

甘草の副作用、偽アルドステロン症の発症メカニズム

—真の原因物質18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfateの可能性

牧野 利明¹⁾、森永 紀²⁾、石内 勘一郎¹⁾、吉野 鉄大³⁾、小川 恵子⁴⁾、南澤 潔⁵⁾、渡辺 賢治³⁾、並木 隆雄⁶⁾

1) 名古屋市立大学大学院薬学研究科 生薬学分野

4) 金沢大学医学部附属病院 漢方医学科

2) 第一薬科大学薬学部 和漢薬物学分野

5) 亀田総合病院 東洋医学診療科

3) 慶應義塾大学医学部 漢方医学センター

6) 千葉大学医学部附属病院 和漢診療科

漢方薬による副作用で頻度の高い甘草による偽アルドステロン症のメカニズムについて検討した。甘草に含まれるglycyrrhizin (GL) は、腸内細菌でglycyrrhetic acid (GA) に代謝されたのち吸収され、その後、肝臓で硫酸抱合反応を受けて18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate (GA3S) へと代謝、多剤耐性関連タンパク質 (MRP) 2で胆汁排泄される。このMRP2機能不全時にGA3Sは血中に現れ、有機アニオントランスポーターを介して尿細管上皮細胞内にある2型11 β ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (11 β -HSD2) を阻害する。一方、GAは細胞内へ移行することができないことから、生体内では11 β -HSD2を阻害しにくい。このGA3Sが偽アルドステロン症の真の原因物質である可能性が高いと予想される。

Keywords 偽アルドステロン症、甘草、副作用、MRP2機能不全、18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate

はじめに

漢方薬による副作用のうち比較的頻度の高いものとして、甘草による偽アルドステロン症があげられる。その発症については大きな個人差があり、どんなタイプの人か、いつ副作用を生じるのか、全く予測がつかない。ほとんどの偽アルドステロン症症例は軽症で済み、甘草の摂取を中止すれば緩解するが、発見が遅れた場合や、高齢者の場合では重症化し、ときに不整脈などをきたして命に関わることもさえある。その発症は投与量と投与期間にある程度依存するが、少量でも発症する例や長期にわたって服用し続けても発症しない例もあることから、発症の背景に特異的な体質の要因があることも推測されている。

甘草はマメ科のウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) またはスペインカンゾウ (*G. glabra*) の根およびストロンを基原とする生薬である。また甘草はその名の通り甘く、食品や菓子類に対する天然甘味料としても使用されている。ヨーロッパでは甘草 (リコリス) を古くから食材として使用してきており、リコリスの摂取により高血圧や浮腫を患うケースが多発していたことが報告され、1968年にはこれらの症状を呈する症候群として甘草による偽アルドステロン症 (licorice-induced pseudoaldosteronism) と命名され、単なる副作用にとどまらず一つの疾患として認識されるようになった¹⁾。その徴候は、高血圧や浮腫を伴うにも関わらず低レニン血症、低アルドステロン血症を認め、尿細管におけるカリウムと水素イオンの分泌量増加を伴うために低カリウム血症、代謝性アルカローシスを認め、さらに低カリウム血症が重度であればミオパチーによ

る筋肉痛やしびれなどを認めたり、不整脈のリスクとなることもある。

甘草による偽アルドステロン症発症メカニズムに関するこれまでの知見

甘草は、主要成分としてglycyrrhizin (GL) を含む (図1)。GLは肝機能改善薬として内服剤だけでなく注射剤としても使用されている。GLはそのアグリコン部であるglycyrrhetic acid (GA) 1分子に対して、3位の水酸基に2分子のグルクロン酸が結合した構造を持つトリテルペノイド配糖体である。甘草を経口投与した場合、GLはその糖部の水溶性の高さのために消化管上皮を透過しにくく、大腸に生息する腸内細菌によって糖部が加水分解されたGAとして吸収されることから、内服した場合の薬理活性本体はGAであると考えられている (図1)。

甘草に副腎皮質ホルモン様作用があることは古くから知られており、かつてはGLやGAそのものが鉱質コルチコイド受容体に結合することによって偽アルドステロン症を起こすと考えられていた。しかし、それらの受容体への親和性は本来の基質であるアルドステロンと比較して著しく低く、GLやGAの実際の血液中の濃度で受容体に直接結合して作用していることは否定されている。鉱質コルチコイド受容体に対しては、副腎皮質ホルモンであるコルチゾールがアルドステロンと同程度の親和性を持つ。しかしコルチゾールは腎尿細管細胞の細胞質内では2型11 β ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (11 β -HSD2) によりコルチゾンに分解され、コルチゾンの同受容体への親和性は低い

