

漢方薬の適正使用とセルフメディケーションの推進
ーアスリートの視点からー

九州大学大学院 薬学研究院 生薬学分野 准教授

さかもと せいいち
坂元 政一

漢方薬の適正使用とセルフメディケーションの推進 ーアスリートの視点からー

九州大学大学院 薬学研究院 調査・研究 実施者氏名 坂元 政一

【要旨】

近年、漢方薬やサプリメントに配合される生薬を原因とする意図しないドーピング「うっかりドーピング」が問題視されている。本研究では、生薬に含まれる禁止物質のうち、ヒゲナミン (HM) に着目した。HM は、非選択的な β 刺激作用に由来する種々の薬理活性を示す天然由来のアルカロイドであり、2017年より世界アンチドーピング機構の禁止表国際基準に記載され、注目を集めている。一方、コクラウリン (CR) は、HM のメチル化誘導体であり、HM の類似構造を持つが禁止物質ではない。しかし、CR を含有する生薬エキスを経口投与したラットの尿中から HM が検出された [1]。そこで、CR 単体でも同様に HM が代謝物として検出されるかをマウス及びヒト肝ミクロソーム (HLM) を用いて検討した結果、マウス尿中及び HLM の両方において CR が HM に代謝されることが判明した。このことは、HM のみならず CR の摂取がドーピング違反を引き起こす可能性を示唆した。そこで、免疫アッセイ及び LC-MS/MS 分析により HM 及び CR 含有生薬のスクリーニングを行った結果、それぞれ 13 種類の生薬が HM や CR を含むことを見出した。本成果は、漢方薬が必要なアスリート及びその関係者に有益な情報を提供し、それらの適正使用及びセルフメディケーションの推進の一助となる。

1、調査・研究目的

ヒトにおける CR 単体の代謝を精査すると同時に、医療用漢方エキス製剤 128 種類を用いた網羅的スクリーニングにより HM や CR (図 1) を含有する生薬を探索し、関連医薬品等の適正使用及びセルフメディケーションの推進に資する研究を遂行する事を目的とした。

2、調査・研究方法

2-1 試薬、材料等

(S)-HM 臭化水素酸塩 (98%) および (S)-CR 塩酸塩 (98%) は、Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada) から購入した。HML (lot PL050H-A, lot PL050H-A, mixed gender pool from 50 donors) は Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA) から購入した。

候補生薬 18 種類中の HM と CR の存在を確認するため、各種生薬は、ウチダ和漢薬 (Tokyo, Japan)、栃本天海堂 (Tokyo, Japan)、及び小島漢方 (Osaka, Japan) から入手した。

2-2 HLM を用いた CR の代謝研究

マウス (BALB/cCrSlc) に CR を経口投与した場合、尿中代謝物として HM が検出されたことからヒトにおいても同様の代謝が起こるか HLM を用いて精査した。第 I 相反応及び第 II 相反応における CR の代謝物は LC-MS/MS (ExionLCTM LC System; X500R QTOF System, SCIEX) を用いて検出した。

HLM による CR の代謝は、HLM と CR を 37℃ でインキュベートすることによって調べた。2.0 mM の MgCl₂ を含む 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4, 100 μL) 中で、HLM (0.5 mg/mL) と UDPGA (5 mM) を用いて、それぞれ第 I 相反応と第 II 相反応を行った。反応は、1.3 mM NADPH を含む補酵素溶液を加えることで開始した。0, 1, 3, 6, 12 及び 24 時間後に、同量のアセトニトリルを加えて反応を終了させた。その後、反応溶液を遠心分離 (12,000 rpm, 5 分間, 25℃) し、その上清を LC-MS/MS 分析のサンプルとした。

2-3 LC-MS/MS による候補生薬中の HM 及び CR の検出

これまでに HM 及び CR を認識する MAAb E8 を用いた LFA [2] 及び ELISA [3] を開発しており、これらを漢方エキス製剤に応用することで、HM や CR を含む生薬の探索を行った。その結果、最終的に候補生薬 18 種類を選抜した。そこで、これら候補生薬 18 種類中の HM 及び CR の存在を LC-MS/MS 分析により精査した。

