

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：23903  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790748  
 研究課題名（和文）甘草による偽アルドステロン症発症メカニズムの解明とその予防のための検査方法の開発  
 研究課題名（英文）Developing mechanisms of pseudoaldosteronism by taking licorice and its preventive method.  
 研究代表者  
 牧野 利明（MAKINO TOSHIAKI）  
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授  
 研究者番号：80326561

研究成果の概要（和文）：漢方薬が引き起こす副作用のうち頻度が高いものに偽アルドステロン症がある。本研究では、偽アルドステロン症発症の個体差を説明するマーカーとして、甘草含有成分グリチルリチンの代謝物である3MGAに着目し、腎尿細管細胞内への移行性から偽アルドステロン症発症には本化合物が深く関わることを示唆する知見を得た。本研究から、漢方薬を服用する際に血液または尿中3MGAをモニタすることで、副作用発症を予防できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：One of the most incident adverse effects of kampo medicine is pseudoaldosteronism. This study revealed that 3-monoglucuronyl glycyrrhetic acid (3MGA), which is one of the metabolites of glycyrrhizin, the main constituent of licorice, is a substrate of organic anion transporters expressed in the membrane of renal epithelial cells, and can inhibit  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, but that glycyrrhetic acid, the main metabolite of glycyrrhizin can not. We can prevent to develop pseudoaldosteronism by monitoring the concentration of 3MGA in plasma or urine of the patients who take kampo medicine.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：漢方薬、副作用、偽アルドステロン症、トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

近年、優れた医薬品や医療技術の登場によって医学は目覚ましい発展をとげ、我が国は世界一の長寿国となった一方で、生活習慣病、神経性疾患やアレルギー性疾患などへの対応が医療上の課題となっている。また、少子高齢化に伴う国民総医療費の増大という課題もあり、疾患の重症化を未然に防ぐための予防医学の重要性が叫ばれている。それらを解決できる可能性として、疾患を体質改善的、根治的に治療できるとされている伝統医学が世界的に注目されており、アメリカ国立代

替医療センターをはじめ、膨大な研究費が伝統医学研究に費やされている。そのような中、我が国の伝統医学である漢方医学も一定の役割を果たすことが期待されており、現在では8割以上の医師が漢方薬を治療に取り入れているという調査結果もある。漢方薬の有用性を明らかにするための基礎・臨床研究も盛んに行われており、漢方医学は一定のエビデンスを持った治療法として国民医療の一部を実際に担うようになってきている。

一方、漢方薬の利用拡大とともに副作用報告も増大している。最も頻度の高い副作用は、

医療用漢方エキス製剤の約7割に配合されている甘草が引き起こす偽アルドステロン症である。その発症メカニズムは、甘草に含まれる glycyrrhizin (GL) の腸内細菌による代謝物である glycyrrhetic acid (GA) が腎尿細管において 11 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水酵素 (HSD2) を阻害することにより蓄積した cortisol が鉱質コルチコイド受容体を活性化した結果、低カリウム血症と高ナトリウム血症を引き起こされることによると考えられている。偽アルドステロン症は、発見が遅れると重篤な状態となことから、副作用をあらかじめ予防できるような医薬品情報が臨床現場から切実に求められている。

これまで筆者は、肝線維化モデルラットを用い、甘草含有成分およびその代謝物の体内動態を検討し、肝線維化ラットにおいてその代謝物のひとつである 3-モノグルクロニルグリチルレチン酸 (3MGA) の胆汁排泄が低下し、その血中濃度が高くなること、また、それを肝細胞内から胆汁中へ輸送するトランスポーターと推定される多剤耐性関連タンパク質 (Multidrug resistance protein 2, Mrp2) の発現低下との関連を推定した (Makino T. et al. *Drug Metab. Dispos.* 36(7): 1438-1443, 2008)。この知見は、甘草により偽アルドステロン症を起こした患者において、同量の甘草を服用したにもかかわらず偽アルドステロン症を起こさなかった患者と比較して、血中 3MGA 濃度が高かったという臨床報告 (Kato H., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, 1929-1933, 1995) と類似しており、肝疾患、血中 3MGA 濃度、甘草による偽アルドステロン症発症の間に強い関連性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、甘草による副作用である偽アルドステロン症の発症と、甘草含有成分 GL の代謝物 3MGA の血中濃度上昇、ならびに肝・腎におけるトランスポーター機能低下との関連を検討することにより、甘草による副作用発症メカニズムに 3MGA が関与することを明らかにし、副作用発症を事前に予防するための基礎的知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 使用動物

