

## ベルベリン感受性マウスの選択的育成

桃井 啓子\*, 岩橋 寛治, 柴田 太, 荻田 善一

富山医科薬科大学 和漢薬研究所 病態生化学部門

### Establishment of mouse strain susceptible to berberine by the selective mating method

Keiko MOMOI\*, Kanji IWAHASHI, Futoshi SHIBATA and Zen-ichi OGITA

*Department of Pathogenic Biochemistry,  
Research Institute for Oriental Medicines,  
Toyama Medical and Pharmaceutical University  
(Received September 12, 1984)*

#### Abstract

Our purpose of investigation is to breed each experimental animal having different response to main components of "Houzai" and to analyze effects of "Houzai" on those animals affected the same pathogenic state from a pharmacogenetical point of view. To accomplish our purpose we selected and bred mice susceptible to berberine, which is main component of "Ôren-gedoku-tô (Huang-Lian-Jie-Du-Tang)" and "San'ô-syasin-tô (San-Huang-Xie-Xin-Tang)".

Our selection and breeding procedure was as follow: male and female mice were picked out at random from the population of ddY mice, which are closed colony, were mated with each other, and then got the first birthes and the second birthes. When the first birthes were 8 weeks of age, they and their parents were injected with selection dose of berberine (66mg/kg, 33mg/kg, 22.5mg/kg) intraperitoneally. We selected families which were recognized as a susceptibility to berberine by testing parents and the first birthes. The progeny susceptible to berberine were obtained by mating within the second birthes in this family, each other. The mouse having this susceptibility was maintained by selective mating procedure, above-mentioned procedure.

We succeeded in maintaining mice high susceptible to berberine (22.5mg/kg) through the selection and the breeding for 6 years.

**Keywords** berberine, susceptibility, mouse, selective mating

**Abbreviations**  $F_n$ ; 第n世代子孫,  $LD_{50}$ ; median lethal dose,  $LT_{50}$ ; median lethal time, Ôren-gedoku-tô (Huang-Lian-Jie-Du-Tang); 黄連解毒湯, San'ô-syasin-tô (San-Huang-Xie-Xin-Tang); 三黄瀉心湯

#### 緒 言

従来から和漢薬効果に関する科学的解明は含有される有効成分の解明に主として研究が向けられてきた。しかし、和漢薬効果の解明にとって、もう1つ

重要な問題は罹患時において、体質あるいは個人差に基づいてもたらされる症候群に応じて方剤（処方）が決定される、いわゆる“随証治療”の科学的解明にある。

“随証治療”の本質は、遺伝的背景の異なった個人が病を得たとき発現される症候群としての“病

\* 〒930-01 富山市杉谷2630  
2630, Sugitani, Toyama, 930-01, Japan

証”があり、それに対応して治癒することのできる処方（方証）があるということである。すなわち，“病証”に対応する“方証”があることになる。したがって、複雑な症候群としてのみとらえることのできない、いわゆる“病証”に直接アプローチするよりも、生体の方剤に対する薬物応答性すなわち薬理遺伝学的研究を通じて得られる知見から逆に“病証”について推定して行くという研究方法を確立したいと考えた。さらにこのような“方証”の解明に迫まるアプローチを通じて、ある程度，“随証治療”の本質を明らかにすることができるのではないかと考えた。

この種の研究方法を展開するためには、生薬成分の薬理作用に対して応答性の異なる実験動物が必要となる。そして、生薬成分における薬理作用が発現され難い薬物抵抗性の個体と薬理作用が容易に発現されやすい感受性である個体に同一の病態を与え治療効果を両者で比較することによって薬物応答性に基づく“方証”の存在を生化学的あるいは薬理遺伝学的見知から認識することが可能となるのではないかと考えた。

実験動物における遺伝的抵抗性の個体を育成することはさ程困難ではないが、それに反して感受性の個体の育成は非常に困難である。本研究の目的は、これらの漢方方剤と“証”との関連性を明らかにする目的で、黄連、黄柏の主成分であるベルベリンの効果が強く発現されるベルベリン感受性マウスの選択的交配による育成法を確立することにある。幸いにして約6年間におよぶ選択的交配の結果、ベルベリンに対して感受性の高いマウスを育成することができたのでここに報告したい。

