

# IV 研究報告

# アミノ酸付加ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討

小笠原 勝, 松永 孝之, 大戸 幹也, 川筋 透, 長井 良憲<sup>1</sup>, 高津 聖志

<sup>1</sup>富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

## Anti-tumor effects of betulin derivatives with amino acids in a tumor-burden mouse model.

Masaru OGASAWARA, Takayuki MATSUNAGA, Mikiya OHTO, Toru KAWASUJI,  
Yoshinori NAGAI<sup>1</sup>, Kiyoshi TAKATSU

<sup>1</sup>Department of Immunobiology and Pharmacological Genetics, Graduate School of  
Medicine and Pharmaceutical Science for Research, University of Toyama

### 要 約

植物成分のベツリンは、試験管内では様々な癌細胞に対して顕著な増殖阻害作用を示すが、がん移植マウスモデルでの有効性は限定的である。我々は、この要因はベツリンの水溶性の低さにあると考え、これまでに水溶性を改善した化合物を多数合成し、がん移植マウスモデルを用いて抗腫瘍効果を検証してきた。本研究では、アミノ酸を付加させることで水溶性を改善したベツリン誘導体17種を開発し、これらについて抗腫瘍効果を比較検討した。その結果、リジンを付加した誘導体に顕著な抗腫瘍効果を見出した。リジンをベツリンの3位に付加したBD-10、28位に付加したBD-42、及び、3及び28位に付加したBD-9は、いずれも80%以上の顕著な抑制効果を示した。BD-9について細胞増殖に対する影響を検討したところ、ベツリンよりも明らかに強い阻害作用が認められた。これらのことから、ベツリンへのリジンの付加は、水溶性の改善と抗腫瘍効果の増強に有用な方法であると考えられた。

### Summary

It has been shown that betulin, a plant constituent, inhibits the growth of various kinds of tumor cells *in vitro*, however, its inhibitory effects are limited in a tumor-inoculated mouse model. To this limited effectiveness *in vivo*, we have assumed that its low water-solubility may be one of crucial reasons and approached to produce several kinds of betulin derivatives with higher water-solubility, and examined the *in vivo* anti-tumor effects. In this study, we developed 17 betulin derivatives with amino acids and examined the anti-tumor effects in a tumor-burden mouse model. As a result, we identified that lysine esterification brought about remarkable anti-tumor effect. Three lysine-esterified derivatives, which are BD-10 with lysine at position 3 of betulin, BD-42 with lysine at position 28, and BD-9 with lysine at positions both 3 and 28, exhibited over 80% inhibition *in vitro*. Additionally, BD-9 showed much more potent anti-cell proliferative effect than betulin *in vitro*. These results suggest that lysine-esterification may be promising strategy for improving the water-solubility as well as the anti-tumor effect of betulin.

キーワード：ベツリン誘導体；悪性黒色腫；増殖抑制；リジン

Key words：betulin derivative；melanoma；growth inhibition；lysine

本研究では平成20年度より、ほくりく健康創造クラスター事業（～24年度）において「免疫抑制因子」の働きを解除（阻止）する物質の探索研究を進めてきた<sup>1)</sup>。その結果、白樺成分のベツリンに目的とする有効性を見出した<sup>2)</sup>。ベツリンは既知化合物であったが、免疫抑制解除作用については報告がなされておらず、新しい作用機序に基づくがん治療薬になる可能性があると考え特許を取得した<sup>3)</sup>。

一方で、ベツリンは水に非常に溶けにくい性質であるため、マウス体内では消化管からの吸収や血液への移行性が

極めて低く、その血中濃度が有効域に到達しないことが懸念された。実際、LC/MS/MSを用いた分析から、経口投与されたベツリンは消化管からほとんど吸収されないこと、静脈内に投与しても血液中にはほとんど移行しないこと（未発表データ）、さらに、がん移植マウスモデルにおいて、ベツリンを腫瘍内に直接投与しても、その抗腫瘍効果は50%程度しか認められないこと等を明らかにしてきた<sup>4)</sup>。このため、動物実験においてより高い有効性を得るには、水に溶けやすく血液や組織への移行性が良好な誘導体を開

## 結 果

発する必要があった。ベツリンの水溶性や有効性を向上させる方法として、カルバメート構造への変換やアミノ酸の付加による誘導体化が報告されている<sup>5,6)</sup>。昨年度は、カルバメート化したベツリン誘導体について比較検討し、顕著な抗腫瘍効果を示すBD-23を見出した。今回、アミノ酸を付加したベツリン誘導体17種を開発し、がん移植マウスモデルを用いて有効性を比較検討した。

## 実験方法

### 1. 実験試薬

ベツリン誘導体は神戸天然物化学株式会社に合成委託した。シスプラチンは和光純薬工業株式会社より購入し、ベツリンはExtrasyntheseより購入した。試験管内の実験では、いずれもジメチルスルホキシドに溶解して用いた。マウスに投与する場合は、いずれも0.1% Tween 80を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁して実験に供した。

### 2. 細胞及び細胞培養

マウスB16F10悪性黒色腫細胞は、10%の非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、0.1 mg/mlのストレプトマイシン及び55  $\mu$ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI-1640培地中にて継代、維持した。

### 3. がん移植マウスモデルを用いた評価

マウス悪性黒色腫細胞 (B16F10) を  $2 \times 10^5$  個/0.05 ml PBS に調製し、C57BL/6 マウス (8週令, 雌, 8匹/群) にマウス当たり0.05 ml ずつ下腹部皮下に接種した。化合物はがん接種後2日目から16日目まで1日1回、腫瘍内に投与した。対照群には溶媒 (0.1% Tween 80を含むPBS) を同様に投与した (50  $\mu$ l/マウス)。腫瘍径は2日あるいは3日ごとに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2で算出した。

### 4. 細胞毒性の評価

10% FBS を含む DMEM 培地 (GIBCO) で B16F10 細胞を  $4 \times 10^4$  個/ml に調製し、96ウェルプレート (Corning) に各ウェル当たり  $4 \times 10^3$  個を播種した。細胞がプレートに接着後、化合物を各濃度で添加し、インキュベーター内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) で48時間培養した。コントロールにはジメチルスルホキシドを同様に添加した。培養終了後、各ウェルの培地を、WST-1 (Wako) を5%含む10% FBS-DMEM 培地に交換し、さらに4時間培養した後、波長450 nm における吸光度を測定した。

## がん皮下移植マウスモデルにおけるベツリン誘導体の抗腫瘍効果

B16F10細胞の皮下移植モデルを用いて、アミノ酸を付加したベツリン誘導体17種の抗腫瘍効果を比較検討した。付加したアミノ酸の種類により抗腫瘍効果に大きな差が認められ、リジンを付加した場合にベツリンよりも強くかつ最も顕著な抑制効果が認められた (Fig. 1)。リジンを付加する位置をベツリンの3位としたBD-10、28位としたBD-42、あるいは、3及び28位としたBD-9の間では抑制率に大きな差は認められず、いずれも80%以上の顕著な抑制効果を示した (Fig. 1)。

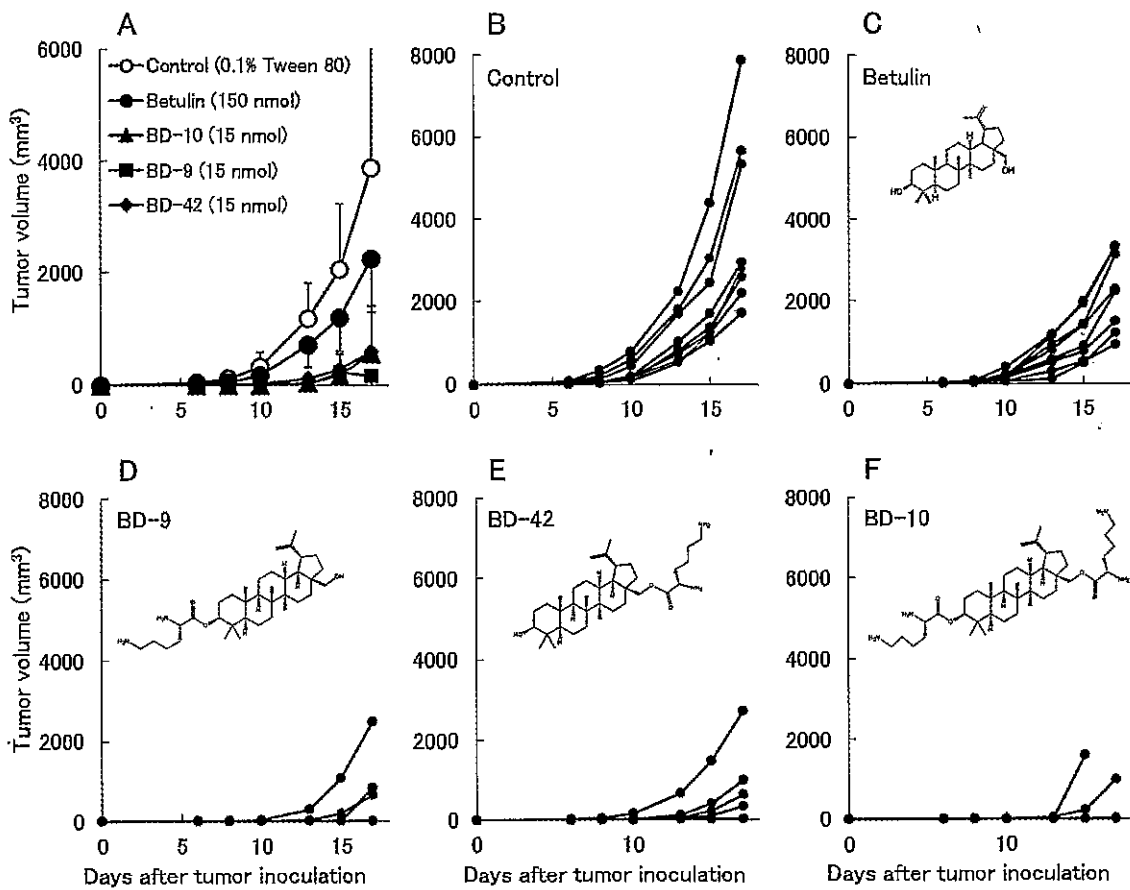
BD-9について、制癌剤の5-フルオロウラシル (5-FU)、シスプラチン、プレオマイシンの抗腫瘍効果と比較検討した (Fig. 2A)。BD-9は、シスプラチンやプレオマイシンの抑制効果ほどは強くなかったが、5-FUよりも強い抗腫瘍効果を示した。また、生存日数について調べたところ、生存率が50%になるまでの日数は、コントロール群では17.5日であったのに対して、BD-9投与群では39.5日であり、約2.3倍に延長した (Fig. 2B)。一方、シスプラチンあるいはプレオマイシンを同様の条件で投与したところ、全例で腫瘍の消失が認められた (Fig. 2Bにおいて、プレオマイシンのシンボルはシスプラチンと重なっている)。このことから、BD-9の延命効果はシスプラチンやプレオマイシンの効果ほどは強くなかったが、5-FU投与群での50%生存日数 (25日) と比較すると明らかに長かった。

## がん細胞の増殖能に対するベツリン誘導体の抑制作用

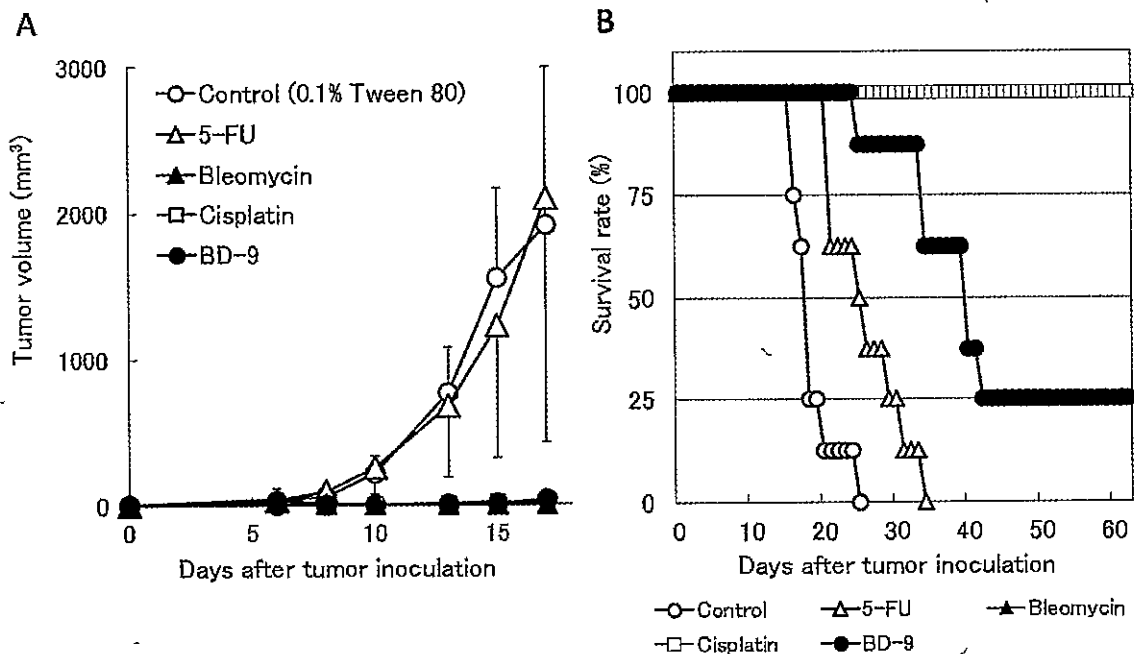
ベツリンにアミノ酸を付加することにより、細胞増殖阻害作用が増強されることが報告されている<sup>5)</sup>。そこで、BD-9の作用機序の解析として、試験管内でのB16F10細胞の増殖能に与える影響を検討した (Fig. 3)。その結果、BD-9は濃度に依存した顕著な阻害作用を示し、50%阻害濃度は1.73  $\mu$ Mであった。一方、ベツリンの50%阻害濃度は、昨年度報告したように13.0  $\mu$ Mであった<sup>7)</sup>。これらのことから、BD-9の細胞増殖阻害効果はベツリンよりも明らかに強いことが分かった。

## 考 察

本研究では、ベツリンの水溶性を改善するとともに、その抗腫瘍効果の増強を図るため、アミノ酸を付加したベツリン誘導体17種を合成し、担癌マウスモデルを用いて有効性を比較検討した。その結果、リジンを付加した場合に最も顕著な抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。ま



**Fig. 1** Effects of betulin and lysine-esterified betulin derivatives on the growth of B16 melanoma in mice. Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Betulin, BD-9, BD-10 or BD-42 was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated 2 or 3 times in a week. (A) Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of 8 mice. (B-F) Tumor volume of each mouse.



**Fig. 2** Effects of BD-9 and cytotoxic drugs on the growth of B16 melanoma in mice. Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. BD-9, bleomycin, 5-FU or cisplatin was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume (A) and survival rate (B) were evaluated. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of 8 mice.

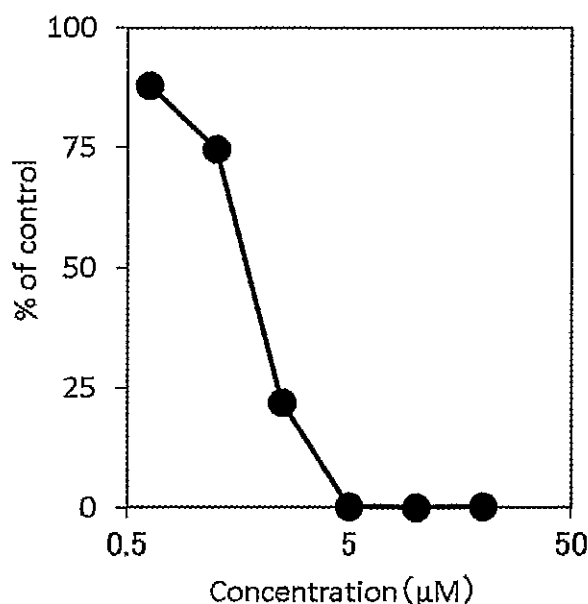


Fig. 3 Effects of BD-9 on the in vitro proliferation of B16 melanoma cells.

Tumor cells were cultured in 10% FBS-medium containing various concentrations of BD-9 for 48 h. After that, WST-1 solution was added into each well, and cells were incubated for an additional 4 h. Absorbance of each well was measured at 450 nm. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of triplicate wells.

た、その抗腫瘍効果は、これまでに示したベツリンの抗腫瘍効果<sup>4)</sup>よりも明らかに強力であり、さらに、前報で示したベツリンのカルバメート誘導体 (BD-23) の抗腫瘍効果と同程度であった<sup>7)</sup>。試験管内でのがん細胞の増殖能に対する阻害効果はベツリンよりも10倍程度に亢進し、この点においてもBD-23の場合と同程度の増強効果が認められた。

しかし、リジン付加ベツリン誘導体は培養ヒト線維芽細胞に対して強い細胞毒性を示し (データ省略)、がん細胞への選択性毒性は全く認められなかった。また、担癌マウスにおける抗腫瘍効果は、ベツリンよりは優れていたが、シスプラチンやプレオマイシンよりは明らかに劣っていた。前報において示したように、BD-23を腫瘍内に投与した場合、投与部位では発赤と腫脹を伴う炎症反応が認められ、腫瘍局所への好中球及びマクロファージの顕著な浸潤も認められた<sup>7)</sup>。このことは、医薬品開発におけるマイナス要因と考えられるが、本研究においても、リジン付加ベツリン誘導体を腫瘍内に投与した場合、投与部位では発赤と腫脹を伴う明らかな炎症反応が認められた。

これらのことから、ベツリンへのリジンの付加は水溶性の改善と抗腫瘍効果の増強に有用な方法であると考えられたが、医薬品開発を進めるためには、炎症の誘導や正常細胞への毒性について改善する必要があると考えられた。今後、ベツリンよりも細胞毒性が低く、かつ、より高い抗腫

瘍効果を示す化合物の開発を目指す。

## 謝 辞

本研究の一部は JSPS 科研費 24590109 の助成を受けて実施された。

## 文 献

- 1) 小笠原勝, 生谷尚士, 刈米アイ, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索, 富山県薬事研究所年報, 38, 21-27 (2011)
- 2) 小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (2), 富山県薬事研究所年報, 39, 21-25 (2012)
- 3) 高津聖志, 小笠原勝, 松永孝之: 発明の名称「がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物」(特許第5548874号, 平成26年5月30日登録)
- 4) 小笠原勝, 松永孝之, 長井良憲, 高津聖志: がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍メカニズムの解析, 富山県薬事研究所年報, 42, 17-22 (2015)
- 5) Kommera H., Kaluderović G.N., Dittrich S., Kalbitz J., Dräger B., Mueller T., Paschke R.: Carbamate derivatives of betulinic acid and betulin with selective cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20** (11), 3409-3412 (2010)
- 6) Drag-Zalesinska M., Kulbacka J., Sączko J., Wysocka T., Zabel M., Surowiak P., Drag M.: Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19** (16), 4814-4817 (2009)
- 7) 小笠原勝, 松永孝之, 大戸幹也, 川筋透, 長井良憲, 高津聖志: ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討, 富山県薬事研究所年報, 43, 17-21 (2016)

# マウスにおける没食子酸及び没食子酸メチルの体内動態の検討

川筋 透

## Pharmacokinetic Studies of Gallic Acid and Methyl Gallate in mice

Toru KAWASUJI

### 要 約

没食子酸及び没食子酸メチルは、シャクヤクなどに含まれる生物活性物質である。それらの化合物のマウスにおける消化管吸収性を HPLC/PDA を用いて検討した。没食子酸 (300 mg/kg) の経口投与30分後、マウス血漿中に没食子酸が検出された。グルクロニダーゼ処理血漿中及び無処理血漿中の没食子酸の濃度は、それぞれ14.2 µg/mL 及び6.8 µg/mL であった。一方、没食子酸メチル (100 mg/kg) の経口投与30分後、マウス血漿中に没食子酸メチルは検出されず、グルクロニダーゼ処理血漿中に没食子酸メチルが検出された。グルクロニダーゼ処理血漿中の没食子酸メチルの濃度は13.8 µg/mL であった。これらの結果から、没食子酸は、経口投与後、没食子酸とそのグルクロン酸抱合体としてマウスの血漿中に存在し、没食子酸メチルは、グルクロン酸抱合体として血漿中に存在することが示唆された。

### Summary

Gallic acid and methyl gallate are biologically active substances presented in peony and other plants. The absorption of those compounds on the mouse digestive tract was studied using HPLC/PDA. Gallic acid was detected in mouse plasma at 30 min after oral administration of gallic acid (300 mg/kg). The concentration of gallic acid in glucuronidase-treated mouse plasma and in untreated plasma were 14.2 µg/mL and 6.8 µg/mL, respectively. On the other hand, methyl gallate was not detected in mouse plasma but detected in glucuronidase-treated mouse plasma at 30 min after oral administration of methyl gallate (100 mg/kg). The concentration of methyl gallate in glucuronidase-treated plasma was 13.8 µg/mL. These results suggest that gallic acid is presented as gallic acid and its glucuronide in mouse plasma after oral administration and that methyl gallate is presented as its glucuronide in plasma.