生薬候補は、電動ミルを用いて粉碎し、ステンレス製ふるい (300 μm) に通した。生薬粉末 (1.0 g) には、メタノール (10 mL) を加え、20 分間超音波処理することで成分の抽出を行った。その後、遠心分離 (12,000rpm, 5 分間, 4℃) を行い、上清を回収した。この操作を繰り返し、2 回分の上清の混合物を抽出液とした。抽出液 (200 μL) に蒸留水 (800 μL) を加え、遠心分離 (12,000rpm, 5 分間, 4℃) した後、コスモニーフィルター W (4 mm, 0.45 μm, ナカライテスク, Kyoto, Japan) でろ過したものを LC-MS/MS 分析によるサンプルとした。また、内部標準としてジアゼパム-d₅ を標準溶液に添加した。

3、調査・研究成果

3-1 HLM を用いた CR の代謝研究

ヒト細胞を用いた肝薬物代謝酵素の *in vitro* 活性を調べるために、第 I 相反応と第 II 相反応に寄与する HLM を用いた。まず、CR を HLM とインキュベートし、0, 1, 3, 6, 12 及び 24 時間後に LC-MS/MS を用いて代謝物を分析した。HM、CR 及びそれらのグルクロン酸抱

合体に焦点を当てた場合、第 I 相反応では、CR の量が経時的に減少するにつれて、HM の量が相対量が増加することが観察され、この過程で O- 脱メチル化が起こることが示唆された (図 2(A))。一方、第 II 相反応では、CR から HM とそのグルクロン酸抱合体が生成されることが判明した (図 2(B))。これらの結果より、CR は主に CYP と UGT によってそれぞれ HM と CR- グルクロニド (CR-G) に代謝され、次いで UGT によって遊離の HM から HM- グルクロニド (HM-G) が生成されることが示唆された。

3-2 LC-MS/MS による候補生薬中の HM 及び CR の検出

先行研究において HM 及び CR を含有する可能性が高いことが示唆された 18 種類の生薬の抽出サンプルを調製し、LC-MS/MS による HM 及び CR の検出を行った (Table 1)。結果の信頼性を確保するために、各生薬はそれぞれ異なる 2 社から購入し、主に栃本天海堂製からなる生薬群を Group A、主にウチダ和漢薬製からなる生薬群を Group B と定義した。各標品との溶出時間、モノアイソトピック質量、MS/MS スペクトル上の特徴的なフラグメントイオンの一致を検出の基準とし、目的物の検出に成功した場合を○で表した。そして、各標品と溶出時間及びモノアイソトピック質量が一致するピークが観察されなかった場合を n. d. で表した。13 種類の生薬より HM が検出され、そのうち 6 種類については、本研究において初めてその含有を明らかにした。CR については、13 種類の生薬より検出され、そのうち 9 週類については、本研究において初めてその含有を明らかにした。

また、HM 及び CR が検出された生薬について、LC-MS/MS による目的物の定量を行った結果、各生薬中の目的化合物の含有量は、購入元の企業間で最大 20 倍以上の差があった。これは、生薬が天然物であるために生じる、天候、産地及び収穫時期などの違いが影響していると考えられる。

4、考察

本研究より、HM のメチル化誘導体である CR について、ヒト体内で HM へと代謝されることが示唆された。禁止物質には該当しない CR の摂取によりドーピング違反となる可能性が浮上したことから、WADA の禁止表国際基準に記載されている HM を指標としたドーピング検査自体が破綻している可能性も示唆された。加えて、今回 CR を高濃度に含有する生薬が複数同定されたことより、HM の禁止表国際基準への記載の妥当性については、精査が必要であろう。また、HM 及び CR を含有する生薬の新規同定結果をはじめとする、本研究における成果は、生薬学的に重要かつアスリートの意図しないドーピングの防止に貢献することが期待される。