## 材料と方法

### I. 材料

#### 試薬

硫酸ベルベリンはアルプス薬品工業から購入したものを用いた。その他の試薬は、和光純薬工業ならびに半井化学薬品の市販品でいずれも試薬特級のものを使用した。

#### 動物

ddY近交系マウスは、5週令時に購入し、市販粉末飼料CE-2およびCA-1（日本クレア製）を等量混和したものを与え、3週間から10週間、飼育したものを実験に用いた。

### II. 方法

#### ベルベリン感受性試験法

硫酸ベルベリンを6.6mg/mlとなるように1/15M pH6.8リン酸緩衝液に溶解し、硫酸ベルベリン溶液を作製した。硫酸ベルベリン溶液をddY近交系マウスの腹腔内に66mg/kg ( $LD_{50}$ ) 量を投与した。投与後のマウスの反応を観察し、24時間以内に死亡したマウスをベルベリン感受性個体と判定した。

#### ベルベリン感受性マウスの選択的育成法

ddY近交系マウス集団から無作為に雌と雄を選びだし交配させ、1産仔ならびに2産仔を得た。1産仔が約8週令になった時点で、その親と1産仔に硫酸ベルベリン溶液66mg/kg ( $LD_{50}$ ) 量を腹腔内に投与した。両親とその1産仔がともに死亡した場合のみ、この2産仔のマウス同士を交配するという方法で継代し続けることによってベルベリンに対して高い感受性を示すマウスを選択的に育成した。

## 結果

#### ddY近交系マウスにおけるベルベリン応答性

ddY近交系マウス8週令雄45匹、雌45匹および15週令雄20匹、雌19匹にこの集団における $LD_{50}$ 量(66mg/kg)の硫酸ベルベリン溶液を腹腔内に投与したところ、2時間で死亡する個体や24時間で死亡

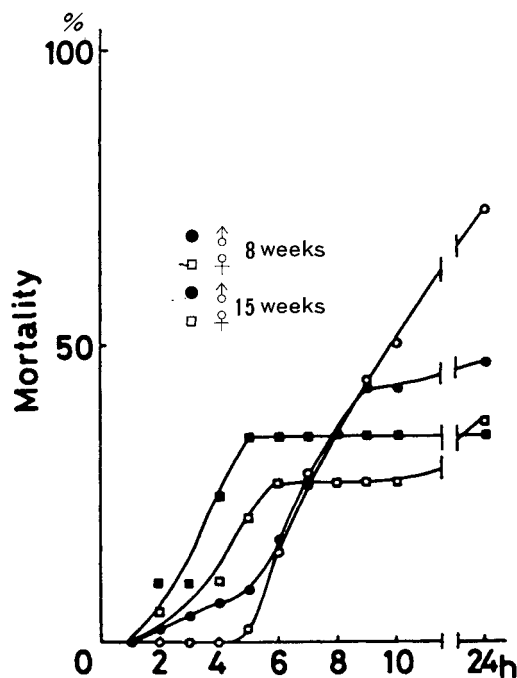


Fig. 1 Effect of berberine (66mg/kg) on the population of ddY mice

する個体, さらにこの濃度で生存する個体が存在していることを見出した (Fig.1)。24時間以内に死亡した個体を, ベルベリン感受性個体とした。感受性の程度を示す基準として, その集団を構成する個体の半数が死亡する時間, 中央致死時間 (median lethal time) を  $LT_{50}$  として表示することにした。それぞれの個体の  $LT_{50}$  は, 死亡率の時間曲線から求めた。それぞれの死亡率は, 8週令の雄では, 44%, 8週令の雌では, 73%, 15週令の雄では, 35%, 15週令の雌では, 37% であった。その  $LT_{50}$  は, 8週令の雄では, 6.5 (時間), 8週令の雌では, 8 (時間), 15週令の雄では, 3 (時間), 15週令の雌では, 4.5 (時間) であった (Fig.2)。