雄性 Wistar ラット、SD ラットまたは Eisai hyperbilirubinuria rats (EHBRs) を使用した。実験開始前は、25 $^{\circ}$  C、12 時間毎の明暗サイクル (AM7:00~PM7:00 明、PM7:00~AM7:00 暗) の動物飼育施設において、数日間の予備飼育を行った。

### 11 $\beta$ -HSD2 測定法

Wistar ラットの腎臓を摘出し、ミクロソーム画分を調製した。[1, 2, 6, 7- $^3$ H] cortisol, NAD $^{+}$  と GL、3MGA または GA を含む緩衝液で腎ミクロソーム画分を添加し、薄層クロマトグラフィを用いて生成した cortisone を分離し、放射活性を測定した。

### 細胞への遺伝子導入

ヒト腎臓 cDNA ライブラリーより、OAT1、OAT3 および OATP4C1 をクローニングし、哺乳類細胞発現ベクターに組み込んだ。このベクターをヒト腎由来 HEK293 細胞にリポフェクション法により導入して、一過性に発現させた。細胞に GA および 3MGA を 3~10 分間作用させ、細胞内に取り込まれた GA および 3MGA の量を LC/MS/MS を用いて測定した。各トランスポーターの機能は、Mock 細胞での取り込み量と比較することにより求めた。

### 血中、細胞中の GA および 3MGA 測定法

LC/MS/MS を用いて測定した。内部標準としてパラヒドロキシ安息香酸ブチルを用い、0.5% 酢酸/アセトニトリルを移動層とした ODS カラムにより各化合物を分離し、MRM モードで分子量 647.4 to 453.5 (3MGA)、471.3 to 91.0 (GA) および 195.2 to 139.0 (内部標準) を分析した。

### 統計処理

統計処理は、分散分析 (ANOVA) を行った後、Bonferroni 補正した多重 *t*-test を用い、0.05% 以下の危険率の時に統計学的に有意とした。

## 4. 研究成果

GL、3MGA、GA のラット腎ミクロソームにおける 11 $\beta$ -HSD2 阻害作用の濃度依存性を測定し、IC $_{50}$  値を算出した。その結果、それぞれ 2.2  $\mu$ M (GL)、0.26  $\mu$ M (3MGA)、0.32  $\mu$ M (GA) の値を得た。従って、GL と比較して GA と 3MGA は約 7 倍程度の 11 $\beta$ -HSD2 阻害作用をもつことが明らかになり、GA、3MGA ともに偽アルドステロン症の原因物質になり得ると推定された (図 1)。

次に、GA と 3MGA の腎排泄について検討した。まず、ウシ血清アルブミンおよび正常ラット血清を用いて、3MGA と GA のアルブミン結合率を限外ろ過法により求めたところ、どちらも 99.9% 以上の割合でアルブミンと結合した状態で存在していることが明らかになった。このことから、3MGA と GA は糸球体ろ過による排泄は行われにくく、尿中に検出された 3MGA は尿細管分泌により排泄される一方で、GA は尿細管分泌されない可能性が推測された。

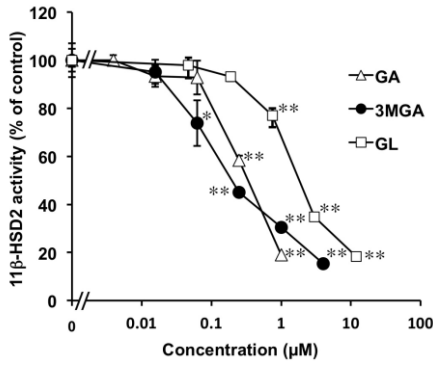


図1 GA、3MGA、GLのラット腎ミクロソームにおける *in vitro* 11β-HSD2 阻害作用  
データはサンプル無添加 (control) 群に対する割合の平均 ± 標準誤差 ( $n = 3$ ) で示し、Bonferroni-type multiple  $t$ -test により、control 群に対する危険率で、\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  を表記した。

