

IV 研究報告

ショウガオール及びギンゲロールの Maus 精管電気刺激収縮に対する作用と TRPV1 活性化の関与

川筋 透

Effect of Shogaol and Gingerol on the Twitch Response to Electrical Stimulation in the Isolated Mouse Vas Deferens and Involvement of TRPV1 Activation

Toru KAWASUJI

要 約

ショウガオールとギンゲロールは、それぞれ乾姜と生姜の辛味成分である。ショウガオールとギンゲロールは、TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) 活性化物質として知られている。ショウガオールとギンゲロールの Maus 精管の電気刺激収縮に対する作用をトウガラシの辛味成分であるカプサイシンと比較検討した。ショウガオールとギンゲロールは、低濃度 (0.3-1 μ g/mL) で Maus 精管の twitch 収縮反応を顕著に抑制した。ショウガオールは高濃度 (3-10 μ g/mL) で、初期抑制とともに収縮増大を示した。強い TRPV1 活性化物質であるカプサイシンは、極めて低濃度 (0.01 μ g/mL) で Maus 精管の twitch 収縮反応を顕著に抑制した。ショウガオール、ギンゲロール及びカプサイシンの twitch 収縮抑制作用は、反復適用で減弱した。また、TRPV1 アンタゴニストのカプサゼピン (10 μ M) は、ショウガオール、ギンゲロール及びカプサイシンの twitch 収縮抑制作用を減弱させた。これらのことから、ショウガオールとギンゲロールは、Maus 精管において TRPV1 の活性化を介したカプサイシン様作用を有することが示唆された。また、ショウガオールは神経刺激性反応を増大させる活性を有する可能性が考えられた。

Summary

Shogaol and gingerol is a pungent constituent of the processed ginger and ginger, respectively. Shogaol and gingerol are known as TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) activators. Effects of shogaol and gingerol on the twitch response to electrical stimulation in the isolated mouse vas deferens were investigated with capsaicin, a pungent constituent of capsicum. Shogaol and gingerol showed the remarkable twitch-inhibition at low concentrations (0.3-1 μ g/mL). Shogaol, at high concentrations (3-10 μ g/mL), showed the twitch-potential with initial twitch-inhibition. Capsaicin, a strong TRPV1 activator, showed the twitch-inhibition at very low concentrations (0.01 μ g/mL). Repeated application showed the reduction of twitch-inhibitory effect of shogaol, gingerol and capsaicin. In addition, capsazepine (10 μ M), a TRPV1 antagonist reduced the twitch-inhibitory effect of shogaol and gingerol and capsaicin. These results suggest that shogaol and gingerol possess the capsaicin-like twitch-inhibitory effect via TRPV1 activation in the mouse vas deferens. Furthermore, shogaol may possess the potentiating effect on neurogenic response.

キーワード：ショウガオール、ギンゲロール、カプサイシン、精管、電気刺激、TRPV1

Key words : Shogaol, gingerol, Capsaicin, Vas deferens, Electrical stimulation, TRPV1

ショウガ (ジンジャー) は食品・医薬品分野で頻用され¹⁾、ショウガ由来の2つの生薬であるカンキョウ (乾姜) とショウキョウ (生姜) は、漢方薬に区別して配合される^{2,3)}。たとえば、大建中湯と葛根湯には、それぞれカンキョウとショウキョウが配合される。ショウガの根茎を湯通し又は蒸してから乾燥するのがカンキョウで、ショウキョウにはそのような熱処理工程がないという違いがある²⁾。日本薬局方の品質試験では、カンキョウとショウキョウの指標成分として、辛味成分のショウガオール ([6]-shogaol) とギンゲロール ([6]-gingerol) がそれぞ

れ用いられ、ショウガオールは、ギンゲロールの加熱処理によって生成する二次産物とされている^{1,2)}。ショウガオールとギンゲロールには多くの薬理作用が報告されているが²⁾、乾姜と生姜の使い分けと生物活性との関係は、十分解明されているとは言えない。