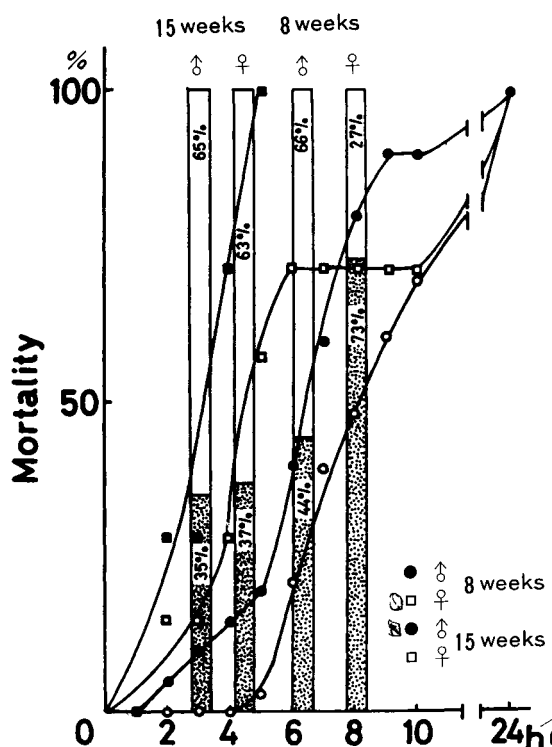


Fig. 2 Mortality of the population of ddY mice administered berberine (66mg/kg)

Curves demonstrate mortality of the population of ddY mice susceptible to berberine in time course. Columns demonstrate mortality of the population of ddY mice and are placed in each  $LT_{50}$ .

#### 選択的育成第2世代におけるベルベリン感受性の程度

ddY近交系マウスの集団から雌と雄を無作為に1匹

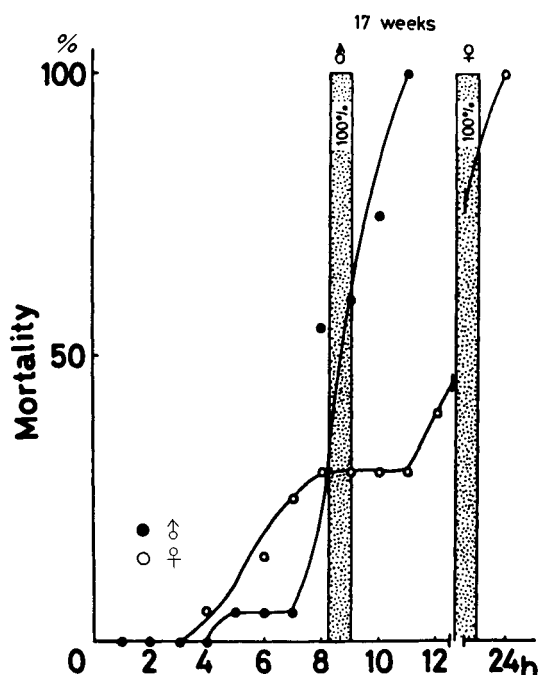


Fig. 3 Mortality of the population of  $F_2$  administered berberine (66mg/kg)

Curves demonstrate mortality of the population of  $F_2$  susceptible to berberine in time course. Columns demonstrate mortality of the population of  $F_2$  and are placed in each  $LT_{50}$ .

ずつ選んで交配させ, 1産仔および2産仔を得た。前述のベルベリン感受性マウスの育成法に従い, 両親, 1産仔に, この集団における $LD_{50}$ 量 (66mg/kg) の硫酸ベルベリン溶液を腹腔内投与した。両親および1産仔が感受性であった家族の2産仔から得た雌と雄を選び, 交配させ, 第1世代目 ( $F_1$ ) の個体群を得た。さらに同様な方法で選択的育成を続け第2世代 ( $F_2$ ) 個体群を得た。この第2世代の集団 ( $F_2$ ) における感受性の程度を知るために17週令の雄20匹, 雌20匹にこの世代集団における $LD_{50}$ 量である66mg/kgの硫酸ベルベリン溶液を腹腔内投与した。結果は, Fig.3に示してある。この世代集団における雄の死亡率は, 100% であり,  $LT_{50}$  は, 8.75 (時間) であった。雌の死亡率は, 100%, であり,  $LT_{50}$  は, 12 (時間) 以上であった。