ことから、コルチゾールの鉱質コルチコイド作用は抑制されている²⁾。甘草に含まれるGAとGLには11 β -HSD2を阻害する作用があり、GAの阻害活性はGLと比較して約200倍強い³⁾。また、甘草を摂取したときに血液中に現れる化合物はGLではなくGAであることから、甘草による偽アルドステロン症発症の原因物質はGAと考えられていた。

しかし、以上のメカニズムからは、偽アルドステロン症発症の個体差を説明することはできない。1995年にKatoらは、甘草含有漢方処方や強力ネオミノファーゲンシー®などのGL製剤を使用した患者において、偽アルドステロン症を発症した患者と発症しなかった患者の血漿を比較した結果、偽アルドステロン症を発症しなかった患者では検出することのできなかった3-monoglucuronyl-glycyrrhetic acid (3MGA、図1)を、発症した患者の血漿においてのみ検出した⁴⁾。このことから、血液中に3MGAを代謝産物として出現させるという個人の体質が偽アルドステロン症の発症と関連していることが推測された。

偽アルドステロン症と3MGAとの関係

筆者らは、ラットをコリン欠乏食で飼育することにより肝線維症モデルを作製し、GAと3MGAの体内動態を検討した⁵⁾。肝線維症モデルラットでは正常群と比較して血漿中3MGA濃度の上昇が認められたが、GAの血漿中濃度には差が認められなかった。また肝線維症モデルラットでは尿中3MGA排泄量も正常群と比較して高かったが、尿中GA排泄量は両群とも検出限界以下であった。グルクロン酸抱合体を胆汁中へ排泄するトランスポーターである多剤耐性関連タンパク質 (Multidrug resistance protein 2、Mrp2) の発現量を肝線維症モデルラットで確認したところ、正常群と比較して低値であった。

次に、3MGAと偽アルドステロン症発症との関連を明

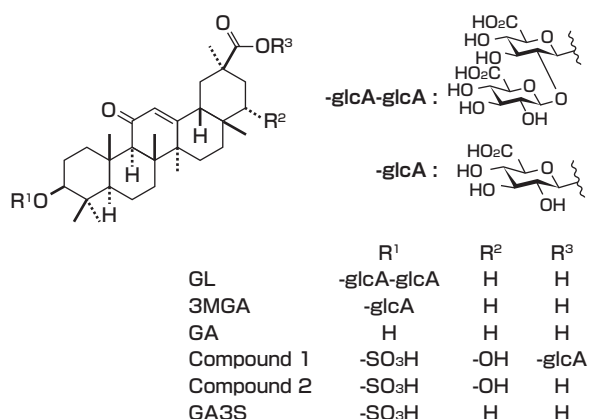
らかにすることを目的とした研究を行った⁶⁾。3MGA、GAのラット腎ミクロソームにおける11 β -HSD2阻害作用のIC₅₀値は、それぞれ0.46 μ M、0.13 μ Mであった。それぞれアニオン性の化合物であることから、腎尿細管上皮細胞の側底膜側に発現している有機アニオントランスポーター (OAT) 1とOAT3を強制発現させたHEK293細胞を用いた取り込み実験を行ったところ、3MGAはそれらの基質となったが、GAは基質として認識されなかった。両者はいずれも99.9%以上がアルブミンと結合した状態で血中に存在するため、糸球体ろ過により排泄されにくく、トランスポーターを介する能動輸送でのみ細胞内へ移行できること、鉱質コルチコイド受容体の存在する腎尿細管細胞内へ3MGAは移行できるもののGAは移行できないことから、GAが偽アルドステロン症の原因物質とはなりがたく、Katoらの推測を科学的に裏付けることができた。

3MGA以外のGL代謝産物の発見

以上のことから、筆者らは甘草服用後の血中、尿中から3MGAを検出することで偽アルドステロン症の発症を早期に予防できると考え、3MGAに対するモノクローナル抗体を作成、3MGAを簡便に検出するためのELISAを開発した⁷⁾。そのELISAでは、3MGAを正常ラット血漿に溶解したときに良好な検量線を作成することができ、添加回収試験も問題はなかったが、Mrp2を遺伝的に欠損する高ビリルビン血症ラット (EHBR) にGAを経口投与後の血清、尿サンプル中の3MGA濃度をLC-MS/MSとELISAそれぞれで測定したところ、ELISAでの実測値はLC-MS/MSでの実測値の30~100倍の値を示した。このGA投与後のEHBRの尿を薄層クロマトグラフィーにより展開、PES膜に転写、固定、抗3MGA抗体で処理、発色させるイースタンブロットングを行ったところ、3MGAの位置よりも極性の高い位置に発色が認められた(図2: 次頁参照)。そこで、EHBRにGAを飲水として投与、尿を回収しながら飼育、得られた尿1Lから、このイースタンブロットの陽性反応スポットを指標にして化合物の分離を行い、新規GL代謝産物、22 α -hydroxy-18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate-30-glucuronide (化合物1)を単離構造決定した(図1)。化合物1の発見から他のGL代謝産物の存在の可能性が示唆されたことから、EHBRの尿についてさらに代謝産物の探索を行い、既知のGL代謝産物である18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate (GA3S)とともに、新規化合物として22 α -hydroxy-18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate (化合物2)を単離した(図1)⁸⁾。得られた化合物1、2、GA3Sのラット腎ミクロソームにおける11 β -HSD2阻害作用のIC₅₀値は、それぞれ2.0、0.11、0.10 μ Mであった。

正常SDラットにGA経口投与後、血漿中にはGAのみが検出され、胆汁中からはGA3Sを主に検出した。EHBRにGA経口投与後の血漿では、GAの次にGA3S、化合物2、

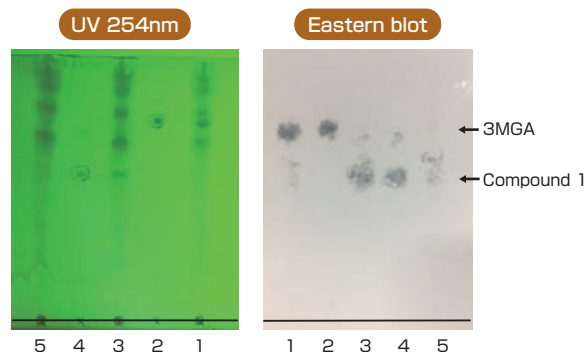
図1 甘草に含まれているglycyrrhizin (GL) とその代謝産物の構造式



GA: glycyrrhetic acid, 3MGA: 3-monoglucuronyl-glycyrrhetic acid, compound 1: 22 α -hydroxy-18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate-30-glucuronide, compound 2: 22 α -hydroxy-18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate, GA3S: 18 β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate.

化合物1の順で経時的に検出され、12時間後の血漿中の濃度はそれぞれが同程度であった。また尿中では、化合物2、GA3S、化合物1の順の濃度で排泄されていた。3MGAの血漿中、尿中濃度は、GA3Sの約100分の1程度しかなく、

図2 Glycyrrhetic acid (GA) を経口投与した Mrp2欠損ラット (EHBR) 尿の、抗3-monoglucuronyl-glycyrrhetic acid (3MGA) 抗体によるイースタンブロッティング⁷⁾



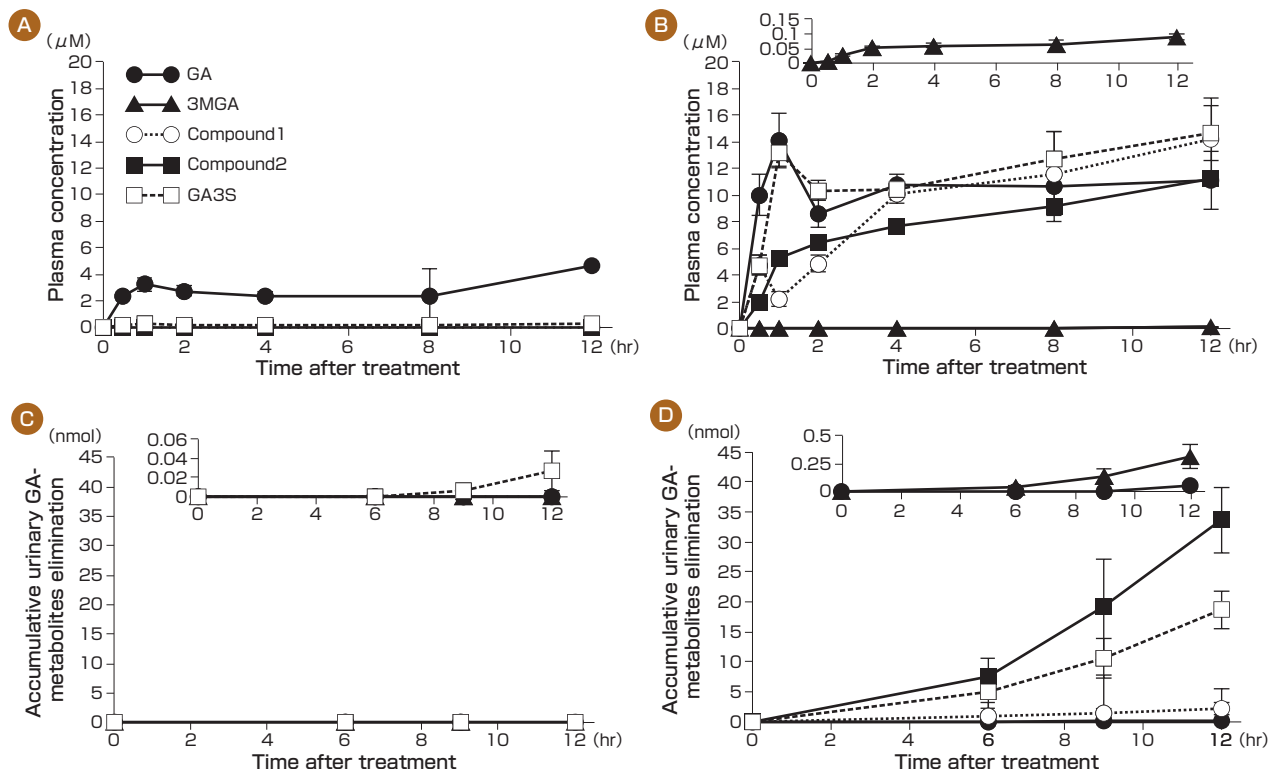
薄層クロマトグラフィー (TLC) 板 (Silica gel F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany) の原点上に、以下のサンプルをスポットした。レーン1: GA (1mg/mL) を含む飲水で飼育したMrp2欠損ラット (EHBR) の尿6μLと3MGA (1mM) 2μLの重ね打ち、レーン2: 3MGA (1mM) 2μL、レーン 3: 1と同じ尿6μLと22α-hydroxy-18β-glycyrrhetyl-3-O-sulfate-30-glucuronide (compound 1) (1mM) 2μLの重ね打ち、レーン4: compound 1 (1mM) 2μL、レーン5: レーン1と同じ尿6μL。その後、H₂O/BuOH/AcOH (2: 7: 3) により展開し、溶媒先端を鉛筆でマーク、254nmのUVを照射し、TLC板上で標品となるレーン2と4のスポットを鉛筆でマークしたときの写真 (左、原点となる線を写真に上書き)。その後、TLC板から化合物をポリエーテルスルホン (PES) 膜へ転写、固定、ブロッキング後、抗3MGA抗体、標識二次抗体で処理し、発色させたときの写真 (右、原点となる線を写真に上書き)。

マイナーな代謝産物であった (図3)。化合物1、2、GA3Sは、3MGAと同様、血漿中では99.9%以上がアルブミンに結合した状態で存在し、OAT1とOAT3の基質として認識されていた。以上のことから、偽アルドステロン症の原因物質の候補となり得ることが推測された。

横紋筋融解症患者でのGL代謝産物の血中濃度⁸⁾

76歳女性。3年間、甘草を含む漢方製剤を服用し、低カリウム血症 (2.1mEq/L) と高CPK血症、低レニン活性、低アルドステロン濃度を認めたことから、横紋筋融解症を伴う偽アルドステロン症と診断。直ちに漢方製剤の使用を中止、カリウムの補充を開始した。診断日の血清からは、GA3S (8.6μM)、GA (1.3μM)、化合物2 (87nM) を検出し、化合物1、GLと3MGAは検出限界以下であった。カリウム補充は継続されたが5日目の血中カリウムはまだ2.1mEq/L で、GA3SとGAの血中濃度はそれぞれ3.6μM、0.65μMと低下し、化合物2は検出限界以下となった。13日目の血中カリウムは2.8mEq/Lに増加し、GA3SとGAの血中濃度はそれぞれ61nM、11nMと低下した。18日目の血中カリウムは4.9mEq/Lと正常値に戻り、GA3SとGAは血中から検出されなくなった。