唐辛子の強力な辛味成分であるカプサイシンは、TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) を活性化することが知られており^{4,9)}、辛味成分のショウガオールとギンゲロールも TRPV1 を活性化する作用を有することが知られている^{4,10,11)}。TRPV1 は、熱、酸、辛

味物質など複数の刺激で活性化するカルシウムイオン透過性の高い非選択性陽イオンチャネルで、TRPサブファミリーのTRPVに属している。

マウスの精管を低頻度で電気刺激すると、交感神経系の神経終末から神経伝達物質が遊離し、神経の興奮が平滑筋に伝わり、一過性の単収縮 (twitch) が連続的に生じる¹²⁾。各種の薬理作用物質が抑制作用を示し、神経伝達機構と筋収縮機構に対する生物活性を検出できる実験系である。鎮痙薬のパパベリン、血管拡張作用を有するカルシウム拮抗薬のニフェジピン、 α_2 -アドレナリン受容体遮断薬のクロニジン、オピオイド受容体への結合性を有する止瀉薬のロペラミド、アデノシン A_1 受容体作動薬のシクロペンチルアデノシンなどに低濃度で twitch 収縮抑制作用がみられている^{13,14)}。

当所では、薬用植物指導センターで栽培しているシャクヤクの生物活性に基づく品質試験として、鎮痙・鎮痛作用との関連性から、マウス精管の電気刺激収縮実験を行っている¹³⁾。漢方薬にシャクヤクと同時配合される生薬類の成分についても、同じ実験系で生物活性を検討し、これまでに甘草成分のイソリクイリチゲニンや桂皮成分のシンナムアルデヒドに顕著な twitch 収縮抑制作用がみられている^{16,17)}。

今回、日本薬局方で指標成分として用いられる辛味成分のショーガオールとギンゲロールについて、強い辛味成分で TRPV1 活性化物質であるカプサイシンとともに、マウス精管の電気刺激収縮実験で生物活性を比較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

ショーガオール (和光純薬, 局方試験用, [6]-shogaol), ギンゲロール (和光, 局方試験用, [6]-gingerol), カプサイシン (和光), カプサゼピン (和光, 細胞生物学用) を使用した。

2. マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対する作用の検討

ICR 系雄性マウスを頸椎脱臼で致死し、精管を摘出した。マウスの精管1本では発生張力が小さいので、同じマウスからの2本の精管を並列につないで使用した。すなわち、2本の精管の下端は固定棒と一緒に結びつけ、上端は小さい金属リングに通した糸で2本の精管を連結した。小リングは糸を介してアイソメトリックトランスジューサー (TB-651T, 日本光電) に連結した。精管標本は、1対のリング状白金電極の中に通した状態で、34℃の McEwen 液 (130 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM $CaCl_2$, 0.9

mM NaH_2PO_4 , 25.0 mM $NaHCO_3$, 13.1 mM スクロース及び 11.1 mM グルコース) を満たした 30 mL のマグナス槽内に懸垂した。電気刺激装置 (バイオメディカルサイエンス社) で発生した矩形波パルス (持続時間 1 msec, 刺激頻度 0.1 Hz) を栄養液中に通電し、電場刺激によって生じる一過性の単収縮 (twitch) を等尺性に記録した。なお、白金電極のリングの外側は、ポリエチレン樹脂で被覆し、外側に電流が流れないようにした。標本を懸垂し、約 0.15 g の静止張力のもとで電気刺激を開始した。30分後に栄養液を1回交換し、その後、電気刺激を行いながら30分経過してから検体を適用し、twitch 収縮反応の変化を60分間記録した。

検体適用直前の twitch 収縮反応の振幅に対する振幅減少率から抑制率を算出した。

ショーガオール、ギンゲロール、カプサイシン、カプサゼピンは、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用し、マグナス槽内での DMSO の終濃度は、0.33% とした。

