MRP2 を介して細胞外排出されており、その阻害によって生じる細胞内バイカリンの蓄積が肝細胞毒性の増強に寄与することが明らかとなった。以上より、オウゴンの肝細胞毒性はバイカリンの含量及び MRP2 の発現量に大きく關与しており、これらを調節することでオウゴンの肝毒性を制御できることが示された。

(2) オウゴンの生薬間相互作用によるバイカリン含量と肝細胞毒性の変化について

小柴胡湯を構成する生薬の熱水抽出重量及び pH をそれぞれ測定した。その結果、最大値は 12.4 g (タイソウ)、最小値は 1.09 g (ハンゲ)、平均値は 5.27 g、中央値は 4.39 g、95 パーセンタイル値は 11.0 g であった。いずれのエキスも pH は 5~6 であった。次に、オウゴンを含む二味の組み合わせ(生薬比 1:1)について抽出を行った結果、エキス重量の最大値は 10.0 g (+タイソウ)、最小値は 3.44 g (+ハンゲ)、平均値は 5.48 g、中央値は 4.94 g、95 パーセンタイル値は 8.79 g であった。二味についても pH は 5~6 であり、単味生薬抽出量から算出した予測抽出量に対する割合はいずれも 94~115%であった。さらにバイカリン含有率は最大値 17.4% (+ハンゲ)、最小値は 11.4% (+カンゾウ)、平均値 14.9%、中央値 14.7%、95 パーセンタイル値は 17.2%であり、オウゴン単味のバイカリン含有率 14.6% (生薬重量補正済み)と顕著な差は認められなかった。しかしながら、二味のエキスの肝細胞毒性を評価したところ、オウゴン及びショウキョウの組み合わせでバイカリンの含有率だけでは説明できない肝細胞毒性の増強が認められた。ショウキョウのみでは顕著な肝細胞毒性が認められなかったことから、生薬を組み合わせることで毒性が増強したことが明らかとなった。今後は、小柴胡湯からショウキョウを除いた小柴胡湯去生姜の可能性について検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naohiro Oshima, Tomofumi Shimizu, Yuji Narukawa, Noriyasu Hada, and Fumiyuki Kiuchi,	4. 巻 72
2. 論文標題 Quantitative analysis of anti-inflammatory activity of orengedokuto : Berberine is responsible for inhibition of NO production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 706-714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-018-1209-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomofumi Shimizu, Nobuhiko Shibuya, Yuji Narukawa, Naohiro Oshima, Noriyasu Hada, and Fumiyuki Kiuchi	4. 巻 72
2. 論文標題 Synergistic effect of baicalein, wogonin and oroxylin A mixture: Multistep inhibition of the NF- B signalling pathway contributes to an anti-inflammatory effect of Scutellaria root flavonoids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 181-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-017-1129-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊谷朝日、大嶋直浩、羽田紀康
2. 発表標題 生薬の配合によるオウゴン由来フラボノイドの抽出量の変化
3. 学会等名 日本薬学会141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田 萌、大嶋 直浩、羽田 紀康
2. 発表標題 生薬の配合によるオウゴン由来フラボノイドの抽出量変化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------