#### 選択的育成第4世代におけるベルベリン感受性の程度

選択的育成の第4世代 ( $F_4$ ) において, 16週令

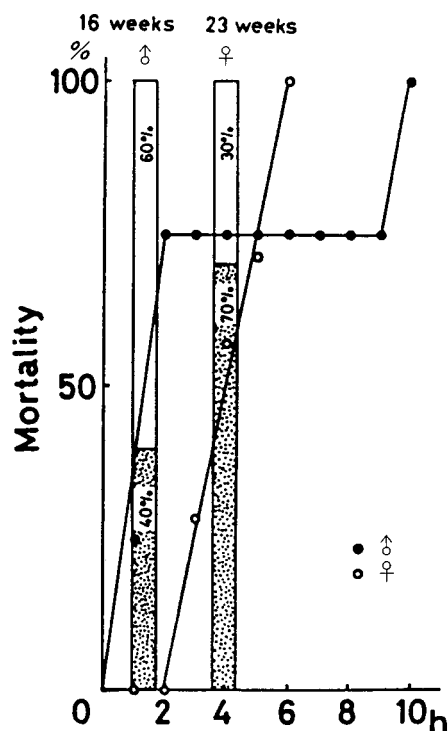


Fig. 4 Mortality of the population of  $F_4$  administered berberine (33mg/kg)  
Curves demonstrate mortality of the population of  $F_4$  susceptible to berberine in time course. Columns demonstrate mortality of the population of ddY mice and are placed in each  $LT_{50}$ .

の雄10匹、23週令の雌10匹にddY近交系集団の $LD_{50}$  (66mg/kg) の半量である33mg/kgの硫酸ベルベリン溶液を腹腔内に投与したところ、ddY近交系マウス集団に $LD_{50}$ 量 (66mg/kg) のベルベリンを投与した時と同様に、2時間で死亡する個体、10時間で死亡する個体さらに高い抵抗性を示す個体が存在していた (Fig. 4)。このときの16週令の雄の死亡率は、40%であり、その $LT_{50}$ は1.5 (時間)、また23週令の雌は、70%であり、その $LT_{50}$ は、4 (時間) であった。興味あることには、 $F_4$ の雄集団の死亡曲線は2相性を示した。この死亡率曲線は、この集団中には、2時間以内に死亡する群と10時間で死亡する群の2つの集団の存在を暗示している。

#### 選択的育成第5世代におけるベルベリン感受性の程度

ベルベリン感受性である第5世代 ( $F_5$ ) の13週令の雄10匹、17週令の雌9匹にddY近交系集団にお

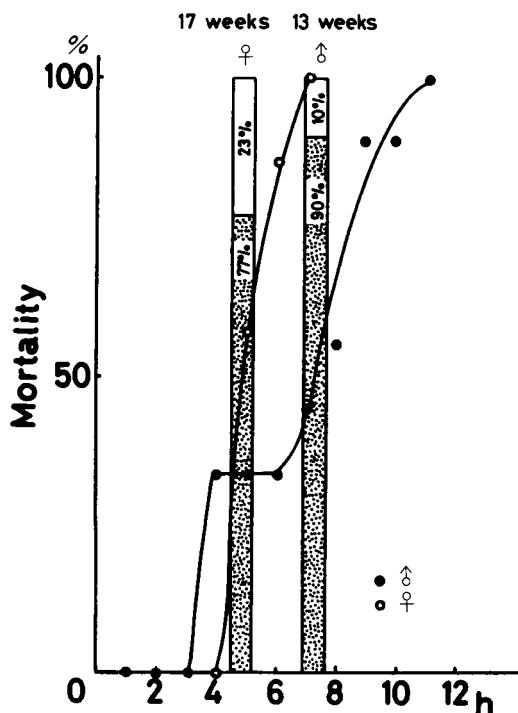


Fig. 5 Mortality of the population of  $F_5$  administered berberine (33mg/kg)  
Curves demonstrate mortality of the population of  $F_5$  susceptible to berberine in time course. Columns demonstrate mortality of the population of ddY mice and are placed in each  $LT_{50}$ .

ける $LD_{50}$ の半量 (33mg/kg) のベルベリン溶液を腹腔内投与した結果をFig. 5に示してある。死亡率、および $LT_{50}$ は、13週令雄では、90%、7.3 (時間)、17週令雌では、77%、4.7 (時間) であった。死亡率は、4世代目の個体に比べてはるかに上昇した。このことは、感受性個体集団が育成されつつあることを示している。

#### 選択的育成第14世代から第19世代におけるベルベリン感受性の程度

選択的育成を続け、第14世代集団に属する個体からは、硫酸ベルベリンの投与量を選択開始前のddY近交系集団における $LD_{50}$ の約 $\frac{1}{3}$ 量 (22.5mg/kg) に減量し、選抜することにした。第14世代から現在までの第19世代集団に属する16週令の雄と雌、および8週令の雄ならびに雌における、硫酸ベルベリン $LD_{50}$ の約 $\frac{1}{3}$ 量 (22.5 mg/kg) に対する死亡率すなわち、ベルベリン感受性の推移をFig. 6に示した。

