

平成22年 5月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790475

研究課題名（和文）漢方薬による副作用発症機序とトランスポーターとの関連

研究課題名（英文）Relationship between the adverse effect of kampo medicine and transporters

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）：

甘草には偽アルドステロン症という副作用があり、その原因はグリチルレチン酸（GA）が腎尿細管に存在する 11 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（HSD）II を阻害することによるとされている。しかし、GA は腎尿細管上皮細胞へ輸送されず、その代謝物である 3・モノグルクロニルグリチルレチン酸（3MGA）が有機アニオントランスポーターを介して能動輸送された。従って、この副作用は、GA ではなく 3MGA による可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：

Glycyrrhizae Radix has the adverse effect to cause pseudoaldosteronism. It is considered that pseudoaldosteronism is induced by glycyrrhizic acid (GA) that inhibits 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase II in renal tubular epithelial cells. The present study reveals that GA cannot pass through the membrane of epithelial cells, but 3-monoglucuronyl glycyrrhizic acid (3MGA) can actively be transported through the membrane by organic anion transporters. It is suggested that the adverse effect of licorice would be occurred not by GA but 3MGA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学、甘草、偽アルドステロン症、有機アニオントランスポーター

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、神経変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、世界的に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7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など、その有用性を明らかにするための基礎・臨床研究が盛んに行われるようになっており、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おり、現在では、14処方に間質性肺炎、27処方に薬剤性肝障害に対する注意が勧告されている。その原因はアレルギーのような患者の特異体質によると言われ、一定の確率で発現すると考えられている。とくに間質性肺炎では時に重篤な副作用となるため、それを恐れて漢方薬の利用が躊躇される事態も起こっており、有効利用が妨げられている現状もある。

近年、さまざまな物質を細胞内外へと輸送するトランスポーターが各種クローニングされ、その役割が明らかになって来つつある。その中で、慢性肝疾患患者や慢性腎不全患者においては、血液中から胆汁あるいは尿へ物質を輸送するトランスポーターの機能が低下し、排泄物が蓄積することで全身的な影響が現れることが示唆されている。漢方薬で副作用を生じた患者の多くは、実際に肝疾患あるいは腎疾患を患っていたことから、漢方薬に含まれる何らかの成分の体外への排泄が悪化したことにより、その成分が体内に蓄積した結果、副作用が生じた可能性がある。

これまで我々は、肝線維化モデルラットを用い、漢方薬で最も頻度の高い副作用原因成分である、甘草含有成分グリチルリチン(GL)の体内動態を検討し、肝線維化ラットではそ

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た結果、血中濃度が高くなることを明らかにし、それを輸送すると考えられるトランスポーターMrp2の発現低下との関連を推定した。甘草による偽アルドステロン症発症原因は、含有成分グリチルリチンの代謝物、グリチルレチン酸(GA)が腎尿細管細胞における11 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを阻害するためと言われている(Ploeger B., et al., Drug Metab. Rev., 33, 125-147, 2001ほか)が、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)を支持するものであり、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、漢方薬が副作用を起こす背景に肝疾患あるいは腎疾患にともなうトランスポーター機能不全があることを推定し、漢方薬が引き起こす副作用の原因物質の同定およびその副作用発症メカニズムを解明し、漢方薬による副作用発症を事前に防止するための医薬品情報を医療現場へ提示することを最終的な目標とし、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性を明らかにし、甘草による副作用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

ラット腎ホモジネートおよび腎スライス切片を用いて、11 β -HSD に対するGL、3MGA、GAの阻害活性について検討した。酵素活性は、コルチゾール50 μ Mを添加し37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした後のサンプルを回収し、生成したコルチゾンの濃度をLC/MS/MSで定量することにより測定した。

ラット腎スライス組織内へのGL、3MGA、GAの能動輸送について検討した。腎スライスを5%ウシ血清アルブミン(BSA)存在下

で GL、3MGA、GA 溶液に浸し、4 または 37 で一定時間インキュベートした後、腎スライスをホモジナイズし、スプチリシンでタンパク質を分解した後、LC/MS/MS でホモジネート中の GL、3MGA、GA 含量を定量した。腎組織内への能動輸送による移行は、4 でインキュベートしたのものに対する 37 での取り込み量で評価した。