キーワード：没食子酸，没食子酸メチル，マウス，血漿，グルクロン酸抱合体  
Key words : Gallic acid, Methyl Gallate, Mouse, Plasma, Glucuronide

薬事研究所では、薬用植物指導センターで栽培しているシャクヤクの園芸品種の中から、優れた品種を見出し、栽培普及と利用促進を図るため、50%メタノールエキスを作製し、成分及び生物活性に基づく品質試験を行っている<sup>1)</sup>。シャクヤクとカンゾウからなる芍薬甘草湯は、こむら返りに有効な漢方薬であり、骨格筋と内臓平滑筋の攣縮を抑制する効果を有するとされている<sup>2,3)</sup>。芍薬甘草湯のエキス製剤やシャクヤクのエキスには、マウス精管の電気刺激収縮反応に対する抑制作用がみられている<sup>4,5)</sup>。シャクヤクのエキスには、ガロタンニン類に関連する低分子化合物として、没食子酸や没食子酸メチルが存在している<sup>6)</sup>。没食子酸には低濃度でマウス精管での電気刺激収縮抑制作用がみられ、没食子酸メチルには収縮抑制作用と収縮作用がみられている<sup>7)</sup>。

没食子酸は、抗酸化性、収斂性、抗菌性、抗腫瘍性など

を有するとされ<sup>8)</sup>、がん細胞に対する選択的な細胞毒性や脂肪細胞の分化促進など種々の生物活性が報告されている<sup>9,10)</sup>。また、没食子酸メチルには、抗アレルギー性の生物活性が報告されている<sup>11)</sup>。なお、没食子酸メチルと類似の構造を有する没食子酸プロピルは、抗酸化活性のある食品添加物として使用されている<sup>8,12)</sup>。

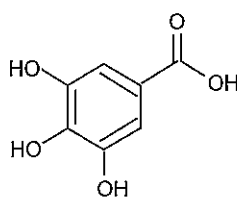
生物活性天然物の薬理作用を評価するうえで、吸収性等の体内動態データは重要な情報となる。マウスの場合、少量の検体で実験ができるメリットがある。また、マウスを用いて薬効を評価する場合には、マウスに経口投与した場合の血中濃度を知っておくことが望ましい。ラットでの体内動態については、没食子酸は消化管からの吸収性の早いことなどが報告されているが<sup>13)</sup>、マウスでの体内動態の報告はみられず、また没食子酸メチルの体内動態についての報告もほとんどみられない。

今回、マウス精管での電気刺激収縮抑制作用などの生物活性を示す没食子酸及び没食子酸メチルについて、経口投与後の血中濃度を測定し、吸収性等を検討したので報告する。

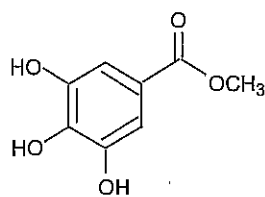
## 実験材料及び実験方法

### 1. 使用薬物

没食子酸（ナカライテスク）、没食子酸メチル（和光純薬）、 $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液（和光純薬、25,000 units/mL）、リンゴ貝起源、硫酸懸濁液）、メタノール（関東化学、高速液体クロマトグラフィー用）、リン酸（和光純薬）、ツィーン80（関東化学）を使用した。また、HPLC分析での水は超純水を使用した。



Gallic acid



Methyl Gallate

Fig. 1 Chemical structures of gallic acid and methyl gallate

### 2. 投与・採血

ICR 雄性マウス（6-8 週齢）を用いた。検体は0.5%ツィーン80水溶液に溶解又は懸濁し、ゾンデを用いて強制経口投与し、一定時間経過後に採血を行った。なお、溶媒投与群には0.5%ツィーン80水溶液を10 mL/kgの割合で経口投与した。採血前に麻酔薬のペントバルビタールナトリウムを約25 mg/kg背部皮下投与し（5 mg/mL液、約5 mL/kg）、10-15分後にマウスの眼窩静脈叢をヘパリン処理ガラス毛細管（先端破損）で傷つけ、マイクロチューブ（EDTA-2Na 添加・乾燥、0.25 mg入）に血液を採取した。血液は3,000 rpmで10分間遠心し、遠心上清を再度遠心し、血漿を得た。血漿はHPLC分析当日まで-80°Cで保存した。

### 3. HPLC条件

HPLCカラムは、L-column ODS（(財)化学物質評価研究機構、4.6 mm×150 mm）を使用し、移動相には、20 mM リン酸とメタノールの2液を用い、送液ポンプ内で混和割合を変更するグラジエントで溶出させた。親水性物質の分析のため、メタノール濃度を0.5%と低くした20 mM リン酸/メタノール（99.5 : 0.5）の混液でカラムを平衡化させた後、検体を注入し分析を開始（0分）した。15分間（0-15分）送液し、次いで、メタノールの濃度を30%に上

げた20 mM リン酸/メタノール（70 : 30）の混液で、さらに15分間（15-30分）送液した。その後15分間（30-45分）は、カラム洗浄のためメタノールの濃度を90%に上げた20 mM リン酸/メタノール（10 : 90）の混液を送液した。流量は0.8 mL/分、カラム温度は34°C、注入量は20  $\mu$ Lとし、オートインジェクタでHPLCカラムに注入した。

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器（島津製作所、SPD-M10Avp ; PDA）を用い、溶出時間と吸収スペクトル（最大吸収波長）でピークの確認を行った。没食子酸及び没食子酸メチルの定量には検出波長を270 nmに設定した。HPLC装置の制御・データ処理には、島津製作所のクロマトグラフィデータシステム CLASS-VP を使用した。

### 4. 血液試料の HPLC 分析

マウス血漿にメタノールを添加して抽出・除蛋白し、遠心上清をHPLCで分析した。血漿40  $\mu$ Lの場合、メタノール210  $\mu$ L（血漿量×5.25）を添加・混和し、4,000 rpmで10分間遠心し、遠心上清を0.2  $\mu$ mのシリンジフィルター（ワットマン、13 mm、プロピレン樹脂製）でろ過し、HPLC分析試料とした。

ピークの同定のため、没食子酸及び没食子酸メチルの水溶液を調製し、0.2  $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過し、標準試料としてHPLC分析に供した。

270 nmのクロマトグラム上で定量妨害があった場合は、ブランクの面積値を差し引き、検量線から分析試料中の被験物質の濃度を求めた。HPLC分析試料は、血漿量に対して6.25倍希釈（40  $\mu$ L→250  $\mu$ L）となるので、この希釈倍率に基づいて、被験物質の血漿中濃度を算出した。

### 5. 血漿中のグルクロン酸抱合体の分析

血漿中のグルクロン酸抱合体を検出するため、血漿を酸性化し、グルクロニダーゼを反応させ、脱抱合を行った<sup>14)</sup>。すなわち、マイクロチューブ中の血漿40  $\mu$ Lに対して1M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）4  $\mu$ Lを加え、吸排混和し、次に $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液（25,000 units/mL）2  $\mu$ Lを加えて、吸排混和し、37°C 1時間ドライパスで加温することでグルクロニダーゼ処理を行った。グルクロニダーゼ処理血漿の場合も、無処理血漿の場合と同じ手順で抽出・除蛋白を行い、HPLC分析試料を調製した。グルクロニダーゼ処理血漿（46  $\mu$ L）にメタノール204  $\mu$ Lを添加・混合し、4,000 rpmで10分間遠心し、遠心上清を0.2  $\mu$ mのフィルターでろ過し、HPLC分析試料とした。

グルクロニダーゼ処理血漿の場合も、血漿量に対して6.25倍希釈（40  $\mu$ L→250  $\mu$ L）となるので、無処理血漿の場合と同じ手順で、被験物質の血漿中濃度を算出した。

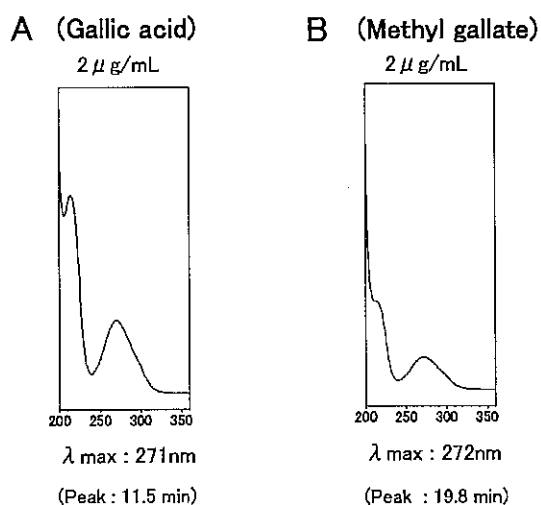
## 6. 統計処理

測定値は平均値±標準誤差で表した。

### 実験結果

#### 1. 没食子酸及び没食子酸メチルの HPLC 分析

没食子酸と没食子酸メチルの 2 µg/mL 水溶液を HPLC に注入し、得られたピークの UV 吸収スペクトルを比較すると、ほぼ同じ極大吸収波長を示し、主な極大吸収波長は 270 nm 前後であった (Fig. 2)。グラジエント法において、移動相のメタノール濃度を段階的に変更しており、メタノール濃度が 0.5% と極めて低い初期条件下で、没食子酸 (11.5 分前後) が溶出し、次の 30% メタノール含有の移動相条件下で没食子酸メチル (19.8 分前後) が溶出した。



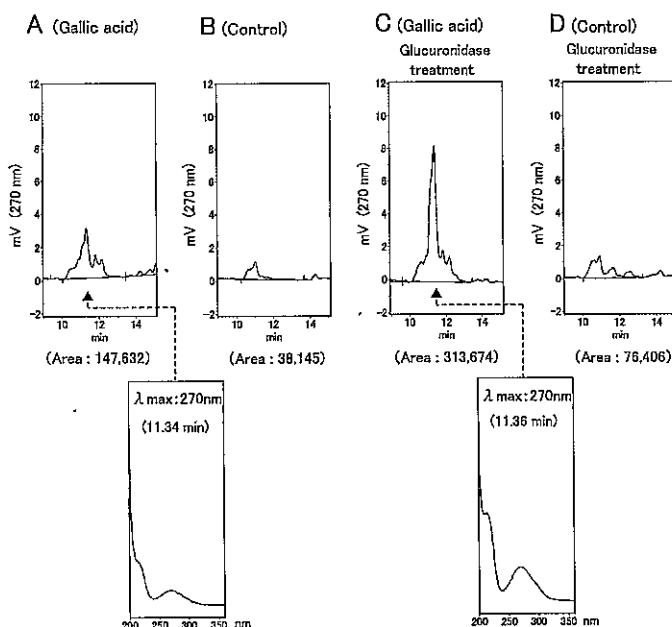
**Fig. 2 UV spectra of gallic acid and methyl gallate**  
Gallic acid and methyl gallate were dissolved in water. UV spectrum data was obtained by HPLC-PDA method.

#### 2. 没食子酸経口投与後のマウス血漿の HPLC 分析

マウス血漿及びグルクロニダーゼ処理血漿の場合、270 nm のクロマトグラム上には、没食子酸の溶出位置付近に、血液や酵素液等に由来する吸光度の変動がみられ、没食子酸の単ピーク化が妨害された (Fig. 3B, 3D)。そのため、やや広い時間範囲でベースラインを引き、全体の面積値を計算するように、システムにおける解析条件を調整した (波形処理パラメータ Width を通常より大きくするなど)。没食子酸の溶出位置付近全体の面積値を求め、没食子酸無投与の場合の面積値 (平均値) をブランクとして差し引いて、没食子酸による面積値を求めた。ブランクとなる面積値は、グルクロニダーゼ処理血漿の場合が、無処理血漿の場合よりも 2 倍程度大きかった (Fig. 3B, 3D)。

没食子酸 300 mg/kg 経口投与後 30 分のマウス血漿及びグルクロニダーゼ処理血漿では、没食子酸無投与の場合と

比較して、没食子酸の溶出位置付近で、吸光度の上昇がみられた (Fig. 3A, 3C)。吸光度の最高値を示した時間でスペクトル解析を行うと、主たる極大吸収波長は没食子酸と同じ 270 nm 前後であった (Fig. 3A, 3C)。投与 30 分後の面積値は、グルクロニダーゼ処理血漿の場合が、無処理血漿の場合よりも 2 倍程度大きく、グルクロニダーゼ処理によって、没食子酸の濃度が上昇した (Fig. 3A, 3C)。

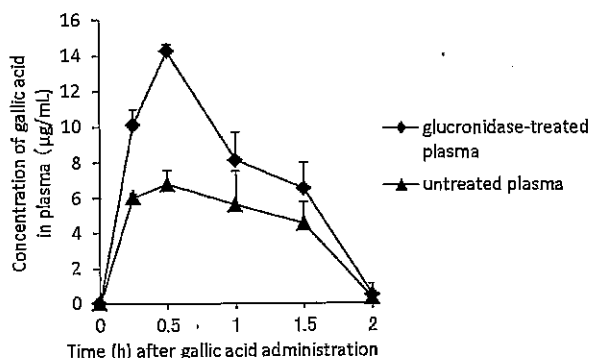


**Fig. 3 HPLC chromatogram and UV spectrum of the plasma of gallic acid-administered mouse**

Blood was collected 30 min after oral administration of methyl gallate at 300 mg/kg. Symbol shows the retention time of gallic acid (▲).

没食子酸投与後 15 分の時点で血漿中に没食子酸が検出され、30 分付近で最高濃度となり、投与後 2 時間ではほとんど検出されなくなるという血中濃度推移を示した (Fig. 4)。

没食子酸の 300 mg/kg 経口投与後 15 分、30 分及び 1 時



**Fig. 4 Concentration of gallic acid in the mouse plasma**  
Blood was collected after oral administration of gallic acid at 300 mg/kg. Error bars indicate the SE from the mean of 4-6 mice.



間の時点でのマウス血漿中の没食子酸濃度は、それぞれ  $6.0 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 、 $6.8 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$  及び  $5.6 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$  であった (Fig. 4).

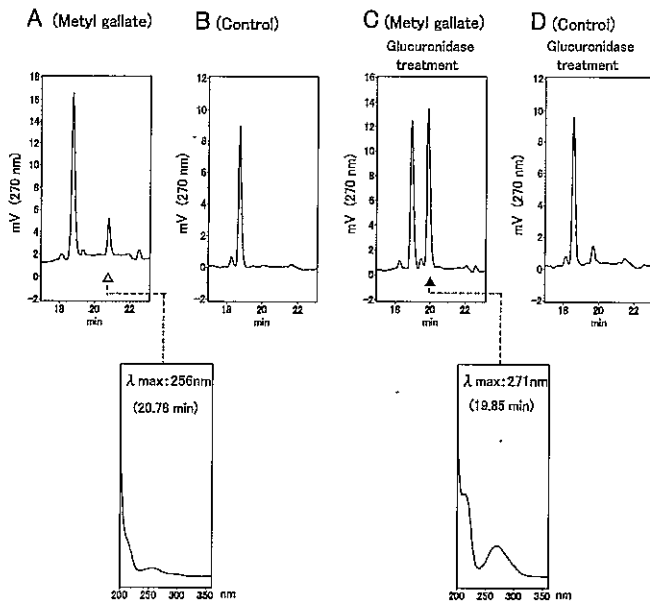
また、グルクロニダーゼ処理血漿では、没食子酸の  $300 \text{ mg/kg}$  経口投与後15分、30分及び1時間の時点でのグルクロニダーゼ処理血漿中の没食子酸濃度は、それぞれ  $10.1 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ 、 $14.2 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$  及び  $8.1 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$  であった (Fig. 4). グルクロニダーゼ処理血漿中の没食子酸濃度は、無処理血漿中の濃度に比べ 1.4倍から2.1倍高い濃度であった。

また、没食子酸  $100 \text{ mg/kg}$  投与の場合、投与後30分の時点での血漿中及びグルクロニダーゼ処理血漿中の没食子酸濃度は、それぞれ  $2.3 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$  ( $n=3$ ) 及び  $8.1 \pm 5.3 \mu\text{g/mL}$  ( $n=3$ ) であった。

### 3. 没食子酸メチル経口投与後の血漿の HPLC 分析

没食子酸メチル  $100 \text{ mg/kg}$  経口投与後30分のマウス血漿の場合、没食子酸メチルの溶出位置にピークは検出されなかった (Fig. 5A). なお、没食子酸メチルの溶出位置のすぐ後ろに、極大吸収波長の異なるピーク (256 nm 前後) が検出され、このピークは、血漿をグルクロニダーゼ処理すると消失した (Fig. 5C).