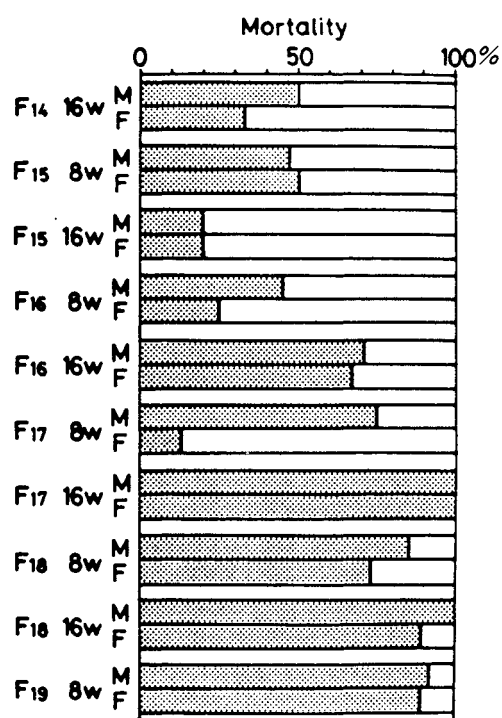


Fig. 6 Mortality of the population of F<sub>14</sub>-F<sub>19</sub> administered berberine (22.5mg/kg)  
 8W: 8 weeks of age M: male  
 16W: 16 weeks of age F: female

Fig. 6 より明らかなように、第18世代、第19世代において、22.5 mg/kg量に対する死亡率がほぼ100%に達した。すなわち安定したベルベリン感受性の集団を得ることに成功した。

## 考 察

ベルベリンに対する応答性の差異を論ずる場合には、薬物を経口的に与えた時消化管から果して吸収されるのか、吸収されるとしたらどのようなタンパクに結合し、どのような転送タンパクによって作用点に運ばれ、受容体とどのように結合し、薬理作用を現わすのか、またどのようにして代謝されるのかなどの解決しなければならない多くの問題点がある。塩酸ベルベリンが水に対して難溶性である理由からベルベリンの消化管からの吸収についてそれは困難であるという報告がある。本研究では、腹腔内注射によりベルベリン感受性マウスの選択的育成を行なった。したがって、この場合、ベルベリンの消

化管からの吸収の差異についての選択は行なわれていないことを考慮しなければならない。

本研究における選択的育成の母集団であるddY近交系マウス個体のベルベリンに対する感受性は、性差ならびに年齢によってかなり影響を受けていることはFig. 2より明らかである。性差については、雌が雄に対して感受性を示し、年齢差については、8週令の方が15週令より感受性を示している。しかし、死亡に至る時間経過LT<sub>50</sub>の値よりみれば、15週令の方が、8週令に比べて約1/2の低値である(Fig. 2)。このことは、加齢にともなってベルベリン感受性が安定に発現された結果であると考えている。例えば、ベルベリン受容体の合成量が増加し、作用が強く現れるとか、あるいは、ベルベリンの代謝酵素活性が低下するなどの要因が関与しているものと考えられる。ベルベリン感受性マウスを選択的育成するために約15週令にあたる両親と約8週令にあたる第1産仔が感受性であった家族の第2産仔を対交配させるという方法を用いることは、Fig. 2に示された結果より、適切な選択方法であると思われる。なぜならば、ベルベリン感受性マウスを選択して交配した第2世代では、すでにddY近交系集団におけるLD<sub>50</sub> (66mg/kg) のベルベリンを投与することによってF<sub>2</sub>個体の死亡率が100%となったことから、この方法でベルベリンLD<sub>50</sub> (66mg/kg) に対する感受性マウスの個体を選抜できる可能性があると考えたからである。以上の事実は、ddY近交系マウス母集団においてベルベリン感受性が遺伝子によって支配される遺伝形質であることを暗示している。

選択的育成を行なっていないddY近交系マウスの母集団においてLD<sub>50</sub>量のベルベリンを投与した際、1時間から2時間の非常に短い時間で死亡する個体の存在が見い出されている(Fig. 1)。この事実は、LD<sub>50</sub>量よりもなお少量のベルベリンに対してより感受性である個体を選択育成開始以前にすでに母集団中に存在していることを暗示している。そこで、さらに選択的交配実験を続け、得られた第4世代の集団に属する個体にベルベリン濃度をさらに母集団におけるLD<sub>50</sub>量 (66mg/kg) の半量の33mg/kgとして腹腔内に投与した。Fig. 4に示したように、このF<sub>4</sub>集団中に抵抗性個体と感受性の個体がいまだ混在していることが明らかにされた。さらに興味あることには雄の個体群の死亡曲線が2相性を示していることである。これは、選択に用いるベルベリン量を選択育成開始以前の母集団のLD<sub>50</sub>の半量を腹腔内投与することにより、この薬量ではベルベリン感受性をもたらす主要因 (main factors) のみでな