ヒト有機アニオントランスポーターである OAT1、OAT3 および有機アニオン輸送ペプチド OATP4C1 をヒト胎児腎由来 HEK293 細胞にリポフェクション法により発現させ、GL、3MGA、GA を含む培養液で 30 分間、インキュベートした後の細胞中の各化合物含量を LC/MS/MS で定量した、細胞内へ移行量は、mock 細胞との差で求めた。

4. 研究成果

ラット腎ミクロソームに対する 11 β -HSD II 阻害活性は、3 化合物のうちでは GA が最も高く、続いて 3MGA、GL の順となった。IC₅₀ 値は 17.4 μ M (GL)、0.46 μ M (3MGA)、0.13 μ M (GA) であった (図 1)。

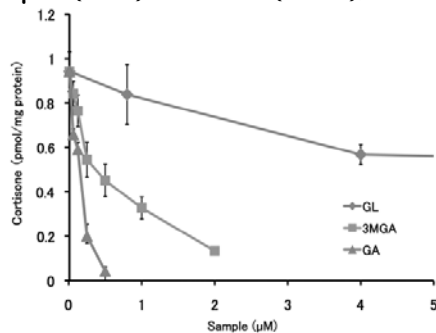


図 1 ラット腎ミクロソームにおける GA、3MGA、GL の 11 β -HSD II 阻害作用

一方、ラット腎スライス切片における 11 β -HSD II 阻害活性は、GL が最も強く、続いて 3MGA、GA の順となった (図 2)。

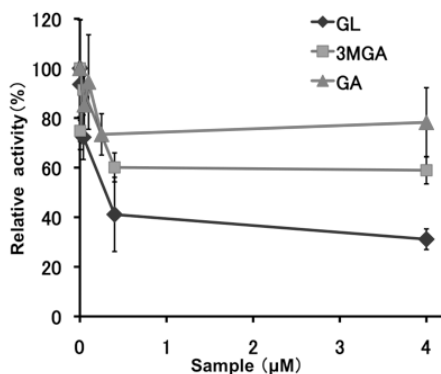


図 2 ラット腎スライスにおける GA、3MGA、GL の 11 β -HSD II 阻害作用

ミクロソームと腎スライスにおける酵素阻害活性の違いには、細胞内への各化合物の移行量に違いがあると推定し、腎スライスに含まれる各化合物の量を検討した。その結果、GA の腎スライスへ能動輸送については移行を検出できなかったのに対して、3MGA と GL は能動輸送された。この結果は血液中から尿細管上皮細胞内への輸送を反映していると推察され、GL と 3MGA は尿細管分泌される可能性が高く、GA は可能性が低いと考えられた。

これらの結果をもとに、腎尿細管上皮細胞の基底膜側に発現している有機アニオントランスポーターである OAT1、OAT3、OATP4C1 の遺伝子を組み込んだ HEK293 細胞への GL、3MGA、GA の取り込み実験を行い、各物質輸送に関するトランスポーターの同定を試みた。その結果、GL は OATP4C1 で、3MGA は OAT1、OAT3、OATP4C1 で能動的に輸送されるが、GA はそらのトランスポーターの基質にはならないことを明らかにした (図 3)。

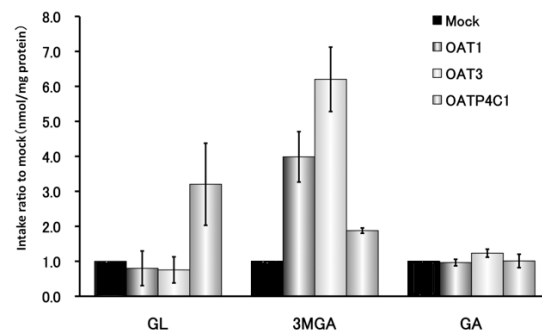


図 3 OAT1、OAT3、OATP4C1 遺伝子導入細胞における GA、3MGA、GL の細胞内への移行

本研究では、GL およびその代謝物の一種である 3MGA は、OAT1、OAT3、OATP4C1 などのトランスポーターによって腎尿細管上皮細胞内へ輸送されるが、GA は輸送される可能性が低いこと明らかにし、生体内における 11 β -HSD II 阻害活性は GA よりもむしろ 3MGA や GL で起きやすいことを示唆する結果を得た。この結果は、Kato らが唱えている 3MGA 原因説を支持するものである。正常人が甘草を経口摂取した場合、血液中には主に GA が存在し、3MGA が存在することはない。しかし、何らかの肝障害により 3MGA の胆汁排泄を担う MRP2 の機能低下が見られる場合には、3MGA は肝臓から血液中へ移行するために血液中に 3MGA が存在するようになると考えられている (Makino T et al., Drug Metab. Dispos., 36, 2008, 1438—1443)。本研究により、生体内においては 3MGA が GA よりも強い 11 β -HSD II 阻害活性を示すことが明らかとなったことから、甘草含有処方服用している患者におい