検体の反復適用による作用の変化をみる場合は、最初の検体投与で60分間 twitch 収縮反応を記録した後、マグナス槽内の栄養液を数回交換した後、電気刺激収縮を60分間記録し、収縮が安定してから、2回目の検体を適用した。

TRPV1 アンタゴニストであるカプサゼピン存在下での検体の作用をみる場合は、カプサゼピンを60分間適用した後、電気刺激を中断している間にバルーンに混合ガスを補充し、収縮が安定してから、検体を適用して収縮反応を記録した。

実験結果

1. マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対するショーガオール及びギンゲロールの作用

ショーガオールは、0.3 μ g/mL の低濃度から、マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対して顕著な抑制作用を示した (Fig.2, Fig.3)。60分間の最大抑制率に基づき算出した50%抑制に要する濃度である IC_{50} 値は 0.55 μ g/mL (2.0 μ M) であった。

ショーガオールの 1 μ g/mL では、収縮の戻りが観察され、3-10 μ g/mL では顕著な収縮増大が観察された。

ショーガオールの反復適用の場合、1-10 μ g/mL の2回目の適用では、1回目の適用でみられた twitch 収縮抑制作用がほとんどみられなくなった (Fig.4)。3 μ g/mL では、収縮増大の程度が大きくなった (Fig.4B)。

ギンゲロールは、0.3 μ g/mL の低濃度から、顕著な

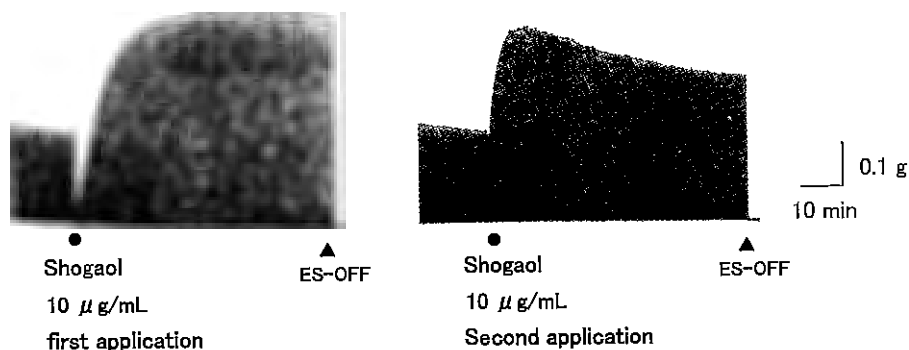


Fig.2 Typical recording of shogaol-induced twitch-inhibition and twitch-potential in the isolated mouse vas deferens.

Shogaol was dissolved in DMSO and was added to the bath at the point indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) was stopped at the point indicated. The second application of [6]-shogaol was done 60 min after the exchange of organ bath fluid.

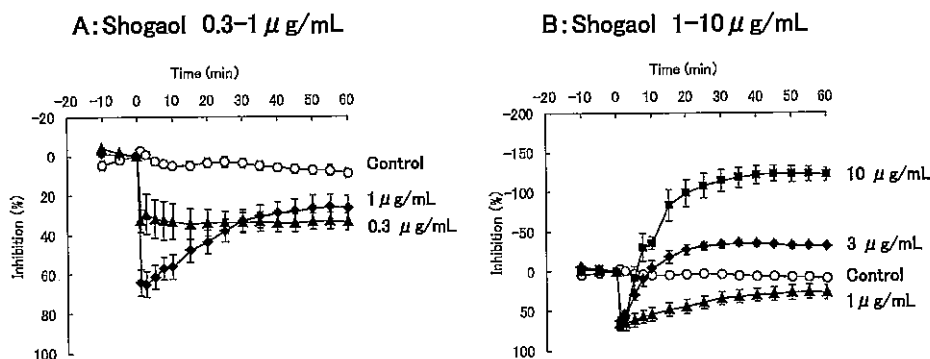


Fig.3 Effect of shogaol on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Shogaol was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