く、内在していた非主要因 (miner factors) が影響した結果として2相性をもたらされたと考えられる。このことは、またベルベリン感受性は、多くの要因の関与する多因子遺伝形質であることを暗示している。

ベルベリンに対する感受性を指標として、選択のためのベルベリン量をさらに少なくすることにより、ベルベリンの薬理作用に対する遺伝的に均一な感受性マウスを育成することができると考えた。現在までに、19世代を選抜し続けてきたが、ベルベリンLD<sub>50</sub>の約1/3量 (22.5mg/kg) に対して高い感受性を示すマウスを育成することに成功した。また一方では、ベルベリンに対する抵抗性の高いマウスを育成したいと考えている。

現在までに、ベルベリンの生理作用に関しては血圧降下作用<sup>3,4)</sup>、コリンエステラーゼ阻害作用<sup>4,5)</sup>などなどの報告があり、またその生体内の分布、代謝<sup>6,7,8)</sup>についても報告がなされている。ベルベリンは黄連、黄柏などに含まれる主要活性成分として注目されている。ベルベリンを含有する黄連は、三黄瀉心湯 (三黄丸、三黄散) および黄連解毒湯 (黄解散) に処方されている。しかし漢方臨床上で経験されている黄連、黄柏の作用は十分に解明されていない。そこで、我々の育成したベルベリン感受性マウスとベルベリン抵抗性マウスに同じ病態を与え、それぞれの方剤を投与し、もたらされる病態の変動を病態生化学的な立場から解析を進めることにより、これらの方剤の有する薬理効果と遺伝的背景との関係を解析したいと考えている。このような方法によって、“随証治療”の本質を科学的に解明する1つのアプローチがもたらされることを期待している。

## 結 論

マウスの両親とその1産仔に、ベルベリンを腹腔

内投与した時、ともに死亡した場合のみ、この2産仔のマウス同士を交配するという選択的育成法で約6年間、ddY近交系マウスを継代した。以上のような選択的交配の結果、ベルベリンLD<sub>50</sub>の約1/3量 (22.5mg/kg) を腹腔内投与することにより24時間以内に死亡する高い感受性を有するマウスの系統を育成することに成功した。

## 文 献

- 1) 風呂中 隆：黄柏に関する研究 (第I報), 日本東洋医学会誌 10, 1-6, 1959
- 2) 青山寿一：塩酸ベルベリンの抗菌性及び毒性, 薬学研究 23, 93-96, 1951
- 3) Suzuki, S.: Über die Wirkung des Berberine Activity by some Isoquinoline Alkaloids. *Tohoku J. Exptl. Med.* 36, 134-145, 1939
- 4) 内炭精一：Berberineの薬理作用知見補遺, 日本薬理学雑誌 53, 63-74, 1957
- 5) Ulrichová, J., Walterová, D., Preininger, V., Slavík, J., Lenfeld, J., Cushman, M., and Simánek, V.: Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by some Isoquinoline Alkaloids. *Planta. Med.* 48, 111-115, 1983
- 6) Bhide, M. B., Chavan, S. R., and Duta N. K.: Absorption, distribution and excretion of berberine. *Indian J. Med. Res.* 57, 2128-2131, 1969
- 7) 桜井修一, 手塚雅勝, 為政 簡：<sup>3</sup>H-berberine Chlorideの吸収、分布および排泄に関する研究, 応用薬理 11, 351-355, 1976
- 8) 古家敏夫：Berberine hydrochlorideの薬理作用, 大阪医科大学雑誌 17, 19-24, 1956
- 9) Furuya, T.: Metabolic Conversion of Berberine Hydrochloride. *Bull. Osaka Med. Sch.* 2, 18-24, 1956
- 10) Furuya, T.: Pharmacological Action, including Toxicity and Excretion of Berberine Hydrochloride and its Oxidation Product. *Ibid.* 3, 62-67, 1957