グルクロニダーゼ処理血漿の分析では、没食子酸メチルの溶出位置付近に妨害ピークがみられた (Fig. 5D). グルクロニダーゼ処理血漿中の没食子酸メチル濃度の算出では、ブランクとして妨害ピーク分の面積を差し引いた。

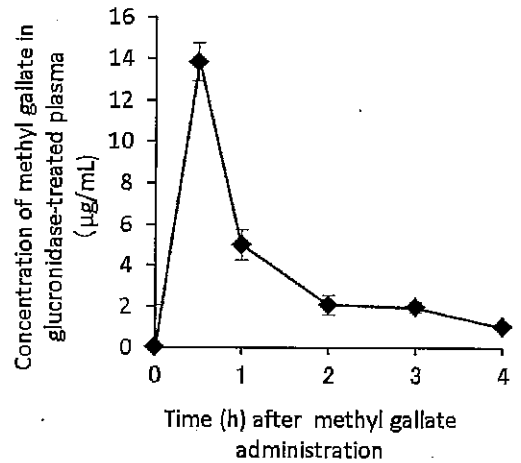


**Fig. 5 HPLC chromatogram and UV spectrum of the plasma of methyl gallate-administered mouse**  
Blood was collected 30 min after oral administration of methyl gallate at  $100 \text{ mg/kg}$ . Symbols show the retention time of methyl gallate ( $\blacktriangle$ ) and methyl gallate-related glucuronide ( $\triangle$ ).

なお、没食子酸の溶出位置付近には、没食子酸メチル投与に伴う没食子酸に由来する面積値の上昇はみられなかった。

没食子酸メチル  $100 \text{ mg/kg}$  経口投与後30分でのグルクロニダーゼ処理血漿の場合、没食子酸メチルの溶出位置で吸光度の上昇がみられ、主な極大吸収波長は、没食子酸メチルと同じ  $270 \text{ nm}$  前後であった (Fig. 5C). すなわち、グルクロニダーゼ処理によって、没食子酸メチルが検出された。

没食子酸メチル  $100 \text{ mg/kg}$  経口投与後30分及び1時間の時点でのグルクロニダーゼ処理血漿中の没食子酸メチルの濃度は、それぞれ  $13.8 \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$  及び  $5.0 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$  であった (Fig. 6). 投与後30分で最高濃度となり、その後大きく低下するという血中濃度推移を示した (Fig. 6).



**Fig. 6 Concentration of methyl gallate in glucuronidase-treated mouse plasma**

Blood was collected after oral administration of methyl gallate at  $100 \text{ mg/kg}$ . Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 mice.

## 考 察

没食子酸及び没食子酸メチルは、インビトロで電気刺激収縮抑制作用を示すことから<sup>7)</sup>、シャクヤクの薬効に寄与している可能性を検討するため、マウスへの経口投与後の血中濃度を測定し、吸収性等を検討した。

没食子酸及び没食子酸メチルは、ベンゼン環が1つで、主な極大吸収波長が  $270 \text{ nm}$  前後である<sup>6)</sup>。血液などの生体試料中には、ベンゼン環由来の吸収波長をもつ様々な物質が混在するとされており<sup>15)</sup>、 $270 \text{ nm}$  付近での定量では、妨害物の影響を減らす必要がある。

没食子酸は、親水性が高く、ODSカラムを用いるHPLC分析では、他のシャクヤク成分に比べてかなり早く溶出する<sup>7)</sup>。親水性の高い没食子酸の溶出時間を遅らせ、血液由来の妨害物質とできるだけ分離させるために、グラジエン

トの初期条件では、メタノール0.5%で20 mMリン酸水溶液が99.5%という、ほぼ水の移動相を用いた。さらに、没食子酸メチルとの同時定量のために、メタノール濃度を30%に上げるグラジエントの分析条件を設定した。しかし、没食子酸の溶出位置付近のやや広い範囲で、血液等に由来する吸光度の変動が残った。そのため、無投与の場合の面積値をブランクとして差し引くことで、没食子酸による面積値を求め、血漿から分析試料への希釈率から血漿中の没食子酸濃度を算出した。グルクロニダーゼ処理血漿の場合、無処理血漿の場合よりもブランクの面積値が大きくなったのは、酵素液中の妨害物質のためと思われる。

没食子酸は経口投与後15分のマウス血漿中に検出されたことから、消化管からの吸収が早いものと考えられた。投与後30分での没食子酸の濃度は、グルクロニダーゼ処理によって約2倍に上昇したことから、血漿中には没食子酸と没食子酸のグルクロン酸抱合体の両方が存在していることが示唆された。また、没食子酸の投与後2時間では、没食子酸及びそのグルクロン酸抱合体は、ほとんど検出されなくなった。

ラットやヒトで血漿や尿を分析する体内動態研究では、没食子酸の主たる代謝産物は4-O-メチル没食子酸とされている<sup>13,16</sup>。今回のマウスでの体内動態の検討では、4-O-メチル没食子酸を分析対象としておらず、今後の検討課題である。

ラットでは、門脈血及び下大静脈血で没食子酸が最大濃度となるのは、それぞれ15分と30分であり、没食子酸は吸収が早く、投与後6時間まで徐々に減少するという血中濃度推移が報告されている<sup>13</sup>。また、没食子酸含有のお茶や錠剤をヒトに投与した場合でも、没食子酸は経口投与後の吸収が早いことが報告されている<sup>16</sup>。没食子酸の吸収性の早いことは、今回のマウスでの体内動態の結果と、ラットやヒトでの結果と一致性があると思われる。

没食子酸には1-3 µg/mLという低濃度で、マウス精管での電気刺激収縮抑制作用がみられている<sup>7</sup>。今回、没食子酸が、300 mg/kgという高用量の経口投与での検討ではあるが、投与後30分のマウス血漿中に約7 µg/mL無変化体として存在していたことから、インビトロでの電気刺激収縮抑制作用等の薬理作用が、インビボでも起きる可能性があると考えられた。

没食子酸は、安定化ラジカル化合物ジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)の還元能を指標としたインビトロの評価系で、50%有効濃度が5.46 µM(約1 µg/mL)という強い抗酸化活性を示すことが報告されている<sup>17</sup>。また、鉄キレート剤の腹腔内投与によるマウスの酸化ストレスモデルにおける脂質過酸化に対して、4時間前と30分前に没食子酸100 mg/kgを2回経口投与することによって、1時間

後の血漿中及び腎臓中の過酸化脂質の生成が抑制されることが報告されている<sup>17</sup>。今回、マウスでの体内動態の検討において、マウス血漿中に没食子酸を検出したという結果は、没食子酸が血流に入り、インビボでの抗酸化作用の発現に寄与した可能性があると思われる。

シャクヤクの50%メタノールエキス中に没食子酸メチルが存在しており<sup>6</sup>、30-100 µg/mLの濃度で、マウス精管の電気刺激収縮に対する抑制作用がみられている<sup>7</sup>。シャクヤクの薬効に対する没食子酸メチルの寄与を検討するため、マウスにおける没食子酸メチルの吸収性等を検討した。

没食子酸メチルの分析において、グルクロニダーゼ処理血漿では、妨害ピークがみられたため、妨害ピーク的面積をブランクとして差し引き、グルクロニダーゼ処理血漿中の没食子酸メチルの濃度を算出した。

没食子酸メチルを100 mg/kg 経口投与後30分のマウス血漿中には、没食子酸メチルは検出されなかった。一方、グルクロニダーゼ処理血漿中には、約14 µg/mLという高濃度で没食子酸メチルが検出された。

没食子酸メチル投与マウスの血漿には、没食子酸メチルの溶出位置よりもわずかに遅れて特異的なピークが検出され、そのピークはグルクロニダーゼ処理で完全に消失したことから、没食子酸メチルのグルクロン酸抱合体に関するピークと考えられた。

没食子酸メチルは、マウスへの経口投与後、すぐに抱合化し、グルクロン酸抱合体として血中に存在するものと考えられた。また、没食子酸メチル経口投与後のマウス血漿中に没食子酸メチルの無変化体が検出されなかったことから、経口投与の場合、没食子酸メチルのインビボの薬効への寄与は少ないものと思われる。

ラットに没食子酸プロピルを経口投与し、グルクロニダーゼ処理等を行って尿中の代謝産物が検討されている<sup>19</sup>。ラットの尿中に、未変化の没食子酸プロピルは検出されず、没食子酸プロピルのグルクロン酸抱合体、遊離型の没食子酸とその抱合体、遊離型の4-O-メチル没食子酸とその抱合体が検出されたことが報告されている<sup>19</sup>。生体内で没食子酸や没食子酸メチルは、グルクロン酸抱合を受けるものと考えられ、今回のマウスでも、没食子酸又は没食子酸メチルを経口投与した場合に、血漿中にグルクロン酸抱合体が検出されたものと思われる。

今回、マウスに没食子酸メチルを100 mg/kg 経口投与した場合、血漿中に没食子酸やそのグルクロン酸抱合体は検出されなかった。没食子酸メチルの場合、抱合化がすぐに起きるために、没食子酸メチルから没食子酸への加水分解変化はすぐには起きないものと推察された。

マウス精管を用いた電気刺激収縮実験では、神経刺激によって筋肉の収縮が生じており、神経と筋肉に対する薬物

の作用を評価することができる。抑制作用がみられた場合には鎮痙鎮痛作用が期待される。マウス精管の電気刺激収縮反応に対して、低濃度の没食子酸には、発現の遅い徐々に進行する収縮抑制作用がみられる<sup>7)</sup>。一方、シャクヤクエキスの電気刺激収縮抑制作用の特徴として、発現の早い収縮抑制と、徐々に進行する収縮抑制が観察されている<sup>5)</sup>。発現の早い収縮抑制に関与する成分は、シャクヤク中に別に存在し、没食子酸のシャクヤクの薬理作用への寄与は部分的と考えられる。

今回のマウスでの体内動態の検討から、マウス血漿中に没食子酸の未変化体の存在が確認されたことから、経口投与後にすみやかに吸収される没食子酸は、シャクヤクの薬効の一部に寄与している可能性があると思われる。

## 文 献

- 1) 川筋 透, 田村隆幸, 横田洋一, 宮本(山口)朋美, 本田裕恵, 竹林憲司, 大江 勇, 高田正明, 松永孝之: 富山シャクヤクのブランド化推進事業報告(平成24-26年度) 選抜品種の特性比較, 富山県薬事研究所年報, **43**, 29-34 (2016)
- 2) 第十七改正日本薬局方解説書, 廣川書店(2016), D-438(シャクヤク), D-446(芍薬甘草湯エキス)
- 3) 改訂 一般用漢方処方の手引き(監修:日本公定書協会, 編集:日本漢方生薬製剤協会), じほう(2009), p.112
- 4) 川筋 透: マウス精管での電気刺激収縮反応に対する芍薬甘草湯の作用, 富山県薬事研究所年報, **40**, 46-50 (2013)
- 5) 川筋 透, 横田洋一, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別薬理試験(3) マウス精管の電気刺激収縮に対するシャクヤクエキスの作用, 富山県薬事研究所年報, **39**, 51-60 (2012)
- 6) 横田洋一, 高橋 敏, 寺崎さち子, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別成分分析, 富山県薬事研究所年報, **38**, 61-68 (2011)
- 7) 川筋 透: マウス精管の電気刺激収縮に対するシャクヤク成分及び関連化合物の作用, 富山県薬事研究所年報, **42**, 27-32 (2015)
- 8) 食品添加物活用ハンドブック(日本食品化学学会編) II 食品添加物実用 必須データ編, 産業調査会事典出版センター(2009) p.227-229
- 9) Inoue M., Suzuki R., Sakaguchi N., Li Z., Takeda T., Ogihara Y., Jiang B.Y., Chen Y.: Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1526-1530 (1995)
- 10) Makihara H., Koike Y., Ohta M., Horiguchi-Babamoto E., Tsubata M., Kinoshita K., Akase T., Goshima Y., Aburada M., Shimada T.: Gallic acid, the active ingredient of *Terminalia bellirica*, enhances adipocyte differentiation and adiponectin secretion, *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 1137-1143 (2016)
- 11) 小菅 崇, 穴倉弘記, 北中 進, 豊島 聰: ヘルパーT細胞のサイトカイン産生とアレルギーに対するフトモモ科植物シジウムからの抽出成分の影響, *YAKUGAKU ZASSHI*, **120**, 408-412 (2000)
- 12) 第7版 食品添加物公定書解説書, 廣川書店(1999) p.D-1262
- 13) Zong L., Inoue M., Nose M., Kojima K., Sakaguchi N., Isuzugawa K., Takeda T., Ogihara Y.: Metabolic fate of gallic acid orally administered to rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 326-329 (1999)
- 14) 川筋 透, 松永孝之: マウスにおけるジオスメチン及びジオスミンの体内動態の検討, 富山県薬事研究所年報, **41**, 26-32 (2014)
- 15) 宮澤陽夫, 仲川清隆, 浅井 明: 天然抗酸化物質の吸収と代謝, *化学と生物*, **38**, 104-114 (2000)
- 16) Shahrzad S., Aoyagi K., Winter A., Koyama A., Bitsch I.: Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans, *J. Nutr.*, **131**, 1207-1210 (2001)
- 17) 松永孝之, 横田洋一, 田村隆幸, 田中彰雄: シャクヤクの品種別薬理試験(1) マウスにおける抗酸化作用, 富山県薬事研究所年報, **38**, 17-20 (2011)
- 18) 松永孝之, 田村隆幸, 横田洋一, 川筋 透: 酸化ストレス誘発マウスの脂質過酸化に対するシャクヤク成分の効力比較, 富山県薬事研究所年報, **42**, 23-26 (2015)
- 19) 新村寿夫, 兼俊明夫, 中島久男, 山羽 力: 没食子酸プロピルのラットにおける代謝: イアトロスキアンによる尿中代謝物の定量及び代謝に及ぼす絶食の影響, *食衛誌*, **24**, 166-173 (1983)

# シャクヤクの褐変化反応について

松永 孝之, 田村 隆幸

## Studies on the browning in *Paeonia lactiflora*

Takayuki MATSUNAGA and Takayuki TAMURA

### 要 約

シャクヤク根における褐変化反応の一因としてポリフェノールオキシダーゼによる酵素反応の関与が指摘されている。そこで、シャクヤク葉を用いてポリフェノールオキシダーゼ活性を測定した。その結果、4-メチルピロカテコール、ドパミン及び没食子酸を基質とした酵素反応が進行することを認めた。この酵素反応は、至適 pH は8.0付近、至適温度は30℃付近であることが示唆された。さらに、シャクヤク根に含まれる没食子酸及びカテキンは、アルカリ条件に置かれると変色することが明らかになった。

以上の結果から、シャクヤク根における褐変化反応には、内因物質である没食子酸などを基質としたポリフェノールオキシダーゼによる酵素反応が一因であることが示唆された。さらに、内因性物質である没食子酸及びカテキンは、液性変化によっても着色することから、この変化も関与していることが考えられる。

### Summary

Browning in the root of *Paeonia lactiflora* is thought to result from the reaction of polyphenol oxidase as one of causes. Firstly, the activity of polyphenol oxidase was assayed using the extract from the leaves of *Paeonia lactiflora*. The activity of this enzyme was detected with 4-methylpyrocatechol, dopamine and gallic acid as substrate. It was shown that the optimal pH is around 8.0 and the optimal temperature is around 30 degree in this reaction. Furthermore, the alkaline solution of gallic acid and catechin, both the endogenous components in *Paeonia lactiflora*, was shown to discolor.

These results suggest that the browning in the root of *Paeonia lactiflora* is partly due to the reactant of gallic acid, catechin and so on, by polyphenol oxidase and alkalinity.

キーワード：シャクヤク、褐変化、ポリフェノールオキシダーゼ、没食子酸、カテキン、液性  
Key words : *Paeonia lactiflora*, Browning, Polyphenol oxidase, Gallic acid, Catechin, Alkalinity

シャクヤクは、鎮痛薬や鎮痙薬などとして多くの漢方処方に使用されている<sup>1)</sup>。また、消化管に対する作用(胃運動亢進、腸管運動抑制、ストレス潰瘍の抑制)、鎮痛作用、抗炎症作用、鎮静作用、抗ケイレン作用、内分泌系刺激作用及び血液凝固・線溶系に対する作用などが多くの薬理作用が報告されている<sup>1)</sup>。シャクヤクは、ボタン科の多年草で根を用い、活性成分としてはペオニフロリンやガロタンニン類が知られている<sup>2)</sup>。シャクヤクの品質に関しては、理化学的及び薬理的な評価が実施され、成分的な評価及びインビトロ及びインビボにおける薬効評価により品質評価が行われている<sup>3)</sup>。一方、生薬鑑別の観点からは、昔から匂い及び色調による評価が行われてきた。これらは、シャクヤクの調製法と密接に関係があるものと推察され、特に、乾燥工程による影響が大きいものと思われる<sup>4)</sup>。色調変化については、本来、白く仕上がったものが上品とされ、暗

褐色に変色したものは劣品とされており、この際、成分変化を来すことが報告されており、また、薬効にも変化があるものと推察される<sup>4)</sup>。シャクヤク根における色調変化は、酵素的褐変化によるものと考えられているが、詳細に検討した例はなく、唯一、林らがポリフェノールオキシダーゼ(PPO)によるフェノール性化合物の変色反応の可能性を指摘している<sup>5)</sup>。

我々は、富山シャクヤクとしてブランド化出来る品種の理化学的・薬理的選抜と共に栽培品の有効な乾燥調製法の検証も行っている。この際、問題となる色調変化について、酵素的及び非酵素的褐変化の観点からシャクヤク葉を用いて検討した。

## 実験方法

### 1. 試薬

本試験で用いた主な試薬は、没食子酸、4-メチルピロカテコール、塩酸ドパミン、海砂(30~50メッシュ、以上和光純薬)、カテキン(ケイマンケミカル)及び CelLytic TM P Cell Lysis Reagent (植物組織用抽出試薬、シグマ)である。

### 2. シャクヤク葉の採取

シャクヤクの葉は、平成28年5月に富山県薬用植物指導センターの圃場にて採取した。梵天種(4年栽培品)の1株より6~10枚の葉を採取し、4株から同様に採取し直ちに氷冷して持ち帰った。これを水洗した後水分を十分拭き取り計量してから使用するまで-80℃で保存した。

### 3. リンゴ由来 PPO の粗酵素液の調製<sup>6)</sup>

市販リンゴの皮を剥いて芯を取り、得られた果肉約244gを細切した後水中で冷やしながらか乳鉢で粉碎した。これに0.4Mショ糖、0.01Mアスコルビン酸含む0.1M Na/Kリン酸緩衝液(pH7.2)100mlを加えて水中で冷やしながらかホモジナイザーで破碎した。この破碎液を4枚重ねのガーゼでろ過後、得られたろ液をさらに遠心分離(500xg, 20分間)し、得られた沈殿を抽出緩衝液で洗浄して粗プラスチド画分とした。その後0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)に懸濁して粗酵素液とし、少量ずつ分注して-80℃で保存した。

### 4. シャクヤク葉由来 PPO の粗酵素液の調製

シャクヤク葉由来の PPO 活性の測定に用いる粗酵素液は以下のように調製した。すなわち、凍結状態のシャクヤク葉をナイロン袋中でなるべく細かく細切し、破碎した後秤量した。これを予め氷上で冷やした乳鉢に入れ、10倍量の植物組織用抽出試薬及び2倍量の海砂を加えて冷やしながらか磨り潰した。これを遠心チューブに入れ、12,000xg, 4℃, 10分間遠心して得られる上清を粗酵素液とし、少量ずつ分注して-80℃で保存した。

### 5. PPO活性の測定

シャクヤク由来の PPO 活性は、次のように測定した。

すなわち、0.1Mリン酸緩衝液または0.1Mトリス塩酸緩衝液(各々示した pH)に粗酵素液と各基質溶液(終濃度10mM)を添加し、同緩衝液で全量1mlにした。これを各温度に設定した恒温槽に10~60分間反応させ、経時的に各基質に対応した吸光度を測定した。

また、リンゴ由来の PPO 活性は、次のように測定した<sup>7)</sup>。すなわち、McIlvaine 緩衝液(0.1Mクエン酸と0.2Mリン酸1水素ナトリウムを混和、pH4.0)に粗酵素液とクロロゲン酸(終濃度0.05mM)を添加し、同緩衝液で全量1mlにした。これを30℃の恒温槽にて反応させ、波長325nmにおける吸光度を測定した。

### 6. 3種 pH 緩衝液中における没食子酸及びカテキンの吸光度変化の測定

5mM カテキンまたは没食子酸の溶液を0.1Mリン酸緩衝液(各 pH 6,7,8)に溶解し、30℃に保温して経時的にカテキンは波長380nmの、また、没食子酸は波長400nmの吸光度を各々測定した。

### 7. タンパク量の定量

タンパク定量は、Lowry 法に従って行った<sup>8)</sup>。すなわち、タンパク溶液0.2mlに反応混液(2%炭酸ナトリウムの0.1N水酸化ナトリウム溶液:0.5%硫酸銅の1%クエン酸ナトリウム溶液=50:1)1ml添加して37℃, 10分間加温した。その後、Folin-Ciocalteu 試薬0.1ml添加して良く攪拌した後、さらに30分間反応させ、波長750nmの吸光度を測定した。なお、牛血清アルブミンフラクションVを用いて同様の反応を行い、作成した検量線からタンパク量を求めた。

## 実験結果

### 1. リンゴ果実の PPO 活性

リンゴ果実を切った後に褐変するのは PPO に起因することはよく知られている<sup>9)</sup>。そこで、初めにリンゴ由来の PPO を用いて酵素活性を測定した。その結果、Table 1 に示すように調べた3種の基質に対して吸光度の変化が認められ、酵素活性を確認できた。その中で、4-メチルピロカテコールを基質として用いた時の活性が最も高かった。

Table 1 Activity of polyphenol oxidase in apple

Substrate	Concentration(mM)	Wave length(nm)	ΔOD/1min/mg protein
Chlorogenic acid	0.05	325	1.238
Dopamine	10	400	0.416
4-Methylpyrocatechol	10	400	8.790

Each OD value shows the mean of 4-7 experiments.

## 2. シャクヤク葉のPPO活性

次に、シャクヤク葉のPPO活性をリンゴ由来のPPOと同一条件で測定してみた。しかし、pH4.0の緩衝液中では活性は認められなかった。そこで、反応液のpHを変えて酵素活性の測定を行ったが、pHの上昇に伴いクロロゲン酸溶液の吸光度が上昇し、中性以上の測定条件では基質としては不適であった。そこで、ドパミンを基質としてPPO活性を測定した結果、酸性pHではやはり活性は認められないが、中性付近では活性が認められることが分かった。そこで、至適pHの検討を行った結果、Fig. 1に示すように、pH8.0付近で最も高い活性を示した。また、データには示さないが、4-メチルピロカテコールでも同様に検討したところ、pH7.5付近で最も高い活性を認めた。

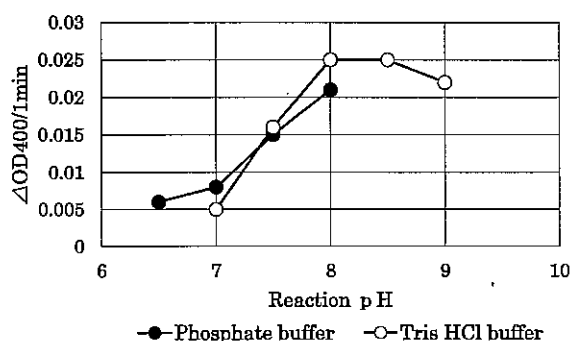


Fig. 1 Effect of reaction pH on the activity of polyphenol oxidase from the leaf of *Paeonia lactiflora* with dopamine as a substrate

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. The pH range of reaction mixture is pH6.5 to pH8.0 in 100mM phosphate buffer and pH7.0 to pH9.0 in 100mM tris HCl buffer.

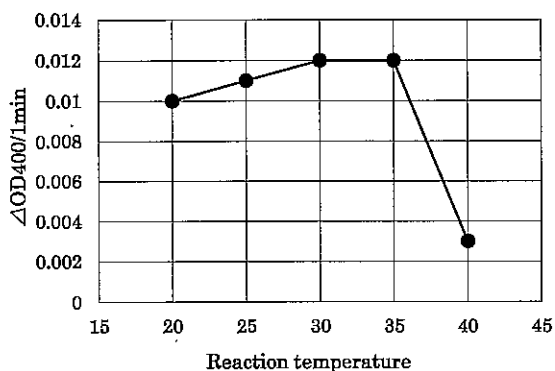


Fig. 2 Effect of reaction temperature on the activity of polyphenol oxidase from the leaf of *Paeonia lactiflora* with dopamine as a substrate

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. The reaction was assayed in the indicated temperature.

次に、反応温度を変えてPPO活性を測定した。その結果、Fig. 2に示すように、30°C付近で最も高い活性が見られた。

さらに、反応条件としてpH7.5、30°Cにおいて、各基質を用いた反応を検討した。その結果、Table 2に示すように、リンゴPPOと同様にドパミン及び4-メチルピロカテコールに対して、基質として酵素反応が進行した。また、シャクヤク根にも含まれる没食子酸も基質となり、吸光度の変化が認められた。しかし、クロロゲン酸は中性領域では吸光度の上昇が見られ、本酵素反応の基質としては不適であるため、酵素反応の検討はしなかった。

## 3. 塩基性下における没食子酸及びカテキンの変色反応

今回、酵素反応の至適pHを検討する過程でクロロゲン酸が中性以上のpHで着色することを観察した。また、ドパミン及び没食子酸においても中性以上のpHで着色してくることを確認している。そこで、シャクヤク根にも含まれる没食子酸及びカテキンの異なるpHにおける色調変化を調べた。その結果、Fig. 3に示すように、5mM没食子酸溶液においてpH6.0では8時間後でもほとんど吸光度の変化は見られないが、pH7.0では、吸光度の上昇が見られ、8時間後の吸光度は約1.6となった。また、pH8.0では、吸光度の変化はさらに大きく、8時間後の吸光度は約2.58となり、データには示さないが、8時間後では濃紺色を呈し、100時間以上静置すると黄色を呈すようになった。また、カテキンについても同様に各pHにおける吸光度変化を調

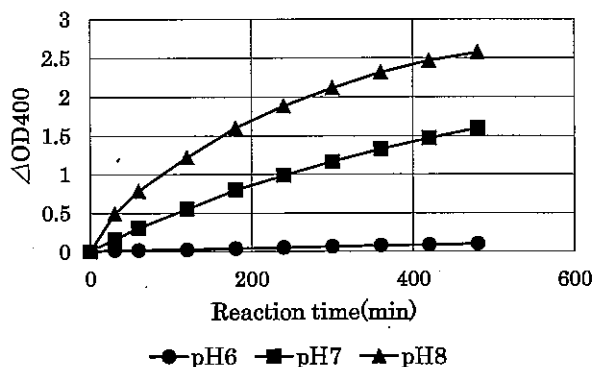


Fig. 3 Changes of absorbance in catechin solution at various pH

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. Catechin solution at various pH was incubated at 37°C in the dark. Each absorbance was assayed at the indicated intervals.

Table 2 Activity of polyphenol oxidase in leaf of *Paeonia lactiflora*

Substrate	Concentration (mM)	Wave length (nm)	ΔOD/1min/mg protein
Gallic acid	10	400	0.388
Dopamine	10	400	0.108
4-Methylpyrocatechol	10	400	0.096

Each OD value shows the mean of 5-10 experiments.

べた。その結果、Fig. 4 に示すように、pH6.0では吸光度の変化はほとんどなく、また、pH7.0においても若干の吸光度上昇を認めるのみであった。しかし、pH8.0では、急激な吸光度の上昇が見られ、8時間後では約0.54となり、黄色を呈した。

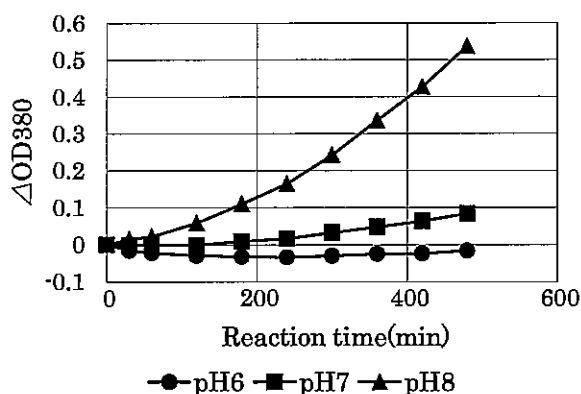


Fig. 4 Changes of absorbance in gallic acid solution at various pH

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. Gallic acid solution at various pH was incubated at 37°C in the dark. Each absorbance was assayed at the indicated intervals.

## 考 察

野菜や果物において、酵素的褐変化は色調の劣化とオフフレーバーを引き起こすため商品価値を下げるものと認識されている<sup>10)</sup>。ジャクヤクにおいても、乾燥など調製加工の過程で褐変化を来し、品質の低下をもたらすとされている<sup>4)</sup>。この現象は、ジャクヤク根に含まれるPPOによるフェノール性化合物の酸化反応によるものと推察されている<sup>4)</sup>。そこで、ジャクヤク葉を用いて褐変化反応におけるPPOの関与について検討を行った。

ジャクヤク葉の抽出エキスにPPO活性が認められるか検討した結果、リングエキスで活性の認められたpH4の反応条件では活性は検出出来なかった。そこで、基質としてドパミンを用いて反応pHを変えて酵素反応の検出を行ったところ、中性から弱アルカリの反応条件で活性が認められた。至適pHは、ドパミンを基質とした場合、pH8前後、4-メチルピロカテコールを基質とした場合は、pH7.5前後であり、弱アルカリ条件で最も高い活性を示すことが明らかとなった。植物を含む種々生物由来のPPOの至適pHは、3.5から9まで幅広く報告されており<sup>11)</sup>、ジャクヤク葉由来のPPOの場合は、弱アルカリ側に至適条件を有することが示唆された。林らは<sup>5)</sup>、ジャクヤク根由来のPPO活性に関して、ピロガロールを基質として至適pHを検討し、pH7.2付近で最も高い活性を認めたと報告している。また、今回至適温度を調べたところ、約30°Cで最も高い

活性を認めた。

次に、各種基質を用いてPPO活性を比較検討した結果、先に述べたように、ドパミン及び4-メチルピロカテコールでは酵素反応が進行した。さらに、ジャクヤク根に含まれる没食子酸を用いて酵素活性を調べたところ、基質となりうることを確認した。この結果は、ジャクヤク根のPPOが葉と同様の特性を有する場合は、没食子酸を基質として酵素的褐変化が生じる可能性を示唆している。一方、2,2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸及び2,6-ジメソキシフェノール)ではほとんど酵素反応は進行せず、これらの合成基質は基質となりにくいことがわかった。

今回、ジャクヤク葉由来のPPOの至適pHの測定に際し、基質として用いたドパミン及び4-メチルピロカテコールの吸光度がpHの上昇に伴い増加した。各種フェノール性化合物において、アルカリ条件下では構造変化が進み、吸収スペクトルが変化することが報告されている<sup>12)</sup>。そこで、ジャクヤクに含まれるフェノール性化合物のカテキン及び没食子酸についてアルカリ条件下における吸光度変化を調べた。その結果、カテキンに関しては、pH6では8時間まで吸光度の変化はほとんど見られないが、pH7では徐々に吸光度が上昇する傾向が見られ、pH8になると急激に吸光度が上昇し、8時間後では明らかに黄変した。また、没食子酸においても同様の傾向が認められ、特にpH7ではカテキンより吸光度の上昇が顕著であった。カテキン及び没食子酸は、液性がアルカリに向かうに従い濃度が減少し、重合体あるいは分解物を生じることが報告されている<sup>13,14)</sup>。この際、光照射により促進されるとされているが、今回の実験では遮光条件で反応させており、徐々にではあるが反応が進行した。カテキンでは、pHの上昇に伴い自動酸化が亢進し、キノン生成が促進されるため溶液が黄色を呈するものと推察されている<sup>15)</sup>。植物葉の細胞内器官のpHに関しては、細胞質内ではpH7.2~7.4の弱アルカリであるとされている<sup>16)</sup>。また、また、カテキンや没食子酸などが含まれる液胞内のpHは、5.0~5.5と酸性であり、自動酸化を受けにくい条件で存在しているものと推察される。一方、PPOが存在するプラスチドや葉緑体のpHは8.0~9.0とされており<sup>16)</sup>、今回示されたジャクヤク葉の至適pHに近い条件に維持されている。正常な状態では、液胞中の没食子酸などと葉緑体などに存在するPPOが接触することはないが、植物組織が破壊された場合、局在性が失われ、両者が接触し酵素反応が進む<sup>9)</sup>と共に、カテキンや没食子酸などのフェノール性化合物が中性あるいは弱アルカリ条件にさらされることになり、非酵素的褐変化がさらに進むものと推察される。

今回、ジャクヤク葉を用いて褐変化反応にPPOが関与

する酵素的褐変化とシャクヤク根に含まれるカテキンや没食子酸の存在する環境が弱アルカリ化することによる非酵素的褐変化が生じる可能性が示唆された。今後、シャクヤク根においても同様の機序で酵素的褐変化が発生するの否か明らかにすると共に、これらの成分の自動酸化による構造変換により薬効が変化するかどうかについても検討する予定である。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、酵素の取り扱い及び諸性質の検討に関して貴重なご助言を戴きました富山県立大学工学部生物工学科伊藤伸哉教授に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 第十七改正日本薬局方解説書, 広川書店 (2016)
- 2) S. Parker, et al: A pharmacological review of bioactive constituents of *Paeonia lactiflora* Pallas and *Paeonia veitchii* Lynch, *Phytother. Res.*, **1445** (2016)
- 3) J.-Y.Bae, C.Y.Kim, H.J.Kim, J.H.Park and M.-J.Ahn: Differences in the chemical profiles and biological activities of *Paeonia lactiflora* and *Paeonia obovate*, *J. Med. Food*, **18**, 224-232 (2015)
- 4) 林茂樹, 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎: 北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が生薬の品質に及ぼす影響, *生薬学雑誌*, **64**, 68-75 (2010)
- 5) 林隆章, 桂英二, 金島弘恭, 山岸喬: 芍薬の化学的変化 (第5報), 芍薬の変色について, *道衛研究報*, **33**, 35-38 (1983)
- 6) M. Murata, M. Tsurutani, S. Hagiwara and S. Homma: Subcellular location of polyphenol oxidase in apples, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1495-1499 (1997)
- 7) M. Murata, M. Tsurutani, M. Tomita, S. Homma and K. Kaneko: Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1115-1121 (1995)
- 8) O.H.Lowry, N.J.Rosenbrough, A.L.Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 9) 村田容常: 酵素的褐変化とその制御, *化学と生物*, **45**, 403-410 (2007)
- 10) 木原智子: ポリフェノールオキシダーゼと食品の酵素的褐変化, *中部大学応用生物学部紀要*, **4**, 29-34 (2005)
- 11) <http://www.brenda-enzymes.org>
- 12) M.Friedman and H.S.Jurgens: Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2101-2110 (2000)
- 13) J.-Y.Liang, J.-Y.Wu, M.-Y.Yang, A.Hu and L.-Y.Chen: Photocatalytic polymerization of catechin molecules in alkaline aqueous, *J. Photochem. Photobiol.*, **165**, 115-120 (2016)
- 14) Y.Du, H.Chen, Y.Zhang and Y.Chang: Photodegradation of gallic acid under UV irradiation: Insight regarding the pH effect on direct photolysis and the ROS oxidation-sensitized process of DOM, *Chemosphere*, **99**, 254-260 (2014)
- 15) M.Mochizuki, S.Yamazaki, K.Kano and T.Ikeda: Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1569**, 35-44 (2002)
- 16) <http://jspp.org/hiroba/q>



# 乾式造粒法による漢方エキス含有チュアブル錠に関する製剤設計

永井 秀昌, 明官 勇雄, 伊東 宏子<sup>1</sup>, 島谷 隆夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>テイカ製薬株式会社

## Formulation Design of Chinese Herbal Extract Containing Chewable Tablets by Dry Granulation Method

Hidemasa NAGAI, Isao MYOKAN, Hiroko ITO<sup>1</sup>, Takao SHIMATANI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Teika Pharmaceutical Co., Ltd.

### 要 約

我々は、漢方エキスを主薬とする飲みやすい製剤の製造条件について検討するため、抑肝散を主薬としたモデル処方において、添加剤の組み合わせを中心とした検討を行った。その結果、乾式造粒部分(内核)を構成する添加物の種類ならびに配合比率を変更させることによって、製剤化が可能な添加剤の組み合わせとその配合比率が明らかとなった。本手法を用いてさらに検討を重ねることにより、飲みやすい漢方エキス含有チュアブル錠の開発が可能になると考えられる。

### Summary

In order to investigate the manufacturing conditions of easily drinkable formulation based on traditional Chinese medicinal extracts, we studied mainly the combination of additives in a model prescription based on Yokukansan. As a result, by changing the kind and composition ratio of the additives constituting the dry granulated part (inner core), the combination of additives which can be formulated and the mixing ratio thereof became clear. By further investigating using this method, it is considered possible to develop a chewable tablet containing Chinese Herbal extract which is easily drink.

キーワード：チュアブル錠；漢方エキス製剤；抑肝散

Key words：Chewable tablets；Chinese herbal extract preparation；Yokukansan

近年、小児や高齢の患者に対する服薬アドヒアランス改善のため、口腔内速崩壊錠(OD錠)やゼリー剤等の飲みやすさに配慮した製剤が相次いで研究開発されている。OD錠やゼリー剤は水なしで服用できることから、錠剤を嚥下するのに困難な高齢者の患者や水分摂取制限のある透析患者にも服用しやすく、服薬アドヒアランスの改善が期待できる剤形である。

しかしながら、主薬が高含量の場合や吸湿性の高い生薬・漢方エキスを配合する場合には、崩壊時間が著しく遅延するために、飲みやすい剤形の開発が困難である。そこで我々は、一般的な製造装置を用いて製造可能な飲みやすい製剤開発を目的として、漢方エキス含有チュアブル錠の製剤設計について検討を行ってきた<sup>1),2)</sup>。今回、抑肝散を主薬としたモデル処方について、チュアブル錠化の検討を行ったので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

本研究に使用した試料を Table 1 に示す。

#### 2. 使用機器

本研究に使用した機器(製剤機器及び測定機器)を Table 2 に示す。

#### 3. 乾式造粒処方及びその調製方法(各種添加剤の比較実験)

実験では Table 3 に示す製剤処方(A~I)に基づき、内核である I. 乾式造粒部分と、外核である II. 後添加部分とで構成し、乾式造粒部分に用いた各種添加剤(①~③)の種類を変更することにより、得られる錠剤の比較を行った。

製造方法としては、主薬である抑肝散エキスに不溶性結合剤、賦形剤、甘味剤及び滑沢剤を混合した後、乾式造粒機に投入した(I. 乾式造粒部分)。乾式造粒では、ロー

Table 1 試料

配合目的	配合物質名	メーカー名
有効成分	抑肝散エキス	アルプス薬品工業(株)
不溶性結合剤	合成ケイ酸アルミニウム	協和化学工業(株)
	メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	富士化学工業(株)
	軽質無水ケイ酸	フロイント産業(株)
	ケイ酸カルシウム	富田製薬(株)
賦形剤	粉末還元麦芽糖水アメ	三菱商事フードテック(株)
	イソマル	BENEO-Palatinit
	乳糖水和物	DFE Pharma
	D-マンニトール	三菱商事フードテック(株)
滑沢剤	フマル酸ステアリルナトリウム	PHARMA TRANS SANAQ AG
	ステアリン酸マグネシウム	太平化学産業(株)
	ステアリン酸カルシウム	日油(株)
甘味剤	スクラロース	三栄源エフ・エフ・アイ(株)
	タウマチン	三栄源エフ・エフ・アイ(株)
崩壊剤	カルメロースカルシウム	ニチリン化学工業(株)

Table 2 使用機器

名称	メーカー名	型式
乾式造粒機・オシレーター式整粒機	フロイント産業(株)	TF-LABO
ロータリー式打錠機	(株)菊水製作所	VELA5
錠剤硬度計	岡田精工(株)	PC-30
ダイヤルシクネスゲージ	テクロック(株)	SMD-565L
崩壊試験器	富山産業(株)	NT-40H
摩損度試験器	富山産業(株)	TFT-120

Table 3 モデル薬物含有製剤における製剤処方(添加剤の種類と比較)

処方		A	B	C	D	E	F	G	H	I
I 乾式造粒部分	抑肝散エキス	47.5								
	①不溶性結合剤									
	合成ケイ酸アルミニウム	10.8	—	—	—	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8
	メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	—	10.8	—	—	—	—	—	—	—
	軽質無水ケイ酸	—	—	10.8	—	—	—	—	—	—
	ケイ酸カルシウム	—	—	—	10.8	—	—	—	—	—
	②賦形剤									
	粉末還元麦芽糖水アメ	32.47	32.47	32.47	32.47	—	—	—	32.47	32.47
	イソマル	—	—	—	—	32.47	—	—	—	—
	乳糖水和物	—	—	—	—	—	32.47	—	—	—
	D-マンニトール	—	—	—	—	—	—	32.47	—	—
	タウマチン	0.04								
	③滑沢剤									
フマル酸ステアリルナトリウム	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63	2.63	—	—
ステアリン酸マグネシウム	—	—	—	—	—	—	—	—	2.63	—
ステアリン酸カルシウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.63
II 後添加部分	カルメロースカルシウム	0.43							—	
	メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	4.38								
	スクラロース	1.32								
	ステアリン酸マグネシウム	0.43								
	Total (%)	100								

ルタイプDPS, ロール回転数10 rpm, スクリュー回転数20 rpm, ロール圧5MPaの操作条件で, フレーク状造粒物を調製した. 更に, オシレーター式整粒機で, スクリーンサイズ0.813 mm, 回転数100 rpmの操作条件で整粒した.

次にこの整粒品に, 外核のII. 後添加部分(不溶性結合剤, 崩壊剤, 甘味剤及び滑沢剤)を添加して混合した後, 打錠を行って錠剤を得た.

#### 4. 製剤処方及びその調製方法(添加剤の配合量の比較実験)

次に, I. 乾式造粒部分のうち, ①不溶性結合剤を合成ケイ酸アルミニウムに, ②賦形剤を粉末還元麦芽糖水アメに, ③滑沢剤をフマル酸ステアリルナトリウムに固定し, Table 4に示すように合成ケイ酸アルミニウムと粉末還元麦芽糖水アメの配合比率を変化させた処方(J~R)において比較検討を行った.

製造方法としては, 乾式造粒を行った後, 後添加部分を加えた後, ロータリー式打錠機を用い, 4kN, 6kN, 8kN, 10kN及び12kNの5水準の打錠圧で打錠し, 1錠の直径が10 mmでその重量が380 mgの平型の錠剤を得た.

#### 5. 評価方法

##### 1) 乾式造粒物の評価方法

###### (1) フレーク形成率

試験は, 乾式造粒機より圧縮成形して得られた造粒物(2分間)の全量を12meshのふるいで1分間分級し, 微粉を取り除いた後, フレーク品のみを質量を測定し, フレーク形成率を算出した(n=1, 基準値: 80%以上).

##### 2) 錠剤の評価方法

###### (1) 硬度試験

試験は, ロードセル式錠剤硬度計を用いて実施し, 錠剤の硬度を測定した(n=10, 基準値: 40N以上).

##### (2) 崩壊試験

試験は, 崩壊試験器を用いて実施し, 試験数は6錠とし, その崩壊時間の平均値で評価した(基準値: 30分未満).

##### (3) 摩損度試験

試験は, 日本薬局方参考情報の「錠剤の摩損度試験法」に準じて, 摩損度試験器を用いて実施した. また, 錠剤数を20錠として, 錠剤の摩損度を測定した(n=1, 基準値: 1.0%未満).

### 実験結果

#### 1. 乾式造粒物の評価結果(添加剤の種類比較 処方A~I)

本製剤処方のI. 乾式造粒部分(内核)の構成成分である, ①不溶性結合剤, ②賦形剤, 及び③滑沢剤の種類をTable 3に示す通り変更し, その影響について検証を行った.

##### ① 不溶性結合剤の変更による影響(処方A, B, C, D)

乾式造粒工程では, 4処方全ての造粒品がフレーク形成可能で, それらのうち, 3処方が基準値を満たした[処方A(合成ケイ酸アルミニウム, 81.85%), 処方B(メタケイ酸アルミン酸マグネシウム, 88.54%), 処方C(軽質無水ケイ酸, 88.30%)](Fig. 1a). また, 打錠工程では, それら3処方全てが基準値を満たした.

なお, 打錠品(錠剤)の硬度が最も高いものは処方B, 崩壊時間が最も短いものは処方C, 摩損度が最も低いものは処方Bであった(Fig. 1 b, c, d).

##### ② 賦形剤の変更による影響(処方A, E, F, G)

乾式造粒工程では, 4処方全ての造粒品がフレーク形成可能で, それらの全処方が基準値を満たした[処方A(粉末還元麦芽糖水アメ, 81.85%), 処方E(イソマル, 91.33%), 処方F(乳糖水和物, 90.52%),

Table 4 モデル薬物含有製剤における製剤処方(添加剤の配合量の比較)

処方		J	K	L	M	N	O	P	Q	R
I 乾式 造粒 部分	抑肝散エキス	47.5								
	合成ケイ酸アルミニウム	43.27	32.45	21.64	10.82	8.66	6.50	4.33	2.17	—
	粉末還元麦芽糖水アメ	—	10.82	21.63	32.45	34.61	36.79	38.94	41.1	43.27
	タウマチン	0.04								
	フマル酸ステアリルナトリウム	2.63								
II 後添 加部 分	カルメロースカルシウム	0.43								
	メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	4.38								
	スクラロース	1.32								
	ステアリン酸マグネシウム	0.43								
Total (%)		100.0								

## 考 察

処方G (D-マンニトール, 87.62%) (Fig. 1a). また、打錠工程においても、それら4処方全てが基準値を満たし、打錠品（錠剤）の硬度が最も高いものは処方E、崩壊時間が最も短いものは処方A、摩損度が最も低いものは処方Eであった (Fig. 1 b, c, d).

### ③ 滑沢剤の変更による影響 (処方A, H, I)

乾式造粒工程では、3処方のうち、フレーク形成が可能であったのは処方A (フマル酸ステアリルナトリウム) のみで、基準値を満たしており (81.85%)、さらに打錠工程においても基準値を満たしていた (Fig. 1 b, c, d).

### 2. 製剤の評価結果 (添加剤の配合量の比較 処方J~R)

本製剤処方の乾式造粒部分 (内核) の構成成分である、不溶性結合剤 (合成ケイ酸アルミニウム) と賦形剤 (粉末還元麦芽糖水アメ) の配合割合を Table 4 に示す通りに変更し、比較検討を行った。

その結果、合成ケイ酸アルミニウムの配合比率を、全体の43.27~0% [それに併せて、賦形剤の粉末還元麦芽糖水アメの配合比率を、0~43.27%] に順次変更して検討したが、乾式造粒工程では、処方J~Oの6処方が基準値を満たした。また、打錠工程でも、それら6処方全てが基準値を満たし、打錠品（錠剤）の硬度は、処方Oが最も高く、崩壊時間は処方Kが最も短く、摩損度は処方Jが最も低くなっていた (Fig. 2).

今回、漢方エキスを主薬とするモデル処方を用いて実験を行った。本製剤処方の乾式造粒部分 (内核) を構成する添加剤の種類ならびに配合比率を変更させて比較検討することによって、以下を確認することができた。

1. 不溶性結合剤、賦形剤、及び滑沢剤における配合成分の変更に伴う影響度を検証した結果、不溶性賦形剤としては、3種類 (合成ケイ酸アルミニウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、軽質無水ケイ酸) のうち一つを、賦形剤としては4種類 (粉末還元麦芽糖水アメ、イソマル、乳糖水和物、D-マンニトール) のうち一つを、滑沢剤としては、フマル酸ステアリルナトリウムを選択することで、製剤化が可能であった。
2. 不溶性結合剤である合成ケイ酸アルミニウムと、賦形剤である粉末還元麦芽糖水アメとの配合比率に伴う影響度を検証した結果、合成ケイ酸アルミニウムの配合比率を、全体の43.27~6.5% (それに併せて、粉末還元麦芽糖水アメの配合比率を全体の0~37.79%) に調整することで、製剤化が可能であった。

今回の実験結果をもとに、漢方エキスを配合する服用しやすい製剤の開発に向け、検討していく予定である。

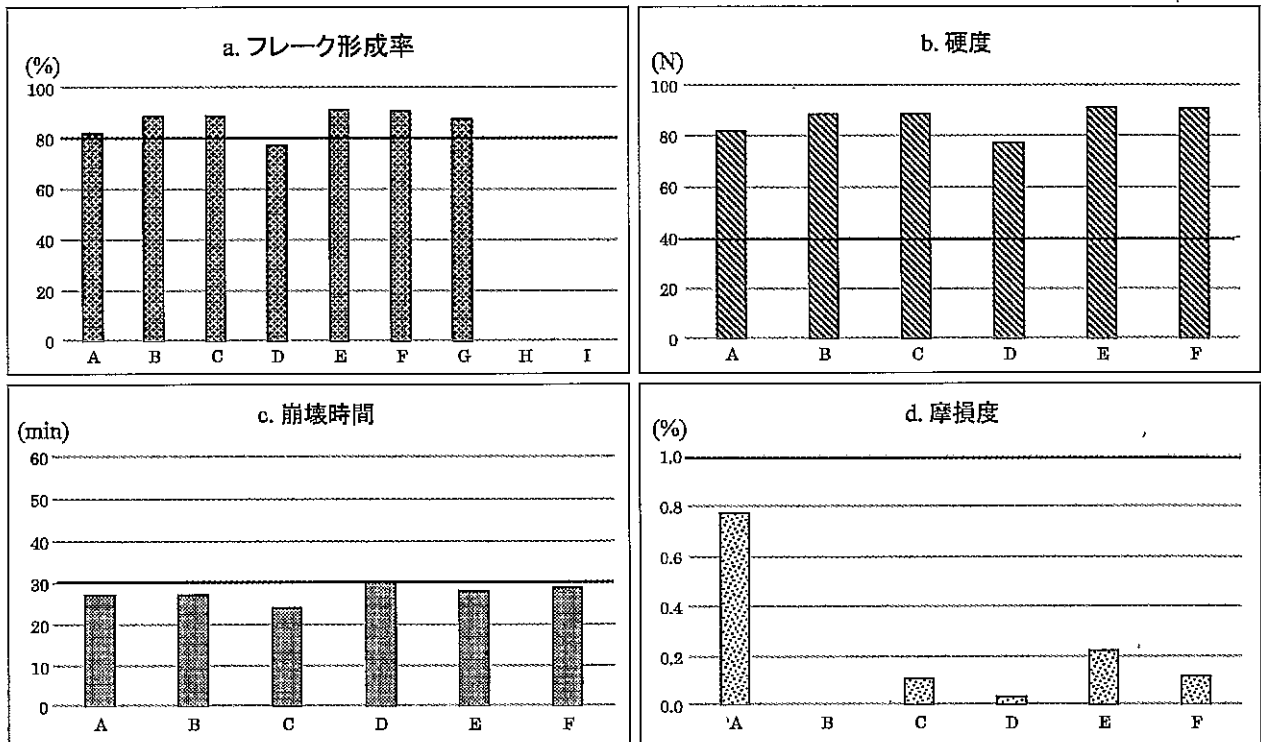


Fig. 1 添加剤の違いによる造粒品及び打錠品の特性に及ぼす影響

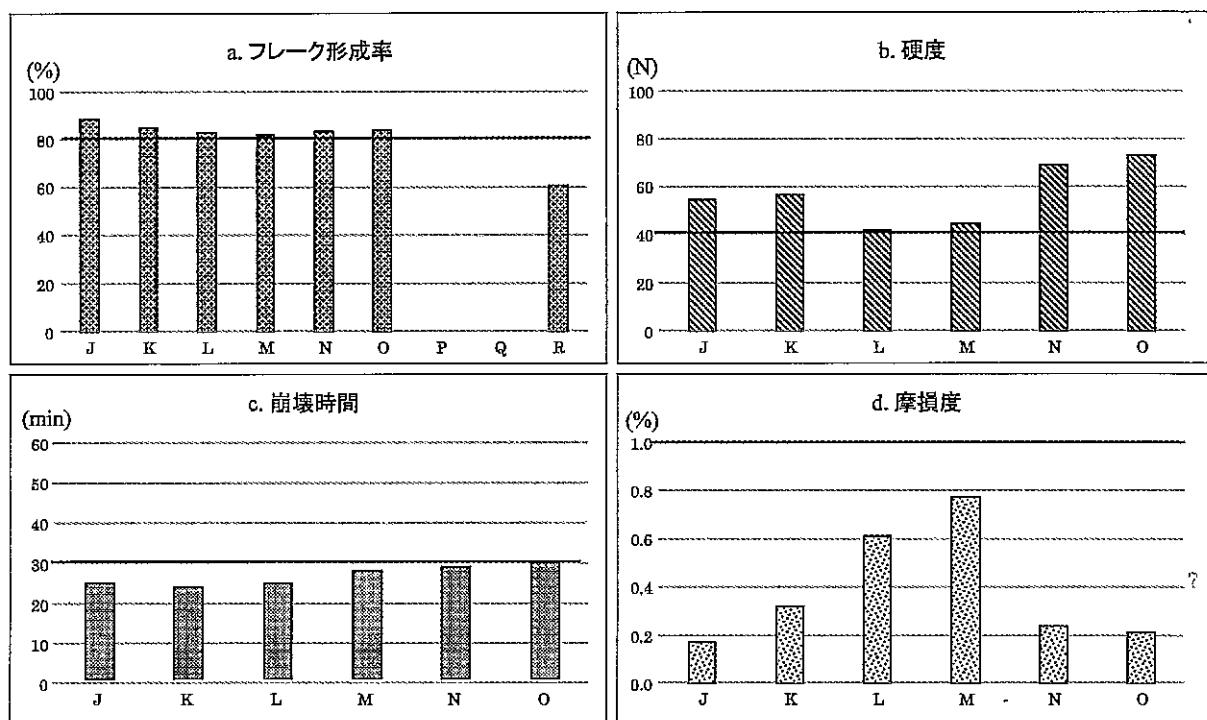


Fig. 2 添加剤の配合量の違いによる造粒品及び打錠品の特性に及ぼす影響

## 文 献

- 1) 永井秀昌ら, 「漢方エキス含有錠剤の設計に関する研究」, 平成25年度 富山県薬事研究所報 (41), 33-35, 2014
- 2) 伊東宏子ら, 「乾式造粒による漢方エキス含有チュアブル錠に関する製剤設計-芍薬甘草湯エキスをモデル薬物として-」, 家庭薬開発研究, No.35, 22-28, 2016

# トウキの栽培技術改良試験 —高温障害を防止するマルチング素材の検討—

田村 隆幸, 大江 勇

## Studies on improvement of the cultivation method of *Angelica acutiloba* Kitagawa

Takayuki TAMURA, Isamu OE

### 要 約

近年、本県のトウキ慣行栽培法において用いられる黒マルチが、高温障害による枯死の原因になっていることが推定された。そこで、生存率が高い栽培法へ改良することを目的とし、地温上昇を抑制するマルチング素材を用いて比較栽培試験を実施した。その結果、黒マルチと比較して、白マルチ（表面：白色、裏面：黒色）又は稲ワラでの栽培では、いずれも生存率が向上し、かつ1株当たりの生薬収量が増加した。これらを用いたマルチ栽培は、高温障害による枯死を防止し、安定した収量を確保する栽培法への改良に活用できる。

### Summary

In recent years, we estimated that black film mulch on cultivation for *Angelica acutiloba* Kitagawa (conventional method of Toyama Prefecture) caused the death by the high temperature injury. Therefore, for the purpose of establishing the new cultivation method with the high survival rate, mulching materials which controlled a rise of soil temperature was examined. As a result, the survival rate improved and yields increased by using white film mulch (outside : white, inside : black) or the straw in comparison with black film mulch. These results contribute to establishing the new cultivation method to obtain a stable yield by prevention of the death by the high temperature injury.

キーワード：トウキ, 栽培, マルチ

Key words : *Angelica acutiloba* Kitagawa, cultivation, mulch

生薬「当帰(トウキ)」は、第17改正日本薬局方<sup>1)</sup>(以下、「日局17」という。)において、「トウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa 又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino の根を、通例、湯通ししたものである」と規定され、貧血、冷え症などの婦人科疾患に用いられる漢方処方をはじめとして、強壯、鎮静、鎮痛等の作用を期待して多くの処方に配合される。日本漢方生薬製剤協会による平成25年度及び平成26年度の使用量調査<sup>2)</sup>において、当帰は年間約947トン使用されるが、国産品は約20%にすぎない(平成25年度と26年度の平均値)。

近年、日本漢方生薬製剤協会は原料生薬の安定調達の見地から国内自給率の向上を目指して、国(農林水産省及び厚生労働省)とともに薬用作物の産地化に向けたブロック会議(平成25~27年度)及び地域相談会(平成28年度)を国内8地域で開催している。これら会議等では、生薬の実需者(漢方薬メーカー等)と生産者のマッチングを推進するため、トウキが北陸地域で栽培を目指す品目として提示されていることから、今後、県内での栽培拡大が想定

される。しかし、栽培拡大を図り、栽培を定着させるうえで解決すべき栽培上の課題がある。

近年の県内におけるトウキの栽培及び生産状況については、農家数は20~30戸、生薬の年間生産量は約500kgで、ほぼ横ばいに推移しているが、当該年度の気象の影響等により反収は増減が激しい。その主な原因として推定されるのが、抑草のため慣行法で用いられる黒マルチで、これが地中温度の異常な高温により枯死を引き起こしていると考えられる。ポリエチレン製マルチは、その低い通気性による過湿を原因とする病害発生や生育への影響が懸念されるが、使用可能な除草剤が少ない現状(平成28年3月31日現在、定植後に使用できるのは全面土壌散布で1剤、畦間土壌散布で1剤のみ)においては省力栽培への必要性が高い。さらに、マルチの土壌水分の保持能力は、苗の定植後の活着促進や夏期の干害防止という大きな利点となる。

そこで、高温障害が発生せず、生存率が高く、安定した収量の確保を実現する栽培法へ改良することを目的とし、奈良県で有用性が報告<sup>3)</sup>されている白マルチと伝統的な栽

培法で用いられる稲ワラについて、本県におけるトウキの生存や生育に対する影響を比較検討した。

## 実験方法

### 1. 植物材料

#### (1) 種子

平成22年8月、薬用植物指導センターにおいて継代栽培するトウキ *A. acutiloba* 3年生株から採取した種子を用いた。

#### (2) 苗

平成23年4月に播種し、育成した1年生苗を平成24年4月に掘り上げ、根頭部の径が約7mmの個体を試験に供した。

### 2. 比較検討するマルチング素材

#### ①黒マルチ (素材: ポリエチレン)

雑草の抑制目的で使用するが、黒色のため地温が高温になりやすく、場合によってはトウキ枯死の原因となる。

#### ②白マルチ (素材: ポリエチレン)

表面が白色、裏面が黒色の2層構造で、地温の上昇を抑え、かつ抑草効果は黒マルチと同等である。黒マルチより高額であるため費用対効果を見極めて使用する必要がある。

#### ③稲ワラ

乾燥防止や夏期の地温を抑制し、通気性や抑草効果もあることから伝統的なトウキ栽培に用いられるが、抑草効果はポリエチレン製マルチより劣り、また入手が困難な場合がある。

### 3. 栽培方法

#### (1) 基肥 (10 a 当たり)

乾燥鶏糞300kg, 苦土石灰100kg, 過燐酸石灰60kg, 化成肥料 (N:P:K=15:15:15) 40kg

#### (2) 整畦

畦幅 (上底) 80cm, 畦高20cm

#### (3) 定植

平成24年4月12日, 苗を株間25cm, 条間40cmの2条チドリ植えて, 根の先端を畦の中央部に向けて斜めに定植した。

#### (4) マルチング

黒マルチ及び白マルチは苗の定植前に施し, 定植する位置は直径10cmの円形に切り取った。稲ワラは, 苗の定植直後に畦の全体に敷き詰めた。

#### (5) 追肥 (10a当たり)

6月21日に油粕50kg, 過燐酸石灰20kg, 化成肥料 (N:P:K=15:15:15) 30kgを, 8月23日に化成肥料 (N:P:K=15:15:15) 20kgを施した。

#### (6) 収穫・調製加工

平成24年12月3日に地下部を掘り取り, 慣行法に従い, 土を軽くたたき落として軒下で乾燥 (一次乾燥) した。平成25年2月, 地上部及び葉柄の基部を切除し, 地下部を水に漬けてもどし, 水洗後, 湯もみ洗いを実施し, 日陰で自然乾燥 (仕上げ乾燥) した。

### 4. 調査

#### (1) 試験区

3種類のマルチング素材がトウキの生育及び生薬の品質に及ぼす影響を明らかにするため, 次の3種の試験区を設置した。各試験区での栽培株数は, 2回反復の合計で236株とした。

①黒マルチ区, ②白マルチ区, ③稲ワラ区

#### (2) 生育調査

生存については6月4日, 7月17日, 9月18日及び11月28日の4回, 草丈については6月4日, 7月17日及び9月18日の3回実施した。収量については, 生薬として調製加工後の重量を測定した。なお, 抽苔した株については, 全ての調査対象から除外した。

また, 生薬中のエキス含量を日局17生薬試験法 (希エタノールエキス定量法) に準じて測定した。

#### (3) 地中温度の測定

平成24年6月28日から9月20日までの間, 各試験区の土壌の深さ5cmにおける地中温度を, データロガー (㈱ティアンドディ製, おんどとり Jr.TR-52i) により記録した。

## 結 果

### 1. 各試験区の地中温度 (深さ5cm)

夏期のトウキ枯死の原因と推定される地中温度の異常高温について検討するため, トウキ根の上部が存在する位置である, 深さ5cmの地中温度を各試験区で測定した。

特に試験区間での地中温度の差が大きかった8月下旬から9月上旬の地中温度を図1に示す。

当該期間の最高地温については, 黒マルチ区では56.5°Cであったのに対し, 白マルチ区では37.6°C, 稲ワラ区では31.3°Cであった。当該期間の最低気温については, 黒マルチ区では19.7°C, 白マルチ区では21.8°C, 稲ワラ区では22.4°Cであり, また, 平均地温については, 黒マ

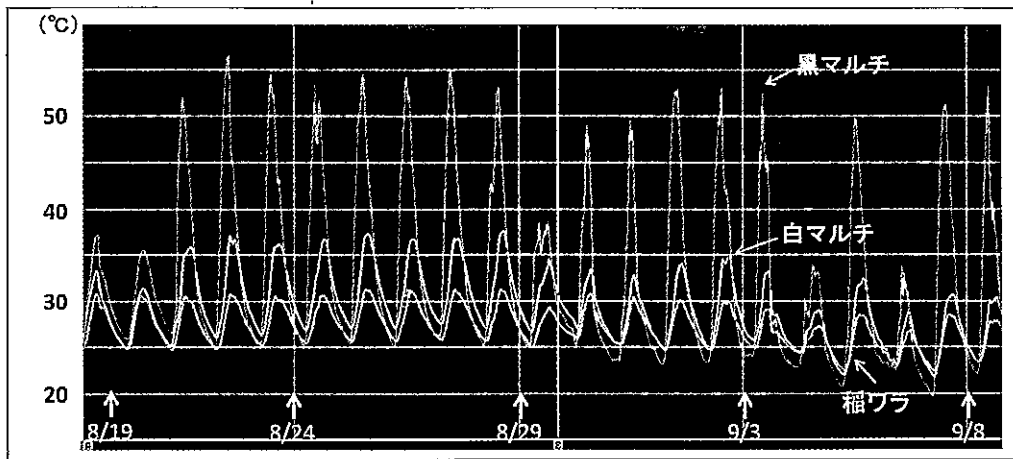


図1 各試験区の深さ5cm 地中温度 (平成24年 8/19~9/8)

ルチ区では32.7℃, 白マルチ区では29.2℃, 稲ワラ区では27.1℃であった。

## 2. マルチング素材の生存率への影響

各試験区の生存率の推移を図2に示す。

7月17日には、どの試験区においても91から95%の範囲でほとんど差がなかったが、9月18日には、黒マルチ区で74.1%に減少したのに対し、白マルチ区では85.6%にとどまった。稲ワラ区では75.9%で、黒マルチ区よりやや高かった。

収穫直前である11月28日における生存率は、黒マルチ区で71.1%、白マルチ区で80.2%、稲ワラ区で75.0%

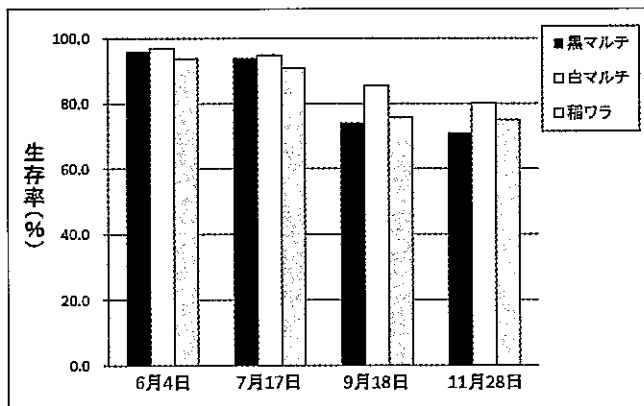


図2 各試験区の生存率の推移

であり、白マルチ区の生存率が最も高かった。

## 3. マルチング素材の草丈への影響

各試験区の草丈の推移を図3に示す。

6月4日の草丈については、黒マルチ区では16.5cm、白マルチ区では14.2cm、稲ワラ区では13.8cmで、黒マルチ区の地上部の生育が他の試験区より良好であった。

7月17日には、黒マルチ区では27.8cm、白マルチ区では27.6cmで、白マルチ区の生育が黒マルチ区に追いついたが、稲ワラ区では24.2cmと、少し生育が遅れていた。7月17日における各試験区の生育状況を図4に示す。

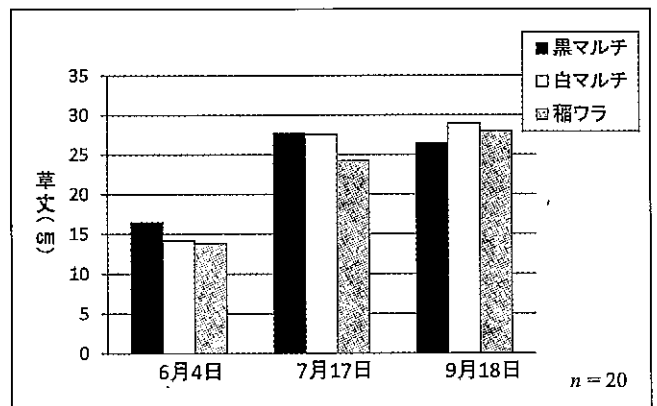


図3 各試験区の草丈の推移

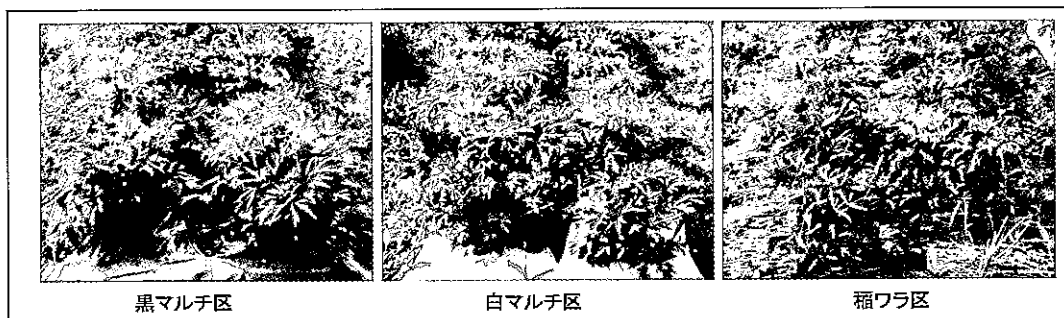


図4 各試験区の生育状況 (平成24年7月17日)



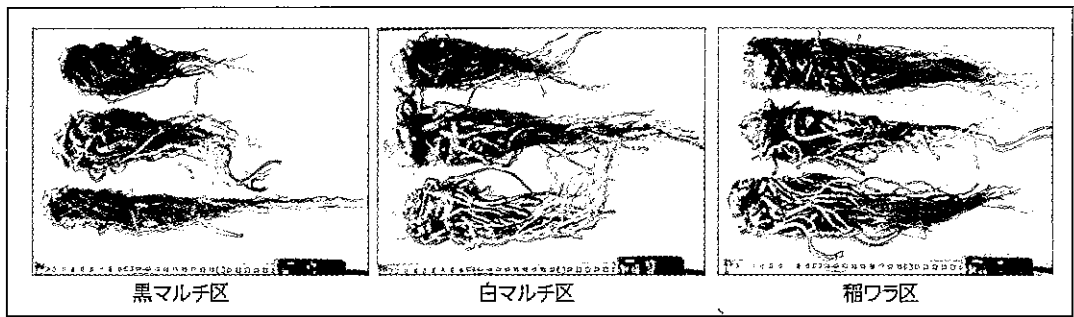


図5 各試験区の調製加工した生薬の外観

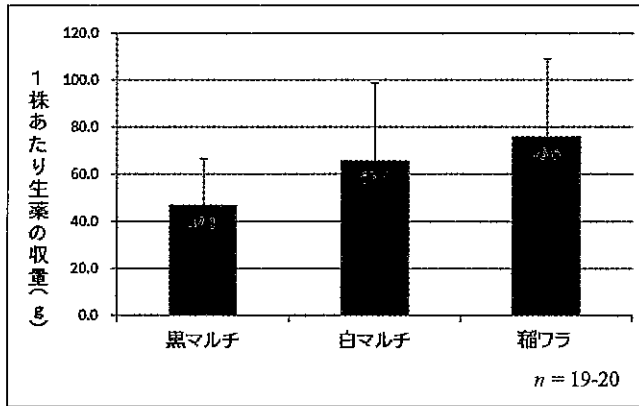


図6 各試験区の調製加工した生薬の収量

9月18日には、黒マルチ区では26.5cm、白マルチ区では29.0cm、稲ワラ区では28.0cmで、ほとんど差はないものの、白マルチ区が最大であった。

#### 4. マルチング素材の生薬収量への影響

各試験区の調製加工した生薬（図5）の収量を図6に示す。

1株あたりの生薬の重量は、黒マルチ区の47.1gに対して白マルチ区では65.7gと約1.4倍で、稲ワラ区では75.6gと約1.6倍であった。

#### 5. エキス含量

どの試験区のエキス含量も日局17の規格（35.0%以上）に適合した。

黒マルチ区及び稲ワラ区では、それぞれ39.9%及び40.0%で同等であったが、白マルチ区では44.6%と、やや高い含量であった。

### 考 察

近年のトウキ栽培における枯死の原因として、黒マルチによる地温の異常高温が推定されたことから、地温上昇を抑制できるマルチング素材として、白マルチ及び稲ワラの有効性を検討した。実際に黒マルチ下の深さ5cm地中温

度を測定したところ、8月下旬から9月上旬の最高地温は56.5℃となり、白マルチ区の37.6℃又は稲ワラ区の31.3℃よりはるかに高かった。7月17日までは試験区間で生存率に差がなかったが、9月18日の調査では黒マルチ区で枯死株が増加し、生存率が減少したのは、この夏期の異常な高温が影響したと考えられた。また、稲ワラ区でも9月18日の生存率が白マルチ区より低かったのは、夏期の雨量が少ない時期に乾燥したことが影響したと考えられる。11月28日の収穫直前の生存率が最も高かったのは白マルチ区で80.2%であった。これは、高温障害や干害を防止した結果であると思われるが、その他の原因の枯死が約20%ある。これは、定植する苗の乾燥等による活着不良、病虫害等によるものであるため、総合的な栽培管理により生存率をさらに上昇させる必要がある。

草丈の推移については、6月4日の調査において黒マルチ区が他の試験区より高いのは、定植後の地温が適度に上昇し、生長を促進させたものと思われる。9月18日の調査においては、試験区間でほとんど差がなかったが、黒マルチ区のみ7月の草丈より減少しており、夏期の黒マルチ下での高温による障害と考えられた。

1株あたりの生薬の重量については、稲ワラ区が最大で、次が白マルチ区であったが、生存率を考慮して10アールあたりの生薬収量として算出すると、黒マルチ区では167kgであったのに対し、白マルチ区では263kg、稲ワラ区では284kgとなった。

過去から黒マルチが用いられてきたのは、比較的安価で抑草効果が高く、春の苗の植付け後に地温を適度に上昇させることによる初期生育の促進などのためである。近年まで枯死の原因として大きな問題にならなかったのは、本格的に気温が上昇する7月下旬にはトウキの葉が畦を日陰にするまでに繁茂し、黒マルチによる地温の上昇がある程度は抑制されていたためである。しかし近年、5～6月でも30℃以上になる日もあり、また、苗の定植が遅れると7月下旬に地上部が繁茂してない事例が多いことから、トウキ栽培におけるマルチング素材には白マルチ又は稲ワラを用いる栽培を推奨する。白マルチは黒マルチより高価である

が、本試験では、資材費の上昇分以上に収益が増加する試算結果となった（データ未掲載）。稲ワラについては、抑草効果はあるもののポリエチレン製マルチと比較すると除草の作業が多くなり、強風による飛散防止措置も必要である。白マルチと稲ワラのどちらを用いるかについては、稲ワラが容易に入手可能かどうかや栽培の環境及び規模等を勘案し、選択する必要がある。

また、エキス含量については、どの試験区でも日局17の規格（35.0%以上）に適合し、白マルチ区でやや高い傾向が見られた。これは、根の形状が影響した可能性がある。生薬トウキは主根部と側根部で構成されるが、エキス中の多くを占める糖含量（主にショ糖）は主根部の方が高いと推定されるため、白マルチ区では主根が増量した可能性が考えられる。本試験では主根部と側根部を分けて検討していないため、今後、エキス含量の検討を実施する際には、これに留意する必要がある。

## 文 献

- 1) 厚生労働省：第17改正日本薬局方，1866（2016）
- 2) 日本漢方生薬製剤協会：原料生薬使用量等調査報告書—平成25年度および平成26年度の使用量—（2016）
- 3) 浅尾浩史：マルチ資材がヤマトトウキの生育に及ぼす影響，奈良県農業総合センター研究報告，43，68-70（2012）

# V 資 料

# 「平成28年度分析データ信頼性確保事業」事業報告

## External quality control for laboratories of pharmaceutical companies in 2016

竹林 憲司, 横田 洋一, 大戸 幹也

Kenji TAKEBAYASHI, Yoichi YOKOTA and Mikiya OHTO

富山県における医薬品生産金額は近年順調な伸びを示しており、平成27年にはついに全国第1位（7,325億円）となり、さらなる躍進が期待されている。その躍進のために取り組むべき戦略の1つとして、平成25年富山県医薬品産業活性化懇話会では「製造技術力等の強化」（品質管理技術力の向上など）が提言されており、県内製薬企業の技術力を向上させるため、様々な施策を実施しているところである。その一環として、一般社団法人富山県薬業連合会との共同事業で、県内製薬企業の品質管理部門を対象に外部精度管理を実施し、県内製薬企業の試験検査能力の調査及び技術指導を行う本事業を平成21年度から実施している<sup>1,2,3)</sup>。

平成27年度においては、pH測定、水分測定、定量（UV法）、定量（HPLC法）及び溶出試験について実施したところ、「満足」「疑わしい」の割合が91%であり、普段の業務の試験では気づくことができなかった試験上の問題点を見出すことができたことから、今後もさらに改善すべき課題があると考えられた<sup>4)</sup>。そのため平成28年度においては、前年度に問題があった試験項目を中心とし、旋光度測定を追加して実施し、結果解析、原因調査及び改善指導を行ったので、その概要について報告する。

### 1. 実施方法

#### (1) 試験項目及び試験方法

試験項目は、L-トレオニンのpH測定及び旋光度測定、没食子酸プロピルの定量（UV法）、日局ベタメタゾン錠の定量（HPLC法）、日局アラセプリル錠12.5mgの溶出試験とした（下表参照）。なお、pH測定、旋光度測定及び定量（UV法）については、市販試薬を対象品目として用い、参加企業に対象品目名を知らせなかった。

没食子酸プロピルの定量（UV法）は医薬品添加物規格に準じた試験方法とした。その他の試験項目については、日本薬局方に準じた試験方法とした。ただし、日局ベタメタゾン錠の定量（HPLC法）は、内標準溶液調製等の操作を一部変更し、日本薬局方のおり錠剤の粉碎品を秤取して試料溶液を調製する方法（以下、試験方法1）と、錠剤10錠を粉碎せずにそのままメスフラスコへ投入して試料溶液を調製する方法（以下、試験方法2）の両方について実施した。

表 試験項目及び参加企業数等について

試験種別	試験項目	対象品目	主な使用機器	参加企業数
原薬試験	pH測定	L-トレオニン	pH計	38
	旋光度測定	L-トレオニン	旋光計、乾燥機	28
	定量（UV法）	没食子酸プロピル	分光光度計、乾燥機	35
製剤試験	定量（HPLC法）	日局ベタメタゾン錠	HPLC	24
	溶出試験	日局アラセプリル錠12.5mg	溶出試験器、分光光度計、乾燥機	12

#### (2) スケジュール

平成28年10月27日に実施説明会を開催し、参加企業に試験方法等を説明して試料等を配布し、当所への試験結果報告期限を12月12日とした。報告内容をとりまとめて(3)評価方法により評価し、その評価結果に応じて原因調査、改善指導及び再試験依頼等を実施した。また、平成29年3月27日に報告会を開催し、参加企業に対して結果を説明し、改善指導を行った。

なお、実施説明会においては、試験機器メーカー（日本分光株）の技術担当者を外部講師として、旋光計の適切な管理方法及び使用方法に関する講習会も併せて開催した。

### (3) 評価方法

危険率1%で Grubbs の方法により検定を行い、異常値と判断されたデータを棄却した後、ISO/IEC Guide 43 (JIS Q 0043) に従い、ロバスト法の第1四分位数 Q1, 第3四分位数 Q3 及びメジアン Q2 から次のように Z スコアを求めて判定した。

$$Z = (X_i - Q_2) / \{(Q_3 - Q_1) \times 0.7413\}$$

| Z | ≤ 2 満足

2 < | Z | ≤ 3 疑わしい

| Z | > 3 不満足

※Xi: 各参加企業の報告値

ただし、pH 測定は、「平均値±0.1以内」の場合は Z スコアの値に関わらず「満足」と判定することとした。

### (4) 評価結果に基づく対応

「不満足」の業者に対しては、原因調査（聞き取り調査等）及び改善指導を実施するとともに、再試験を依頼した。また、「疑わしい」の企業に対しても、原因調査及び改善指導を実施した。さらに、再試験を依頼した「不満足」の企業及び再試験を希望した「疑わしい」の企業から、再試験結果の報告を受け、初回試験の Q1, Q2 及び Q3 を用いて Z スコアを算出し、再度評価した。

## 2. 結果及び考察

### (1) L-トレオニンの pH 測定

報告された pH 値を評価したところ、L-トレオニンの pH 測定については、38社のうち36社が平均値±0.1以内のため「満足」であった。残り2社が「不満足」であったが、再試験では「満足」と判定される結果が得られた（図1～3参照）。

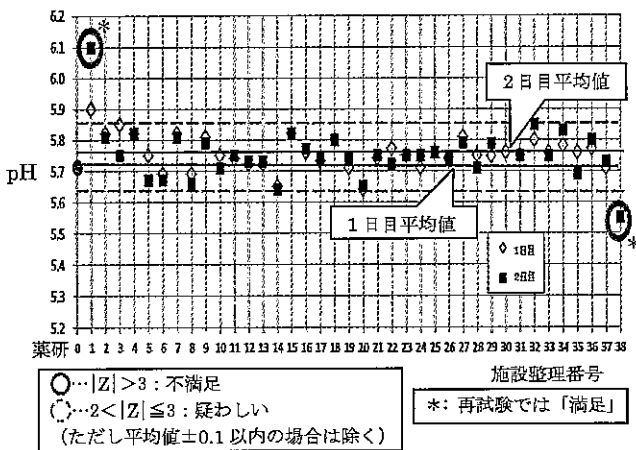


図1 L-トレオニンの pH 測定の報告値

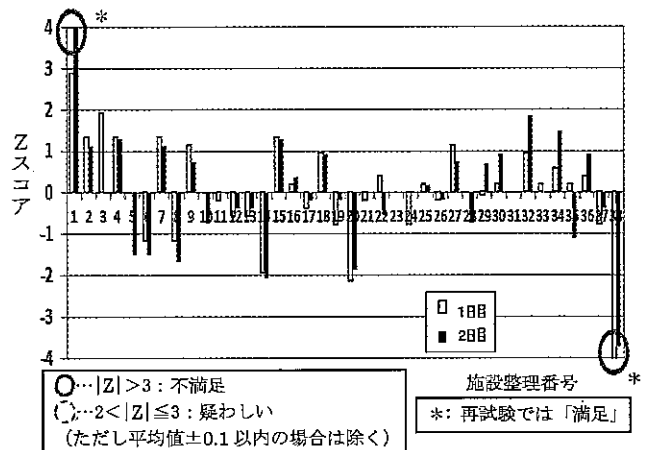


図2 L-トレオニンの pH 測定の Z スコア

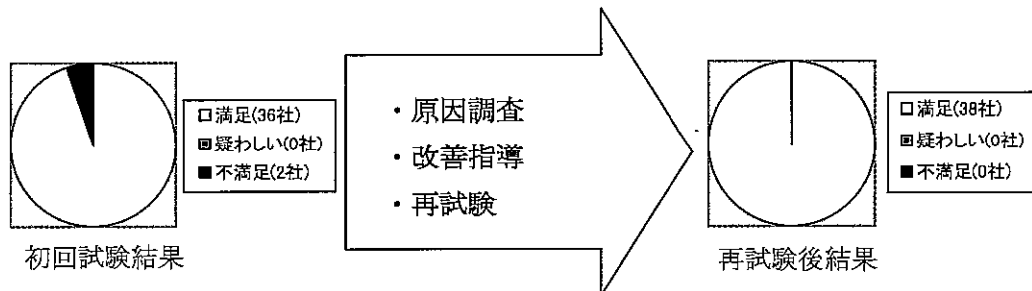


図3 L-トレオニンの pH 測定の評価結果

結果が「不満足」となった原因を調査したところ、1社は初回試験時は表示値の安定化に時間がかかっており、電極を交換して再試験を実施すると改善した。電極の異常が原因と考えられた。電極の汚れ、内部液量及び応答性等について日常点検を実施し、必要に応じて、内部液交換、電極洗浄又は電極交換等の対応を行うことが望ましいと考えられた。なお、装置を2台以上所有している場合は、定期的に器差を確認することが望ましいと考えられた。

また、「不満足」と判定された残りの1社の原因を調査したところ、試験者ではなく装置が自動で値を判定する機能を用いてpH測定を行っており、pHの値が安定していない状態で値を読んでいたことが原因と考えられた。自動判定機能を使用する場合は、装置の設定内容を充分把握し、試験者による判定と差がないことも確認することが必要と考えられた。

## (2) L-トレオニンの旋光度測定

28社のうち、1社が「疑わしい」、3社が「不満足」と判定された。また、そのうち2社は再試験では「満足」と判定される結果が得られた。(図4~6参照)

結果が「疑わしい」又は「不満足」となった原因を調査したところ、初回測定時に装置の異常音が発生していた事例があった。セル内に気泡又は汚れがあったとき、光路を遮るものが存在したとき、またはセルが傾いていたときなどに、装置の異常音が発生することがあるので、測定時にそのような異常があったことが原因と考えられた。測定の際は、そのような異常がないことや異常音が発生していないことを確認することが望ましいと考えられた。

また、自動ではなく、目視で測定する装置を使用していたため、正確に測定することができなかったと考えられる事例もあった。そのような装置を使用する際は、あらかじめ測定時の精度や正確性を把握したうえで使用することが必要であると考えられた。また、装置自体の異常がないことを確認するため、日常点検では標準旋光板を使用すること、定期点検では標準旋光板又は標準試料(スクロース溶液)を用いて点検することが望ましいと考えられた。

なお、今回使用した装置の光源については、ナトリウムランプが20社、LEDランプが4社、ハロゲンランプが4社であり、光源の違いによる測定値への影響は見られなかった。日本薬局方ではナトリウムランプ以外の光源を用いることも認められているが、あくまで代替法として認められているものであるため、試料の品目によっては影響することが考えられるので、品目毎にナトリウムランプで測定した場合と差がないことを確認してから使用することが望ましい。

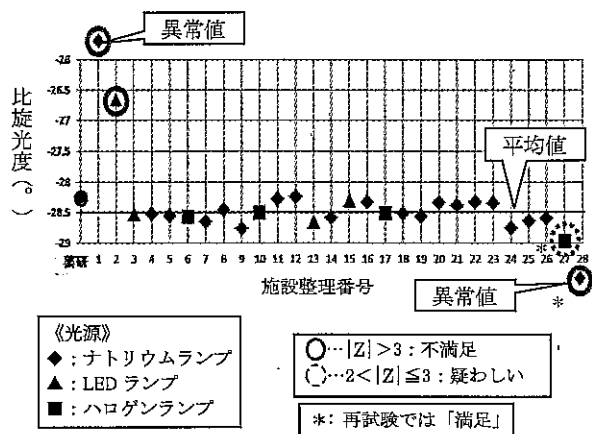


図4 L-トレオニンの旋光度測定の報告値

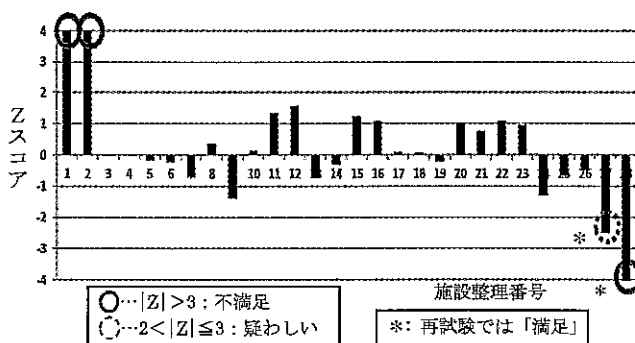


図5 L-トレオニンの旋光度測定のZスコア

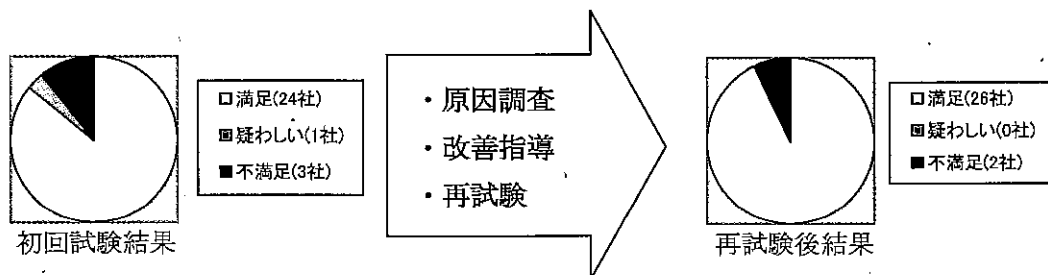


図6 L-トレオニンの旋光度測定の評価結果

(3) 没食子酸プロピルの定量 (UV法)

35社のうち、全社が「満足」と判定される結果が得られた (図7~9参照)。

全体的にバラつきが大きかったのは、試料、試験方法及び装置などに要因があったものと考えられた。校正用光学フィルターを用いて分光光度計を定期点検すること、及び器具等由来の汚染に注意して正確に調製することが重要である。

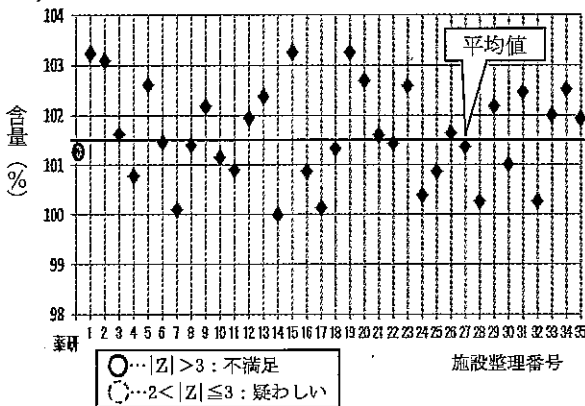


図7 没食子酸プロピルの定量 (UV法) の報告値

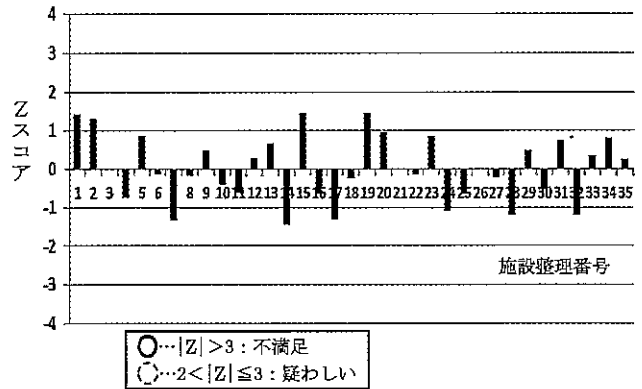


図8 没食子酸プロピルの定量 (UV法) のZスコア

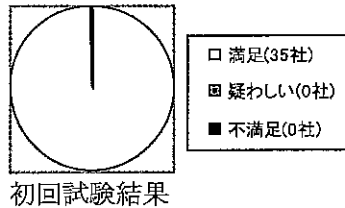


図9 没食子酸プロピルの定量 (UV法) の評価結果

(4) 日局ベタメタゾン錠の定量試験 (HPLC)

試験法1 (粉砕あり) と試験法2 (粉砕なし) では、24社のうちそれぞれ1社が「疑わしい」と判定され、「不満足」の判定はなかった。また、試験法1で「疑わしい」と判定されたその1社は、再試験にて「満足」と判定される結果が得られた (図10~14参照)。

結果が「疑わしい」又は「不満足」と判定された原因を調査したところ、標準溶液や試料溶液の調製に問題があった可能性が考えられた。秤量及び調製作業が含量値に大きく影響するので、基本的な操作を正確に実施するよう注意することが重要であると考えられた。

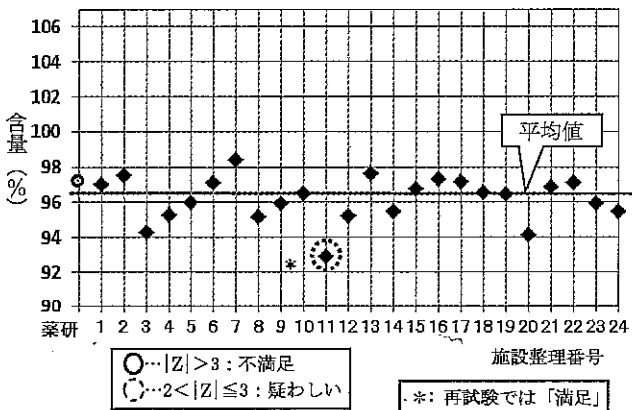


図10 日局ベタメタゾン錠の定量試験 (HPLC法, 試験法1・粉砕あり) の報告値

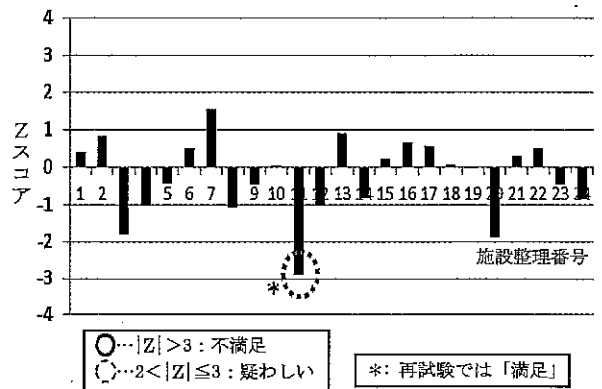


図11 日局ベタメタゾン錠の定量試験 (HPLC法, 試験法1・粉砕あり) のZスコア

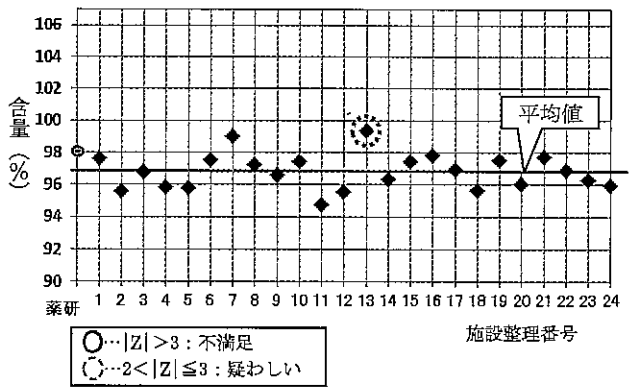


図12 日局ベタメタゾン錠の定量試験 (HPLC 法, 試験法2・粉碎なし) の報告値

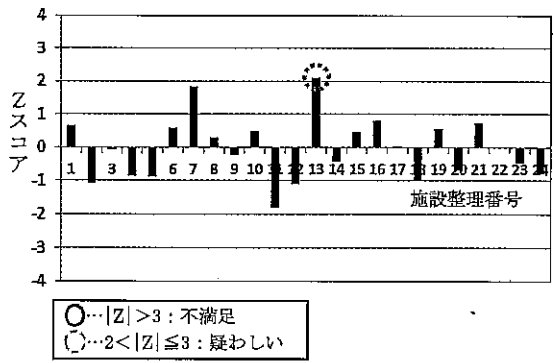


図13 日局ベタメタゾン錠の定量試験 (HPLC 法, 試験法2・粉碎なし) のZスコア

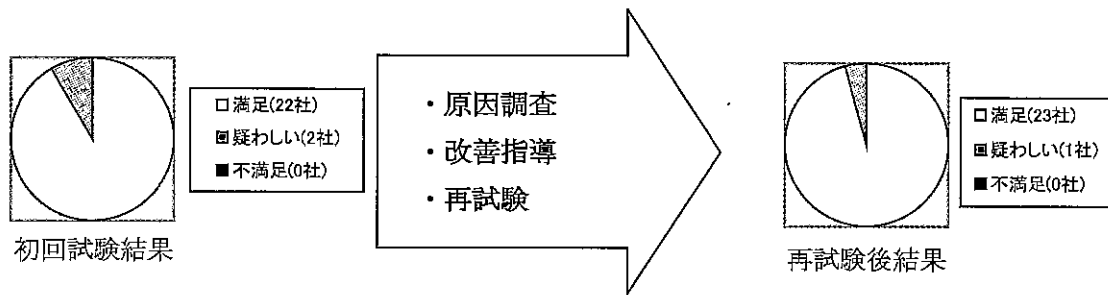


図14 日局ベタメタゾン錠の定量試験 (HPLC 法) の評価結果

薬事研究において、試験法1(粉碎あり)の試料溶液調製時の振とうの強さを変えて比較したところ、弱く振とうした場合は、ダマが残って抽出不足となり、含量値が小さくなった(88.1%)。一方、強く振とうした場合は、ダマがなくなって抽出効率が上がり、試験法2(粉碎なし)と同等の100%に近い含量値が得られた(97.6%)。これらのことから、試験法1(粉碎あり)においては、試料溶液調製時の振とうを充分強く実施する必要があると考えられた。なお、試験法1(粉碎あり)で「疑わしい」と判定された参加者は、試験法2(粉碎なし)においても含量値は低めの値となっていたことから、振とう操作の強さ以外に原因があると考えられた。