図3 正常SDラット (A, C) とMrp2欠損EHBR (B, D) でのglycyrrhetic acid (GA) 代謝産物の体内動態⁹⁾



GA (200mg/kg) をSDラットとEHBRに経口投与し、経時的に採血、採尿し、GAとその代謝産物をLC-MS/MSで分析、その血中濃度 (A, B) と尿中累積排泄量 (C, D) をプロットした。B, C, Dでは、それぞれのグラフ上部に低濃度部分を拡大した図を載せた。データは平均±標準誤差 (n=4)。3MGA: 3-monoglucuronyl-glycyrrhetic acid, compound 1: 22α-hydroxy-18β-glycyrrhetyl-3-O-sulfate-30-glucuronide, compound 2: 22α-hydroxy-18β-glycyrrhetyl-3-O-sulfate, GA3S: 18β-glycyrrhetyl-3-O-sulfate。

ヒトにおけるGL代謝産物の多施設横断研究⁹⁾

甘草が配合される漢方薬を服用した患者の血清および尿を用いて、GL代謝産物の濃度と偽アルドステロン症発症との関連を明らかにするための多施設後向き横断研究を行った。計97名の患者が登録された(年齢 60 ± 15 歳、男/女:14/83)。そのうち、血清からGAを検出したのは、67名(中央値122nM、5nM-1.8 μ M)、GA3Sを検出したのは68名(中央値239nM、2nM-4.2 μ M)あり、GL、3MGA、化合物1、2の検出例はなかった。GA3SおよびGA濃度と、血圧、浮腫との相関関係は認められなかった。血中GA3S濃度の高値は、血漿レニン活性、血漿アルドステロン濃度、血清カリウム濃度の低値と関連したことから、GA3Sが甘草による偽アルドステロン症の原因物質である可能性が高まった。

ヒトにおけるGAからGA3Sへの代謝を担う酵素の同定⁹⁾

GA3Sは、GAから硫酸抱合化酵素による代謝を受けて生じると推定される。ヒトの肝臓における硫酸抱合化酵素(SULT)にはいくつかのサブクラスが存在するが、そのうちSULT1A1と2B1はGAとは反応せず、GAはSULT2A1によりGA3Sへと代謝されることを明らかにした。

おわりに

ヒトにおけるGL経口投与後の体内動態と偽アルドステロン症の発症について、以下のようにまとめられる。GLは腸内細菌によりGAへ加水分解されて吸収され、血液中では主にGAとして循環する。GAはアルブミン結合率が高いため糸球体ろ過されず、尿細管上皮細胞膜上に発現するトランスポーターにも認識されないために尿細管分泌もされず、尿中へは排泄されない。GAは肝臓において硫酸抱合化酵素SULT2A1により硫酸抱合反応を受けてGA3Sへと代謝され、一部は血中へ移行し、その他はMRP2を介して胆汁中へ排泄される。GA3Sは腸管内で腸内細菌により代謝されて再びGAとなり、一部は再び吸収されて腸肝循環し、吸収されなかった分が糞便中へ排泄される。したがって、肝機能が正常ならばGA3Sは血液中には蓄積しないが、MRP2の機能低下によりGA3Sの胆汁排泄が抑制されると、GA3S血中濃度が上昇する。GA3Sは尿細管上皮細胞膜上の有機アニオントランスポーターにより認識されて尿細管上皮細胞内へ移行し、 11β -HSD2を阻害する。その結果、余剰となったコルチゾルが鉱質コルチコイド受容体を刺激、 Na^+ の再吸収を促進する一方で K^+ の排泄が亢進し、低カリウム血症、偽アルドステロン症が発症する(図4)。