そこで、ラット腎臓スライスに対する 3MGA および GA の取り込み実験を行った。3MGA と GA は腎組織表面にも多く吸着したため、取り込み実験を 4℃、37℃環境で行い、その取り込み量の差を比較した。その結果、GA の腎スライスへの取り込み量には温度による違いが認められなかったのに対して、3MGA は 4℃環境と比較して 37℃において有意に高い取り込み量が認められ、3MGA の腎組織への移行に能動輸送が関与していることが推測された。3MGA はアニオン性の化合物であることから、腎尿細管上皮細胞の側底膜側に発現し有機アニオンを輸送するトランスポーターである hOAT1、hOAT3 および OATP4C1 を強制発現させた HEK293 細胞を用いた取り込み実験を行ったところ、3MGA はそれらのトランスポーターの基質となり、その  $K_m$  値はそれぞれ 49.0 μM、30.1 μM、41.8 μM であったが、GA においては mock 細胞への取り込み量との差は認められなかった (図2)。

すなわち、血液中の GA は大部分がアルブミンに結合した状態で存在しており糸球体ろ過により排泄されることはほとんどなく、また GA を輸送するトランスポーターが尿細管上皮細胞に存在していないため尿細管分泌もされにくいために、尿中に検出されない。これに対して、3MGA は GA と同様、糸球体ろ過によっては尿中排泄されないものの、有機アニオントランスポーターを介した尿細管分泌により尿中へ排泄されることが推測された。

GA と 3MGA の腎ミクロソーム画分を用いた 11β-HSD2 阻害作用は、生理的な濃度でも十分に起こりうるものであった。しかし、実際の生体内で 11β-HSD2 は尿細管細胞内に発現しており、細胞内に移行できる化合物しかそれを阻害することは出来ないと推定される。GA

と 3MGA は血液中では大部分がアルブミン結合型で存在しており単純拡散では細胞内へ移行することが出来ず、3MGA は有機アニオントランスポーターを介した能動輸送により細胞内に移行できるが、GA は尿細管細胞内へは分布しにくい。従って、実際の生体内では 11β-HSD2 を阻害しにくい、と考えられた。

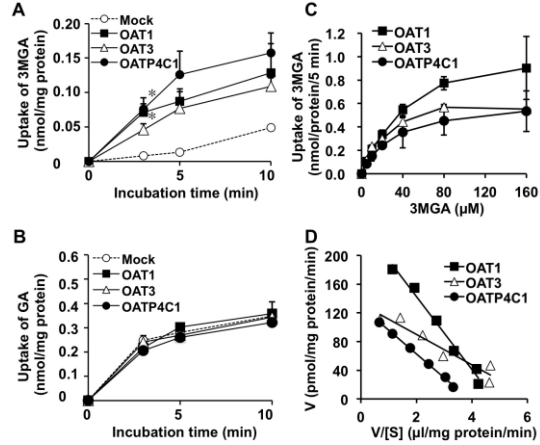


図2 OAT1、OAT3、OATP4C1 を HEK293 細胞に一過的に導入した細胞に対する 3MGA および GA の取り込み量

各トランスポーターならびに空プラスミド (Mock) を導入した細胞への 3MGA (A) および GA (B) の取り込み量の経時変化。3MGA で細胞を 5 分間処理した時の各トランスポーターでの輸送量 (C) と Eadie-Hofstee plots を用いたその速度論的解析 (D)。データは平均 ± 標準誤差 ( $n = 3$ ) で示し、Bonferroni-type multiple  $t$ -test により、mock 群に対する危険率で、\* $P < 0.05$  を表記した