5、まとめ

近年、健康志向や補完代替医療への関心の高まりとともに漢方薬やその原材料である生薬の需要が増加の一途をたどっている。それに伴い、アスリートが漢方薬を服用する機会が増えており、漢方薬の適正使用に対する関心も高まっている。漢方薬は、婦人科系疾患や一部の原因不明の疾患では劇的に効果を発揮するものの、情報不足により、アスリートがその使用を全面的に避ける傾向にある。現在、多くの漢方薬が一般用医薬品となっており、漢方薬に対する正しい理解が、セルフメディケーションの推進に直結する。本研究成果は、漢方薬が必要なアスリート及びその関係者に有用な情報を提供するものであり、それらの適正使用に貢献する。

6、調査・研究発表(口頭又は誌上発表)

Sakamoto, S.*, Osaki, K., Abe, H., Tayama, Y., Tsuruta, A., Nuntawong, P., Yodsurang, V., Koyanagi, S., Morimoto, S.

“Higenamine- and Coclaurine-Containing Crude Drugs in Kampo Medicines: Potential for Unintentional Doping and the Status of Higenamine Under WADA Regulations”, Under submission

7、引用文献

- [1] Shang, J.; Chen, X. L.; Li, L.; Zhang, H.; Yang, L.; Yang, B.; Cao, L.; Wang, Z. Z.; Xiao, W. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34* (12), e4965.
- [2] Nuntawong, P.; Ochi, A.; Chaingam, J.; Tanaka, H.; Sakamoto, S.; Morimoto, S. *Drug Test. Anal.* **2021**, *13* (4), 762-769.
- [3] Nuntawong, P.; Tanaka, H.; Sakamoto, S.; Morimoto, S. *Planta Med.* **2020**, *86* (11) 760-766.

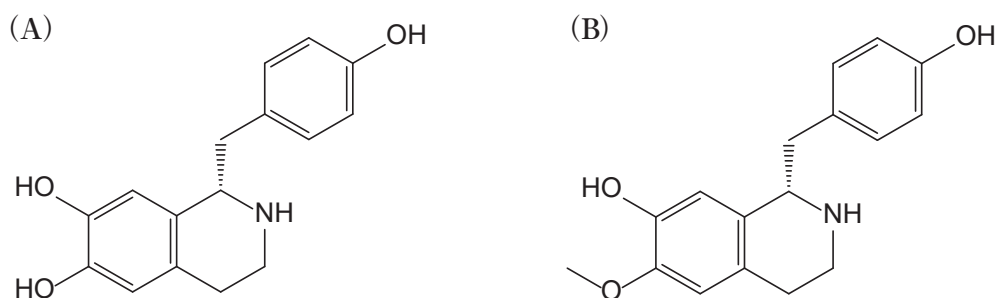


図1 HM (A) 及び CR (B)