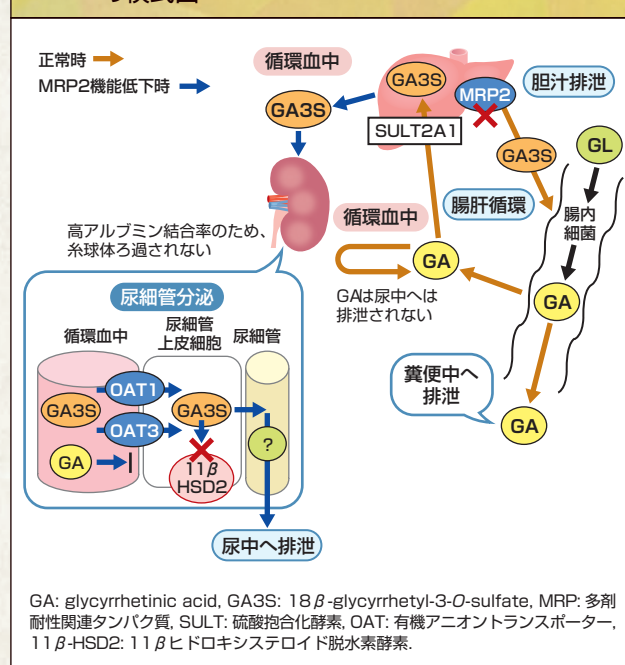
このことから、甘草を含む漢方薬使用時は、早期にGA3Sを血中から検出することで、偽アルドステロン症を

発症しやすい体質を診断できる可能性がある。またGAは血液中では大部分がアルブミンに結合しているために腎尿細管上皮細胞へ移行することができないが、低アルブミン血症時には遊離型のGAの濃度が高まり、単純拡散により細胞内へ移行して 11β -HSD2を阻害する可能性もある^{10, 11)}。一方、今回の研究で患者検体における尿中GA3Sの濃度はその血中濃度と比較すると低値であり⁹⁾、ラットでは検出できなかった未知GL代謝産物がヒトで存在する可能性は否定出来ないと考えている。今後も研究を続けていきたい。

〈謝辞〉

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、「統合医療」に係る医療の質向上・科学的根拠収集研究事業 JP17lk0310036、JP18lk0310049、JP19lk0310064の助成を受けて行われたものである。

図4 ヒトにおけるglycyrrhizin (GL) 経口投与後の体内動態と偽アルドステロン症発症メカニズムの模式図



【参考文献】

- Conn J, et al.: Licorice-induced pseudoaldosteronism: Hypertension, hypokalemia, aldosteronopenia, and suppressed plasma renin activity. JAMA 205: 492-496, 1968
- Edwards CR. Renal 11β -hydroxysteroid dehydrogenase: A mechanism ensuring mineralocorticoid specificity. Hormone Res 34: 114-117, 1990
- Monder C, et al.: Licorice inhibits corticosteroid 11β -dehydrogenase of rat kidney and liver: in vivo and in vitro studies. Endocrinol 125: 1046-1053, 1989
- Kato H, et al.: 3-Monoglucuronyl-glycyrrhetic acid is a major metabolite that causes licorice-induced pseudoaldosteronism. J Clin Endocrinol Metab 80: 1929-1933, 1995
- Makino T, et al.: Down-regulation of a hepatic transporter multidrug resistance-associated protein 2 is involved in alteration of pharmacokinetics of glycyrrhizin and its metabolites in a rat model of chronic liver injury. Drug Metab Dispos 36: 1438-1443, 2008
- Makino T, et al.: 3-Monoglucuronyl-glycyrrhetic 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 Pharmacol Exp Ther 342: 297-304, 2012
- Morinaga O, et al.: Isolation of a novel glycyrrhizin metabolite as a causal candidate compound for pseudoaldosteronism. Sci Rep 8: 15568, 2018
- Ishichi K, et al.: 18β -glycyrrhetyl-3-O-sulfate would be a causative agent of licorice-induced pseudoaldosteronism. Sci Rep 9: 1587, 2019
- Yoshino T, et al.: Identification of glycyrrhizin metabolites in humans and of a potential biomarker of licorice-induced pseudoaldosteronism: a multi-centre cross-sectional study. Arch. Toxicol 93: 3111-3119, 2019
- 嶋田沙織 ほか: 低アルブミン血症は抑肝散製剤による低カリウム血症のリスク因子である。臨床薬理 47: S219, 2016
- Yoshino T, et al.: Risk factors associated with pseudoaldosteronism in patients with chronic hepatitis: A retrospective cohort study. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 124: 607-614, 2019