参加者によっては、粉碎方法や篩過の有無で試料溶液の調製方法に違いがあったが、それらによる含量値への影響は見られなかった。

(5) 日局アラセプリル錠12.5mgの溶出性

12社のうち、全社が「満足」と判定される結果が得られた(図15~17参照)。

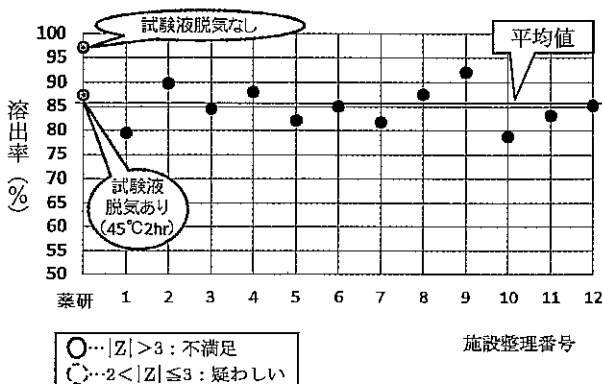


図15 日局アラセプリル錠12.5mgの溶出試験の報告値

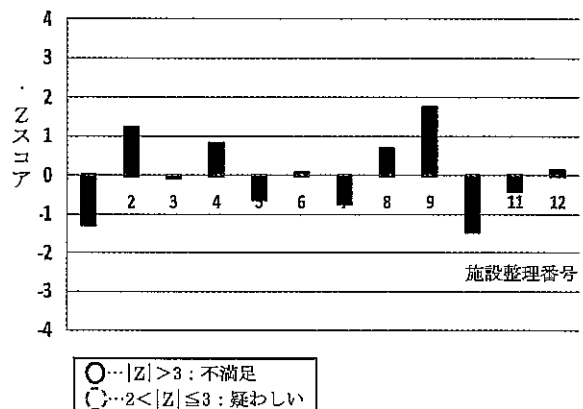
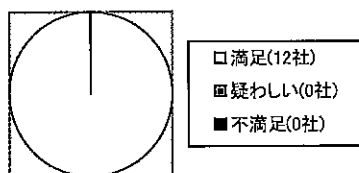


図16 日局アラセプリル錠12.5mgの溶出試験のZスコア





初回試験結果

図17 日局アラセプリル錠12.5mgの溶出試験の評価結果

薬事研究所において、本品目について、脱気していない試験液を用いて試験した場合と45℃ 2時間で加温脱気した試験液を用いて試験した場合とを比較したところ、脱気していない場合は溶出率が高くなった（図15参照）。このことから、今回の参加者においては、本品目の溶出試験を実施するにあたり適切な脱気が行われていたと考えられた。

日本薬局方においては試験結果に影響を及ぼす場合は脱気する必要がある旨が記載されており、品目によってその影響の大きさは異なる。本品目のように大きく影響する品目も存在するので、品目毎に試験液の脱気の必要性に注意するとともに、適切な方法で脱気することが重要であると考えられた。

### 3. まとめ

今年度5項目の試験について実施したところ、全体として「満足」「疑わしい」の割合は96%（のべ137社中132社）であり、前年度の91%（のべ160社中146社）より良好な結果であった。

装置等の異常が原因と考えられた事例があったが、もし普段の使用時にその異常を発見することができていれば、問題となる結果とはならなかったはずである。日常点検や過去のデータとの比較など、異常の有無を使用の都度確認することが重要である。また、発見し難い異常が発生する可能性もあることから、定期的な点検及び器差確認等を実施することも重要と考えられた。

今回も「不満足」や「疑わしい」の判定結果が得られた施設は、改善に向けて原因調査や再試験等に積極的に取り組む姿勢が見られた。また、本事業への参加を通して、普段の業務の試験では気づくことができなかった試験上の問題点を見出すことができたと考えられる。今後も県内製薬企業の試験技術力の向上とその水準の維持に寄与し、県内医薬品産業のさらなる発展につなげていきたい。

### 文 献

- 1) 寺崎さち子, 横田洋一, 出町幸男, 製薬企業の品質管理部門を対象とした外部精度管理, 富山県薬事研究所年報, 39, 69-76
- 2) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成25年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 41, 41-47
- 3) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成26年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 42, 39-45
- 4) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成27年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 43, 35-40

## VI 誌上・学会発表など

## 1. 原著の抄録

家庭薬研究 36, 34-41 (2017)

### HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 9 報)

#### — 八味地黄丸エキス・牛車腎気丸エキス中のロガニンの分析 —

黒崎 之予, 奥野 康之, 大根谷 章浩, 堀井 周文, 小此木 明, 横田 洋一

これまで、生薬成分について、高速液体クロマトグラフィーに使用するカラムを日本薬局方 (JP) 等の公定書で汎用される粒径 5  $\mu\text{m}$ 、内径 4.6 mm、長さ 150 mm のカラム (以下 150mm カラム) から粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 4.6 mm、長さ 75 mm のカラム (以下 75mm カラム) に変更することで分析時間の短縮化を図ってきた。以前、JP における定量法で保持時間が 25 分と長いサンシュユ中のロガニンの分析短縮化を検討した。本年度は漢方製剤への応用を考え、汎用される八味地黄丸エキス及び牛車腎気丸エキスのロガニンの分析時間の短縮を検討したところ、選定した 75 mm カラムでは、分析時間は約 1/2 から約 1/3 にまで短縮された。また、ロガニンの近傍の未同定成分のピーク分離度はそれぞれ 1.5 以上を満たし、含量についても 150mm カラムと同様の値であり、定量には問題がないことが確認された。

家庭薬研究 36, 26-33 (2017)

### 医薬品試験の効率化に関する検討 (第 4 報)

#### — グラジエント法を用いた解熱鎮痛薬成分の分析法の検討 —

森元 久美子, 島倉 征一, 亀田 奈穂美, 前川 知子, 齊藤 令奈, 坂田 康平, 横田 洋一

グラジエント法は高速液体クロマトグラフィーにおいて移動相の組成を連続的に変化させることで成分を溶出させる分離法である。これにより、複数の成分を短時間に溶出させることが可能であり、試験効率化に有効である。しかし、グラジエント法は使用する機器により保持時間の差が大きく、再現精度が良くないため、医薬品の定量試験において、本法を積極的に選択することはほとんどない。今回、アセトアミノフェン、エテンザミド及びカフェインの同時定量をモデル試験系として、試験の再現精度及び医薬品の定量試験における実用性について検証した。その結果、グラジエントプログラムと実際の移動相の混合比の変化との時間差を考慮して、グラジエントプログラムを設定することで、異なる機器を使用した場合においても、保持時間を一致させることが可能であることが明らかとなった。また、内標準物質とのピーク面積の比の再現性も良好であり、グラジエント法を定量試験に用いることに問題はないことが示された。

家庭薬研究 36, 42-48 (2017)

### シクロデキストリンを用いた苦味マスキング法の検討と評価 (第 2 報)

菅原 崇, 早苗 秀敏, 杉窪 克哉, 西村 友快, 布目 基倫, 奥谷 和寛, 山田 篤志,  
霜鳥 武司, 横山 慎一, 澤田 裕史, 廣谷 武史, 向 勝臣, 八木 清, 安住 新吾,  
明官 勇雄, 永井 秀昌 (富山県薬事研究会製剤部会)

口腔内崩壊錠に活用できる効果的な苦味マスキング法の確立を目的として、マスキング法の一つである化学的マスキング法について検討し、味認識装置を用いて苦味評価を行った。今回は、クロルフェニラミンマレイン酸塩を 4 倍モル比の  $\alpha$ -及び  $\beta$ -CyD で包接化させ、顆粒化することによって錠剤を試作し、苦味をマスキングした錠剤での評価を行った。顆粒化には噴霧乾燥造粒法及び真空凍結乾燥法を用い、得られた粉体をロータリー式打錠機で打錠し、錠剤を得た。得られた錠剤の苦味を味認識装置で定量した結果、噴霧乾燥造粒法では  $\alpha$ -CyD が、真空凍結乾燥法では  $\beta$ -CyD に強い苦味の抑制が認められた。今後、新たな口腔内崩壊錠を設計する上で、本手法による苦味マスキングは有用な手段であると考えられる。

## 2. 講演・学会発表

「TLRのアダプター分子 TRIF を介した視床下部炎症と摂食制御異常の解析」

渡邊 康春, 長井 良憲, 高津 聖志

第37回日本炎症・再生医学会, 2016, 6, 17, 京都.

「インフラマソームの活性化を阻害する, 天然物による自然免疫と炎症の調節」

高津 聖志

第18回免疫サマースクール2016, 2016, 7, 13, 函館.

「IL-5-producing ILC2s regulate T cell-independent IgA production in the large intestine」

Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K.

Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Drug Development, 2016, 8, 25-26, Basel.

「Betulin restores TGF- $\beta$ - and PGE2-induced immunosuppression in vitro and suppresses tumor growth of B16 melanoma in mice」

Ogasawara M, Matsunaga T, Ohto M, Kawasuji T, Nagai Y, Takatsu K.

Joint Symposium on Pharmaceutical Research and Drug Development, 2016, 8, 26, Basel.

「服用性に優れた, 漢方エキス含有チュアブル錠の製剤設計に関する研究」

島谷 隆夫, 伊東 宏子, 木村 隆仁, 永井 秀昌, 明官 勇雄

第33回和漢医薬学会学術大会, 2016, 8, 27, 東京

「生薬及び切花の安定生産を目指したシャクヤク園芸品種の採花方法の検討」

田村 隆幸, 朱姝, 白川 愛扇, 小松 かつ子, 吉松 嘉代

日本生薬学会第63回年会, 2016, 9, 24-25, 富山.

「ダイオウの栽培研究(2) -系統選抜と栽培年数について-」

堀田 健一郎, 葛 躍偉, 浅沼 舞, 村上 守一, 田村 隆幸, 當銘 一文, 朱姝, 児玉 容, 清水 秀樹, 菱田 敦之, 吉松 嘉代, 小松 かつ子<sup>1</sup>

日本生薬学会第63回年会, 2016, 9, 24-25, 富山.

「甘草成分イソリクイリチゲニンは内臓脂肪組織の炎症・線維化を抑制する」

本田 裕恵, 渡邊 康春, 長井 良憲, 松永 孝之, 岡本 直樹, 平井 嘉勝, 高津 聖志

日本生薬学会第63回年会, 2016, 9, 25, 富山.

「小児を対象とした, 服用性に優れた漢方エキス含有口腔内崩壊錠の製剤設計に関する研究」

島谷 隆夫, 伊東 宏子, 木村 隆仁, 永井 秀昌, 明官 勇雄

日本生薬学会第63回年会, 2016, 9, 25, 富山.

「天然薬物イソリクイリチゲニンは自然免疫系に作用し, 内臓脂肪組織の線維化を抑制する」

渡邊 康春, 長井 良憲, 本田 裕恵, 高津 聖志

第37回日本肥満学会, 2016, 10, 8, 東京.

「世界に羽ばたく「薬都とやま」の実現に向けて～製剤開発・創薬研究支援ラボ～」

高津 聖志

第44回研究会フォーラム富山「創薬」, 2016, 10, 11, 富山.

「免疫難病の治療を目指した天然薬物シーズによる創薬開発」

高津 聖志, 長井 良憲, 岡本 直樹

北陸技術交流テクノフェア2016, 2016, 10, 20-21, 福井.

「富山シャクヤクのブランド化推進事業について」

川筋 透

平成28年度富山県試験研究機関研究員交流集会, 2016, 10, 26, 富山.

「骨髄移植による副腎白質ジストロフィー 発症抑制機構の解明：レシピエントマウスの生化学的解析」

大山 拓郎, 富田 勇, 螺澤 太郎, 松本 隼, 守田 雅志, 渡辺 志郎, 渡邊 康春, 長井 良憲, 高津 聖志,  
山本 誠二, 石井 陽子, 笹原 正清, 今中 常雄

第128回薬学会北陸支部会, 2016, 11, 27, 石川.

「未来創薬の実現に向けて：甘草成分イソリクイリチゲニンによる内臓脂肪の炎症・線維化の抑制」

高津 聖志

和歌山医科大学特別セミナー, 2016, 12, 1, 和歌山.

「Agonistic effects of synthetic derivatives of funiculosin on mouse/human TLR4/MD-2.」

Okamoto N, Honda H, Akashi-Takamura S, Nagai Y, Takatsu K.

第45回日本免疫学会学術集会, 2016, 12, 5, 沖縄.

「Adipose tissue neutrophils are primed by the interaction with adipocytes.」

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K.

第45回日本免疫学会学術集会, 2016, 12, 7, 沖縄.

「漢方薬と生薬の現状と課題」

高津 聖志

松本市ヘルスパレー構想講演会, 2016, 12, 10, 長野.

「IL-5 を産生する自然リンパ球による炎症制御」

高津 聖志

和歌山医科大学特別セミナー, 2016, 12, 15, 和歌山.

「経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチン用アジュバント開発のための基盤研究」

宮本 (山口) 朋美, 柳橋 努, 本田 裕恵, 小林 紗綾香, 松永 孝之, 山崎 輝美, 渡邊 康春, 長井 良憲,

高津 聖志

第10回次世代アジュバント研究会, 千里ライフサイエンスセンター, 2017, 1, 23, 大阪.

「県内医薬品製造業者の分析データ信頼性確保事業 ―医薬品産業の品質管理技術方向上を目指して―」

竹林 憲司

平成28年度富山県薬事研究所研究成果発表会, 2017, 2, 13, 富山.

「ワクチン用新規アジュバント開発のための基盤研究」

宮本 朋美

平成28年度富山県薬事研究所研究成果発表会, 2017, 2, 13, 富山.

「医薬品試験の効率化に関する検討 (第4報)」

―グラジエント法を用いた解熱鎮痛薬成分の分析法の検討―

森元 久美子, 島倉 征一, 亀田 奈穂美, 前川 知子, 齊藤 令奈, 坂田 康平, 横田 洋一

第36回家庭薬開発シンポジウム, 2017, 2, 13, 富山

「HPLC法の分析時間短縮化に関する検討（第9報）」

一八味地黄丸エキス・牛車腎気丸エキス中のロガニンの分析一

黒崎 之予, 奥野 康之, 堀井 周文, 小此木 明, 大根谷 章浩, 横田 洋一  
第36回家庭薬開発シンポジウム, 2017, 2, 13, 富山

「シクロデキストリンを用いた苦味マスキング法の検討と評価（第2報）」

菅原 崇, 早苗 秀敏, 杉窪 克哉, 西村 友快, 布目 基倫, 奥谷 和寛, 上西 篤志, 霜鳥 武司, 横山 慎一,  
澤田 裕史, 廣谷 武史, 向勝 臣, 八木 清, 安住 新吾, 明官 勇雄, 永井 秀昌  
第36回家庭薬開発シンポジウム, 2017, 2, 13, 富山

「キアゲハの忌避物質に関する研究」

南 和輝, 阪森 宏治, 田村 隆幸, 仲島 義貴, 西殿 悠人, 福井 麻琴, 田中 陽一郎, 佐藤 雅史, 小澤 理香,  
高林 純示, 田中 謙  
日本薬学会第137年会, 2017, 3, 25-27, 仙台.

「キアゲハによる食害を受けたトウキのプロテオーム解析」

加藤 梨紗, 伊奈 隆年, 田村 隆幸, 田中 謙  
日本薬学会第137年会, 2017, 3, 25-27, 仙台.

### 3. 共同研究論文リスト

Nagai Y, Honda H, Watanabe Y, Takatsu K. : Chapter 30 Potential therapeutic natural products for the treatment of obesity-associated inflammation by targeting TLRs and inflammasomes. In “Chronic Inflammation -Mechanisms and Regulation-” (M. Miyasaka and K. Takatsu), pp. 379-397, Springer Japan, Tokyo, 2016.

Nagai Y, Watanabe Y, Honda H, Takatsu K. : Isoliquiritigenin: A unique licorice component that attenuates adipose tissue inflammation and fibrosis by targeting the innate immune sensors. In “Research of licorice in the past, present and future - Preparation of various bioactive extracts as alternative medicines” (H. Sakagami), IN TECH, in press.

Jennings RT, Odkhuu E, Nakashima A, Morita N, Kobayashi T, Yamai I, Tanaka M, Suganami T, Haga S, Ozaki M, Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K, Kikuchi-Ueda T, Ichimonji I, Ogawa Y, Takagi H, Yamazaki T, Miyake K, Akashi-Takamura S.: Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. *Int. Immunol.*, 28 (10): 503-512, 2016.

Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Arif A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K.: HIF-1 $\alpha$  in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. *Diabetes*, 65 (12) : 3649-3659, 2016.

Iida R, Shinoda K, Hattori Y, Nagai Y, Takatsu K, Kouro T.: Fetal lymphoid progenitors become restricted to B-1 fates coincident with IL-7R $\alpha$  expression. *PLoS ONE*, Oct 28 ; 11(10) : e0165676, 2016.

Ikutani M, Tsuneyama K, Kawaguchi M, Fukuoka J, Nakae S, Arita M, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K. : Prolonged ILC2 activation by IL-33 causes pulmonary arterial hypertrophy mediated through IL-5-eosinophil axis. *JCI Insight*, in press.

長井 良憲, 高津 聖志: 自然免疫センサーによる炎症性マクロファージの制御と天然薬物による炎症制御. 週刊医学のあゆみ 第1土曜特集「代謝調節における免疫細胞の役割」Vol.257, No.6, 613-619, 2016.

Yanagibashi T, Satoh M, Nagai Y, Koike M, Takatsu K.: Allergic diseases: From bench to clinic - Contribution of the discovery of interleukin-5. *Cytokine*, in press.

#### 4. 知的所有権

##### (1) 特 許

発 明 の 名 称	登 録 番 号
食後血中中性脂肪濃度上昇抑制剤及び飲食品	特許第 4815421 号
がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物	特許第 5548874 号
インフラマソーム活性制御剤	特許第 6036193 号
ラッカーゼ及びそれを用いたエピテアフラガリン類の製造法	特許第 6047813 号

##### (2) 特許出願

名 称	出 願 ・ 公 開 番 号
抗齶蝕性口腔用組成物及び飲食品	特開 2009-221191
抗歯周病性口腔用組成物及び飲食品	特開 2009-219484
IL-1 及び TNF 活性阻害剤	特願 2013-271897 PCT 国際出願 (PCT/JP2014/084076)
抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体 BD-17】	特開 2017-081915
抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体 BD-23等】	特開 2017-081864
乾式造粒物及び該乾式造粒物を含有する固形製剤並びにそれらの製造方法	特願 2016-025366
自然免疫を活性化する粘膜ワクチン用アジュバント	特願 2016-072240