最後に血液中に 3MGA を蓄積する遺伝的背景を持つ Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR) に GA を 100 mg/kg/日 で 16 日間経口投与したところ、正常ラットでは血中および尿中には 3MGA は検出できないとともに、腎ミクロソーム画分における 11β-HSD2 活性の低下は認められなかったのに対して、EHBR では偽アルドステロン症の主要な症状である血清カリウム濃度は変化しなかったものの、有意な血中および尿中 3MGA 濃度の増加と腎ミクロソーム画分における 11β-HSD2 活性の有意な低下が認められた。

以上のことから、甘草による偽アルドステロン症の真の原因物質は GA ではなく、何らかの肝障害に伴って血中、尿中に出現する 3MGA である可能性が強く推測された。このことから、血中または尿中 3MGA をモニタリングすることで、漢方薬を服用する際の偽アルドステロン症発症を予防できる可能性が強く示唆された。

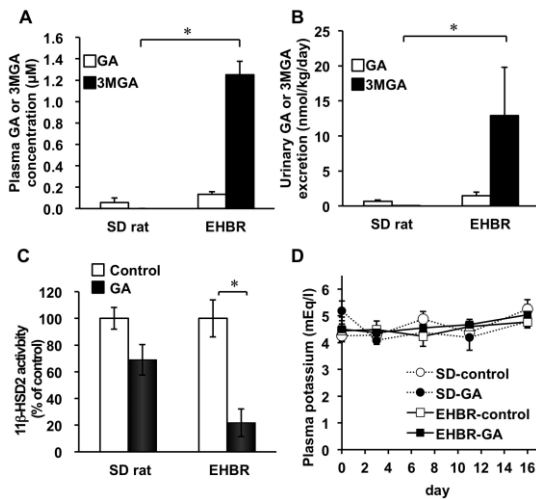


図3 正常ラット (SD) および EHBR に GA を 16 日間連続投与した時の生化学的変化

ラットに GA を 16 日間連続経口投与した後の血漿および尿中 GA、3MGA 濃度 (A、B) および腎ミクロソームでの 11β-HSD 活性、血漿中カリウム濃度の経時的変化 (D)。データは平均 ± 標準誤差 ( $n = 3$ ) で示し、Bonferroni-type multiple  $t$ -test により、mock 群に対する危険率で、\* $P < 0.05$  を表記した

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

(1) 牧野利明、大嶽信弘. 漢方薬の副作用～偽アルドステロン症のメカニズムとその発症予防策について. *ファルマシア* 47(5): 403-407, 2011 (査読あり)

(2) Toshiaki Makino, Kyoko Okajima, Rie Uebayashi, Nobuhiro Ohtake, Katsuhisa Inoue, Hajime Mizukami. 3-Monoglucuronyl-glycyrrhretinic acid is a substrate of organic anion transporters expressed in tubular epithelial cells and plays important roles in licorice-induced pseudoaldosteronism by inhibiting 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 2. *J. Pharm. Exp. Ther.* 342(2), 297-304, 2012 DOI : 10.1124/jpet.111.190009 (査読あり)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 森永 紀、牧野利明、大北剛司、水上 元、正山征洋. 甘草の副作用、偽アルドステロン症発症推定原因物質 3MGA の ELISA による定量法の開発. 日本薬学会第 133 回年会、2013, 3, 30、横浜

② 岡島恭子、牧野利明、井上勝央、大嶽信弘、水上 元. 甘草の副作用、偽アルドステロン

症発症メカニズムに関する研究. 日本生薬学会第 58 回年会、2011, 9, 24、東京

〔図書〕 (計 1 件)

Toshiaki Makino, Nobuhiro Ohtake  
Mechanisms of licorice-induced pseudoaldosteronism, one of the most common side effects of traditional Japanese kampo medicine and traditional Chinese medicine

“Traditional Medicine – New Research”  
ed. Yoshiharu Motoo in p.135-146.

Nova Science Publishers, New York, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 利明 (MAKINO TOSHIAKI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号 : 8 0 3 2 6 5 6 1

(2) 研究分担者

なし