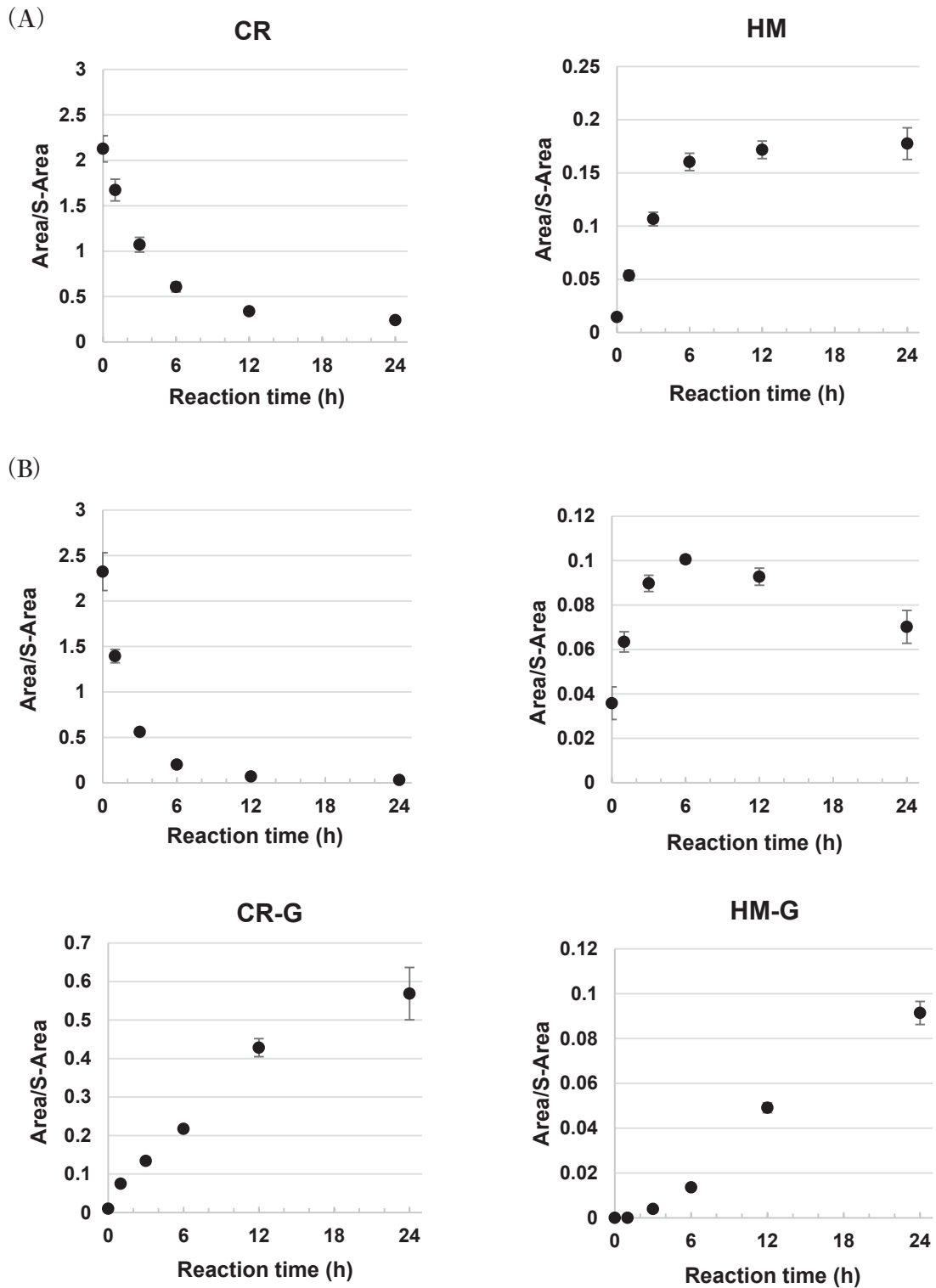


図2 HLMによるコクロウリンの *in vitro* 代謝 (A) 第I相および (B) 第II相反応

CRをHLMとインキュベートし、0、1、3、6、12及び24時間後の代謝物を、HM、CR及びそれらのグルクロン酸抱合体に基づいてLC-MS/MSで定量した。

Table 1 LC-MS/MS による候補生薬中の HM 及び CR の検出

Candidate crude drug	Group A (栃本天海堂 他)		Group B (ウチダ和漢薬 他)	
	HM	CR	HM	CR
Crude drug A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Crude drug B	○	○	○	○
Crude drug C	○	○	○	○
Crude drug D	○	○	○	○
Crude drug E	○	○	○	○
Crude drug F	○	○	○	○
Crude drug G	○	○	○	○
Crude drug H	○	○	○	○
Crude drug I	○	○	○	○
Crude drug J	n.d.	○	n.d.	○
Crude drug K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Crude drug L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Crude drug M	○	○	○	○
Crude drug N	○	○	○	○
Crude drug O	○	○	○	○
Crude drug P	○	n.d.	○	n.d.
Crude drug Q	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Crude drug R	○	○	○	○

6 種類の HM 含有生薬及び 9 種類の CR 含有生薬が新規に確認された。