て血液中 3MGA 濃度の上昇と、偽アルドステロン症の発症とが大きく関連していることが示唆された。

漢方薬は一般的には経口的に摂取し、甘草に含まれる GL は腸内細菌により GA に代謝された後に血液中へ吸収されることから、血液中に GL が現れることはない。従って、甘草を経口摂取する場合には、偽アルドステロン症の原因物質として GL を考慮する必要がないと考えられてきた。しかし、甘草から調製される肝臓疾患用薬「強力ミノファーゲン C[®]」などのグリチルリチン製剤は注射剤であることから、その場合には血液中に大量に GL が存在することになる。この薬剤は症状によって 30 日以上連続投与されることもあり、安定時の血中濃度は GL として 1~6 μM となる。本研究では、生体内で GL が 3MGA よりも強い 11 β -HSD 阻害活性を示す可能性を示唆しており、1~6 μM という濃度は実験において GL が阻害活性を示すのに十分な濃度であるため、GL が原因物質となり、偽アルドステロン症を発症する可能性がある。事実、同製剤でも副作用として 0.4%程度の頻度で偽アルドステロン症を発症しており 3、重大な副作用として注意が喚起されている。一方、Kato らの報告では、偽アルドステロン症を発症した患者 10 名中、GL 注射剤によるものは 2 名しかおらず、対象となった非発症患者は 11 名中 10 名が GL 注射剤となっていることから、甘草または GL による偽アルドステロン症発症頻度は、経口摂取のほうが高いことが予想された。しかし、このデータは対象患者数が少なく、10~11 名の患者数では経口摂取または静脈内投与による発症頻度の差を決定することは困難である。本研究から、GL 注射剤による高い血液中の GL 濃度によっても腎尿細管上皮細胞において 11 β -HSD は阻害されることが十分に予測されることから、甘草の経口摂取剤と同様、同等の副作用予防に関する注意の喚起は必要と考えられる。

一方、これまで甘草およびグリチルリチン製剤の体内における真の活性成分とされていた GA は、今回検討した尿細管細胞に主に発現している OAT1、OAT3 および OATP4C1 の基質とならず、実際に、トランスポーターを介した取り込みが見られなかった。従って、単純拡散で尿細管上皮細胞内へ移入する GA によってのみ 11 β -HSD 阻害作用が引き起こされることが予想された。しかし、GA 自身は比較的強い 11 β -HSD 阻害活性をもつため、血液中にわずかに存在する遊離型の GA が単純拡散により尿細管上皮細胞内に移入したことによる 11 β -HSD 阻害活性が、生体内において偽アルドステロン症発症に寄与する可能性が全くないとは言えず、今後の詳細な検討が求められる。

以上の結果から、漢方薬に含まれる甘草による副作用、偽アルドステロン症の発症は、これまでその原因とされてきた GA ではなく、肝障害などにより血中に出現した 3MGA が腎尿細管細胞内へ有機アニオントランスポーターによって輸送されることにより、11 β -HSD II を阻害することにより引き起こされることが十分予想された。本研究から、甘草含有漢方薬を服用している患者の血清または尿中に含まれる 3MGA の濃度を測定することにより、偽アルドステロン症の発症を事前に予防することが可能となると考えられる。今後の研究開発が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Toshiaki Makino, Nobuhiro Ohtake, Akito Watanabe, Naoko Tsuchiya, Sachiko Imamura, Seiichi Iizuka, Makoto Inoue, Hajime Mizukami. Down-regulation of a hepatic transporter Mrp2 is involved in alteration of pharmacokinetics of glycyrrhizin and its metabolites in a rat model of chronic liver injury. Drug Metab. Dispos., 査読有、36(7), 2008, 1438—1443.

[学会発表](計1件)

上林理絵、牧野利明、井上勝央、水上元、大嶽信弘、グリチルリチンおよびその代謝物の腎における 11 β -HSD II 阻害作用の比較、第 130 回日本薬学会年会、2009, 3, 26-28、岡山

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

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：80326561

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし