

薬害をひきおこした薬草

正山 征洋
(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

Herbal medicine inducing harmful effects

Yukihiro SHOYAMA

(Faculty of Pharmaceutical Science, Nagasaki International University)

Abstract

It has been well known that Aristolochiaceae species induce an endemic nephrosis that a toxic principle is aristolochic acid. In order to set up a sensitive assay system a monoclonal antibody (MAb) against aristolochic acid has been prepared. Anti-aristolochic acid MAb can open the eastern blotting for aristolochic acid resulted that only aristolochic acid appeared on a polyether-sulphon-membrane. We succeeded immunohistochemical analysis of aristolochic acid in mice kidney tissues after injection of aristolochic acid using anti-aristolochic acid MAb. The immunoprecipitation technique using anti-aristolochic acid MAb has been applied to isolate, purify and concentrate a target protein, α -actinin-4 from human kidney cell line in conjunction with mass spectrometry.

Key words

Aristolochiaceae, aristolochic acid, nephrosis, monoclonal antibody, eastern blotting, targeting protein, α -actinin-4

要 旨

古来よりウマノスズクサ科植物による腎炎が知られておりその原因物質はアリストロキア酸で有ることが明らかになってきた。アリストロキア酸に対する高感度な分析法を開発するために、モノクローナル抗体の作成を行った。それを用いてアリストロキア酸に対するイースタンブロッティング法を開発した。本法では多くの含有成分の中からアリストロキア酸のみが検出出来る。マウスにアリストロキア酸を投与して腎組織をモノクローナル抗体で染色するとアリストロキア酸の分布を確認出来た。さらにヒト腎細胞にアリストロキア酸を添加して培養し、抗アリストロキア酸モノクローナル抗体と免疫沈澱法によりターゲットタンパクを精製し、加水分解後マスペクトルにより α -アクチニン-4と同定した。

Key words

ウマノスズクサ科、アリストロキア酸、腎炎、モノクローナル抗体、イースタンブロッティング、ターゲットタンパク、 α -アクチニン-4

1. はじめに

風土病をおこしていた植物から成分を抽出し医薬品とした例や、古くから薬草として用いられていた植物が実は風土病と関係があったもの等が散見出来る。

前者の例として良く知られたものが麦角であ

る。麦角はバクカキンが小麦に感染し子実体(麦角)を形成し、そのものが小麦に混入し手足の壊疽や流産、精神異常等を引き起こすもので、中世のヨーロッパでは度々麦角中毒がおきていたことが知られている。その後1930年代になって麦角からエルゴメトリン等が抽出分離さ

れ、末梢神経の収縮が強い事が判り、止血、産後の止血、片頭痛等の治療に用いられている。麦角と付随した化合物として、エルゴタミン等のインドールアルカロイドを分解し少しばかり合成して得られたのが LSD で1937年の事である。1943年このものが強烈な幻覚作用を持つことが明らかにされ、以後裏の世界で麻薬として君臨している。

一方、後者の例として本稿の当該植物のウマノスズクサ科植物である。バルカン地方の風土病として腎炎が多くバルカン腎炎と呼ばれていた。また、中国においても中医薬を飲んで腎炎を惹起することがあり、中国ハーブ腎炎 (Chinese herbs nephropathy) と呼ばれた。この腎炎は長く原因が分からなかったが近年その正体が明らかとなり、ウマノスズクサ科植物のアristolochia酸と言う成分が腎炎を誘発することが明らかになった。本稿ではアristolochia酸に対するモノクローナル抗体 (MAb) の作成とそれをういた分析法の開発、生体内でのアristolochia酸の分布状態の解明、さらに目的タンパクの同定等について言及する。

2. アristolochia酸含有生薬

アristolochia酸 I, II の構造式を図1に示す。

構造式からフェナンスレン骨格にニトロ基が付いているのが特徴で如何にも毒性が有りそうな構造をしている。しかし属名の *Aristolochia* は aristos 最上の、と lokia 分娩に由来しており、安全な分娩が行えるよう服用したものと予想される。現在陣痛促進剤として用いられていること

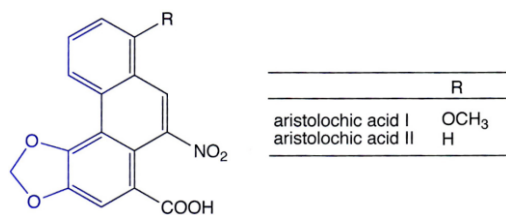


図1 アristolochia酸 I と II の構造式

に通じるところがある。本化合物はウマノスズクサ科植物特有の成分として含まれており、属としては *Aristolochia*, *Asiasarum*, *Asarum* 等で種としてはマンシュウウマノスズクサ *Aristolochia manshuriensis* (関木通)、ウマノスズクサ *A. debilis* (馬兜鈴)、*A. fangchi* (広防已) 等 (図2) で、それぞれ茎、果実、根の部位を薬用とする。これらの内日本にも自生しているウマノスズクサの地上部が図3である。パイプ状の花が開き、花の内部には基部に子房があり、筒状部分の内部に雄しべが連なっている。この形状により昆虫が花の中に入ると出難くなり、動き回るので受粉が十分に行われる仕組みとなっている。

3. 薬害を起こした中医薬処方や健康食品

中国の医学が仏教の伝来と共に、中医薬の原点とも言える『黄帝内経』、『神農本草経』、『金匱要略』、『傷寒論』等が一気に渡来した。それら医学書が受容され日本の文化にも馴染んで来るのが平安時代になってからであり、その集大成とも言える丹波康頼により著された全30巻からなる『医心方』(983年)で、当時の朝廷に献上され以後医薬学の分野に長く影響を与えた。中医薬は江戸時代へ向かって徐々に独自の発展を遂げ、江戸時代前期に頂点に達したと言われる。因みに漢方と言う言葉がスタートしたのは江戸時代で、漢とは中国を指し、方は方技(医学)のことで、中国医学を指してつけた日本製の漢語と言う事になる。一方、中国の処方では中医薬と呼んでいる。

漢方薬で竜胆瀉肝湯や当帰四逆加呉茱萸生姜湯と言う処方があり、前者は泌尿器系に熱を持ち、尿量が少なく排尿時に痛みを伴うような症状の時適用されることが多い処方である。本処方には熱を取る竜胆(リンドウの根)や黄芩(コガネバナの根)、利尿作用を持つ沢瀉(サジオモダカ; 水生植物の根茎)や木通(アケビの蔓)、車前子(オオバコの種子)等が配合される。これらの中で木通が問題を起こした生薬である。漢方では木通はきっちりとアケビの蔓を

用いることになっているが、中医薬では上述の関木通が使われている。このためアリストロキア酸の作用により間質性腎炎や尿毒症、ひいては腎がんに至った患者も有ったと聞く。

一方、当帰四逆加呉茱萸生姜湯は桂枝湯を主体とした処方で、冷えに対応するためによく用いられる処方である。中国では本処方にも関木通が配合されており、日本へ輸入された中国製当帰四逆加呉茱萸生姜湯によって上記の様な症状が起これり薬害へと発展したことは記憶に新しい。

先に述べた Chinese herbs nephropathy はベルギー等ヨーロッパ諸国でおこったもので、中

国産の防己黄耆湯をやせ薬として用いた人が腎炎を起こした。日本では防己はツツラフジ科のオオツツラフジの茎を用いるが、中国では上記の広防己を用いていた。

話は変わるが本学附属薬用植物園では長年ジャコウアゲハを飼育してきた。その幼虫はウマノスズクサ科植物のみを食べてアリストロキア酸を体内に貯めて外敵から身を守っている。図4がその様子である。ジャコウアゲハの成虫はウマノスズクサ科植物に卵を産み幼虫の食料確保に努めている。我々には猛毒であるアリストロキア酸を武器にしている昆虫がいると言う事から自然の偉大さに頭が下がる思いである。



図2 左から関木通、馬兜鈴、広防己の生薬写真



図3 ウマノスズクサ（馬兜鈴）の地上部

4. アリストロキア酸に対するモノクローナル抗体の作成とイースタンブロッティングによる検出

以上の様に毒性の強いアリストロキア酸を感度よく検出する方法としてモノクローナル抗体(MAb)を選んだ。アリストロキア酸自身は抗原性を持たないので、キャリアタンパクを結合して抗原性を持たせる必要がある。図5に示す通りの反応によりハプテン-キャリアタンパクコンジュゲートを作成した。このものをマウスに投与し、抗体値が上がったところで脾臓を取り出し、ミエロマ細胞と合体させハイブリドーマを作成。アリストロキア酸を認識する

ハイブリドーマを選び、無血清培地で培養し抗アリストロキア酸 MAb を得る¹⁾。

得られた MAb を用いてイースタンブロッティングにて発色したのが図6である¹⁾。

右は各種ウマノスズクサ科植物を薄層クロマトで展開してUVランプで蛍光により発色したパターンである。多くのスポットが現れてアリストロキア酸を同定することは困難であるが、左のイースタンブロッティングによればアリストロキア酸のみが発色するので、植物の種類によって含量が異なることが良く解る。なお、二つのスポットが見られるがこれは構造が類似しているアリストロキア酸 I と II (図1) 両者に MAb

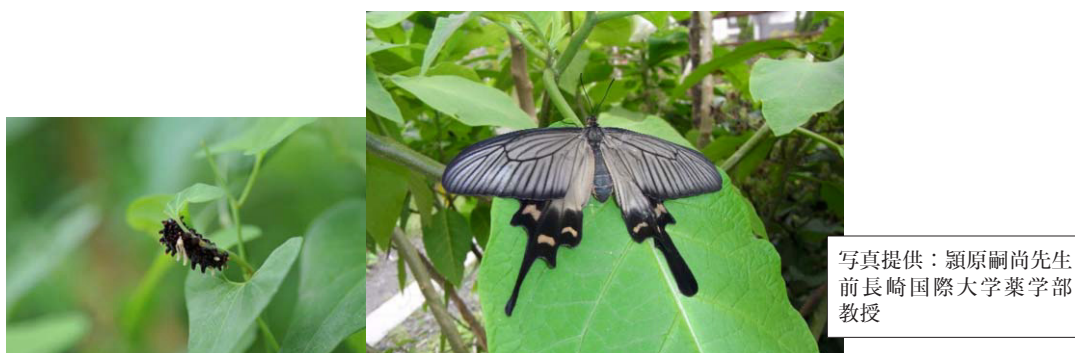


図4 ウマノスズクサを食べているジャコウアゲハの幼虫(左)と成虫(右)

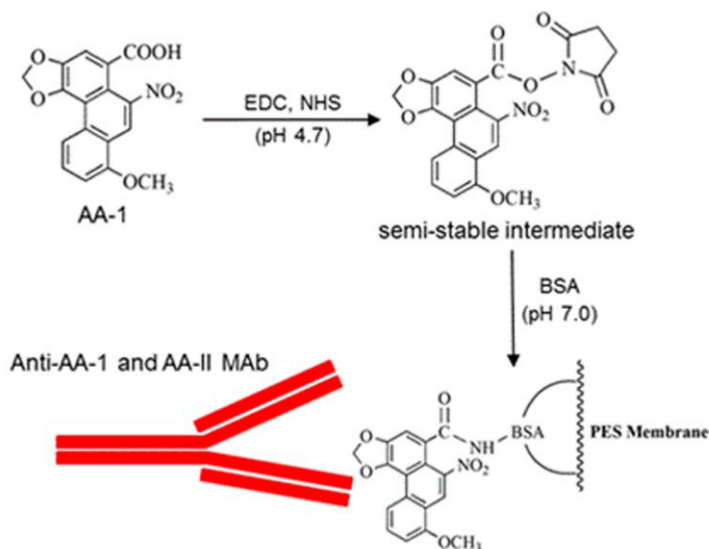


図5 抗アリストロキア酸 MAb 作成のための合成とイースタンブロッティングの染色機構

が認識しているためである¹⁾。

5. 腎臓におけるアリストロキア酸の分布

アリストロキア酸が腎炎を惹起することは自明であるが、MAbを用いた特異的染色はなされていないので本稿では上記の抗アリストロキア酸 MAb を用いて腎組織における分布を調査した。アリストロキア酸をマウスに腹腔内投与し、5日後に腎臓を摘出し組織を抗体染色した。右が抗体染色で矢印の近辺が染色している。一方、コントロール（左）では何ら発色は起こっていない。これらの結果、アリストロキア酸は腎組織に集積し腎毒性を発現することが推察される²⁾。

腎毒性を惹起するメカニズムについての詳細は明らかになっていないが、腎組織の部位による分布が明らかになったので今後集積組織の詳細な組織学的研究が進みメカニズムの解明がなされることに期待したい。

6. アリストロキア酸のターゲットタンパク

アリストロキア酸が腎組織に集まることが明らかになったので、次はどのようなタンパク質と結合するかが重要になってくる。そこでヒトの腎細胞培養液にアリストロキア酸を添加して培養を行った。取り出した細胞を破碎し酵素で消化した液に抗アリストロキア酸 MAb を添加して生じた沈殿を分離した。沈殿したタンパク

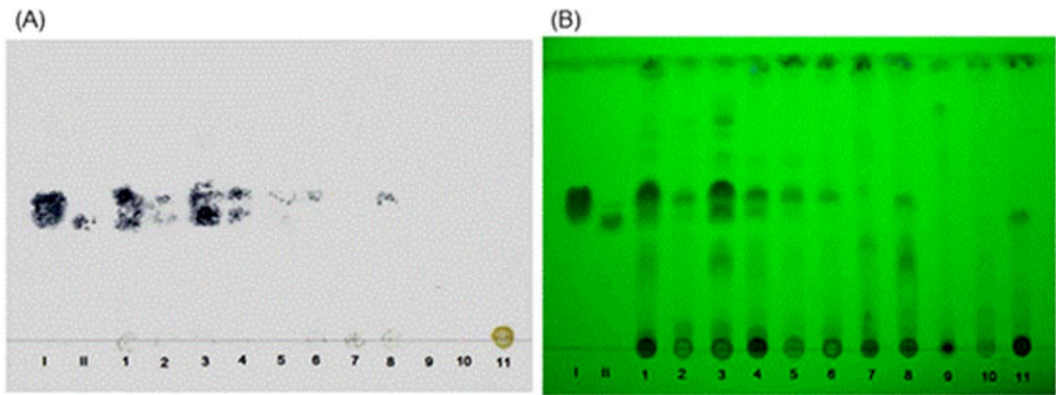


図6 抗アリストロキア酸 MAb によるウmannosukkosai植物のイースタンブロッティング(A)と各種ウmannosukkosai植物を薄層クロマトで展開後 UV ランプで蛍光発色(B)

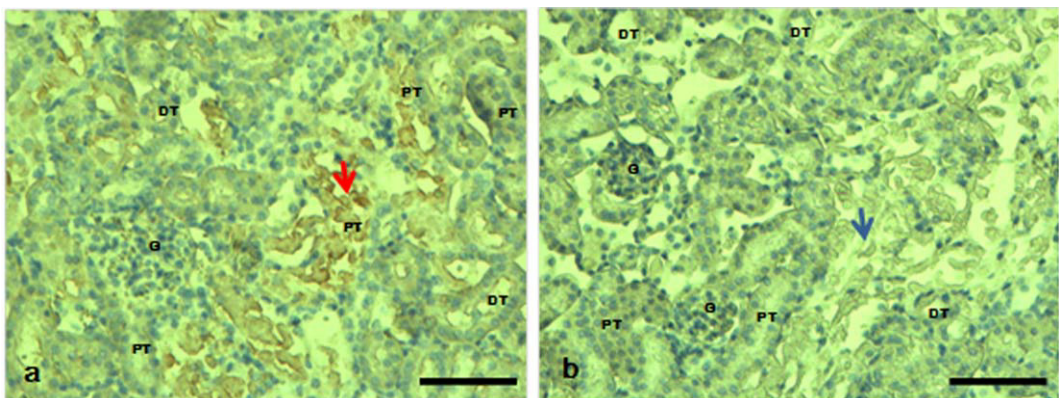


図7 抗アリストロキア酸 MAb による腎臓における染色(a)とコントロール(b)抗体染色により矢印周辺が染色しているが(a)コントロールでは染色は認められない。

質をタンパク消化酵素で消化し液体クロマトーマススペクトロフラフィーによりアミノ酸の分析を行い、ターゲットタンパクは分子量100KDaの α -アクチニン-4であることを突き止めた。³⁾ アクチニン類は構造タンパクであるので、アリストロキア酸がアクチニンと結合し腎炎を誘発するものと考えられる。アリストロキア酸と α -アクチニン-4とのドッキングシュミレーションによるとリジン、アルギニン、ロイシン、プロリン等の結合したポケット部にアリストロキア酸が結合する可能性が高いことが示された。アリストロキア酸のターゲットタンパクの特定と結合部位の推定が出来たことによりアリストロキア酸による腎炎の全体像が明らかになるのも近いだろうと考えている。また、ターゲットタンパクの特定により腎炎の発症メカニズムにも示唆を与えるものと期待している。

7. おわりに

腎炎の原因物質の一つとしてアリストロキア酸をご紹介した。アリストロキア酸はありふれた化合物では無く、ウマノズクサ科植物に限定して含まれている。中国では現在でもウマノズクサ科に属する数種の生薬を中医薬に配合して臨床で用いている。上記の植物は地上部にはアリストロキア酸を含むが地下部には含量が極めて低いことが明らかにされた。中国ではいまだに中医薬に配合しているところをみると短期間使用するものであって、長期には用いられないとのことで、古来よりこの原則が守られてきたものと考えられる。しかし健康食品や中医薬であってもやせるために長期間服用することで腎毒性が発現したものと考えられる。

本稿ではアリストロキア酸に対する特異的なMAbを作成し、それを用いたアリストロキア酸に対する新しい検出法イースタンブロッティ

ング法を提示した。この手法が主として中国において簡便なアリストロキア酸検出の資となればと願っている。また、アリストロキア酸のターゲットタンパクについても触れた。恐らく本タンパクの発見により今後関連するタンパクの特定が進み、腎毒性の全体像が明らかになるだろうと期待しているところである。

ジャコウアゲハについて少し触れたが、ウマノズクサ科植物が発する極めて低濃度の精油成分を、恐らく数分子の濃度と思われるが、察知して植物にたどり着き、卵を産み、幼虫が植物を食べてアリストロキア酸を体内に貯めて敵からの防御に応用していることは、どれ程の時間をかけて進化したのかロマンに満ちた物語である。また、食草が絶滅すると周りにいかに多くの植物が存在しようとも一種の蝶が絶滅するという、決められたルールが明らかになってしまうと儚い思いに駆られる。

引用文献

- 1) XW. Li, O. Morinaga, M. Tian, T. Uto, J. Yu, MY. Shang, X. Wang, SQ. Cai, Y. Shoyama. (2013) 'Development of an eastern blotting technique for the visual detection of aristolochic acids in Aristolochia and Asarum species by using a monoclonal antibody against aristolochic acids I and II' *Phytochem Anal.* 24, pp. 645-653.
- 2) XW. Li, S. Yokota, D. Wang, X. Wang, Y. Shoyama, SQ. Cai (2014) 'Localization of aristolochic acid in mouse kidney tissues by immunohistochemistry using an anti-AA-I and AA-II monoclonal antibody' *Am J Chin Med.* 42, pp. 1453-1469.
- 3) D. Wang, XW. Li, X. Wang, HR. Tan, Y. Jia, L. Yang, MY. Shang, F. Xu, XX. Yang, Y. Shoyama, SQ. Cai. (2016) *Am J Chin Med.* 44, pp. 291-304.