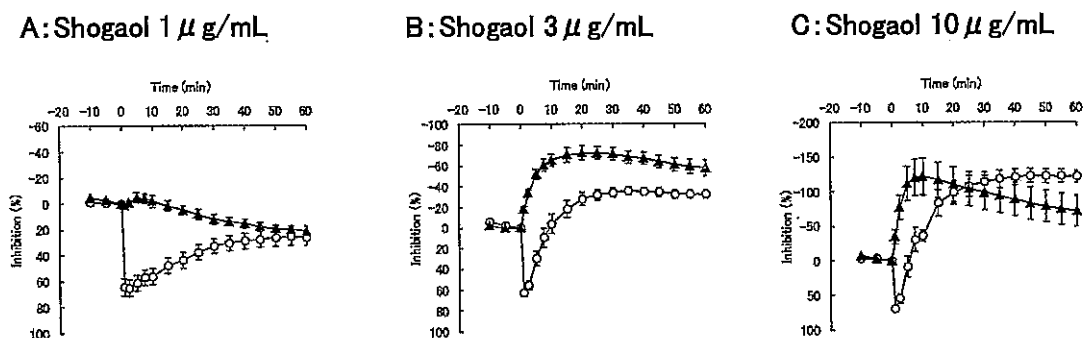


Fig.4 Effect of repeated application of shogaol on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

○ : First application of shogaol, ▲ : second application of shogaol after removal of shogaol. Shogaol was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

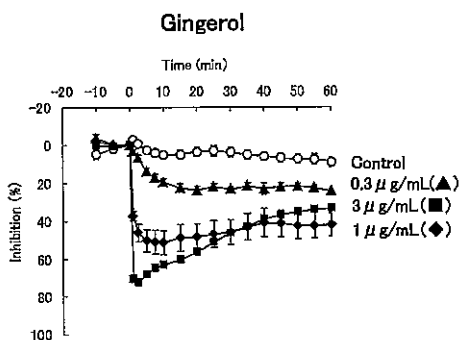


Fig.5 Effect of gingerol on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Gingerol was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 4 experiments.

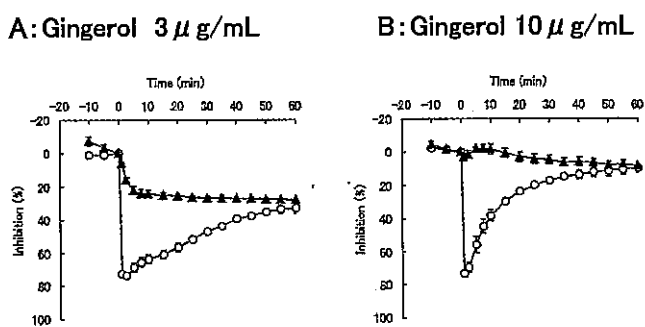


Fig.6 Effect of repeated application of gingerol on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

○ : First application of gingerol, ▲ : second application of gingerol after removal of gingerol. Gingerol was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

twitch 収縮抑制作用を示した (Fig.5). ギンゲロールの IC_{50} 値は $0.94 \mu\text{g/mL}$ ($3.1 \mu\text{M}$) であった.

ギンゲロールの $3 \mu\text{g/mL}$ では収縮の戻りがみられ、 $10 \mu\text{g/mL}$ では収縮の戻りが顕著となった. ギンゲロールでは、ショーガオールと異なり、 $3-10 \mu\text{g/mL}$ で、収縮の増大はほとんど観察されなかった (Fig.6).

ギンゲロールの反復適用の場合、 $3 \mu\text{g/mL}$ の2回目の適用では、1回目の適用でみられた twitch 収縮抑制作用が減弱し、 $10 \mu\text{g/mL}$ の2回目の適用では、twitch 収縮抑制作用が消失した (Fig.6). ギンゲロールでは、ショーガオールと異なり、 $3-10 \mu\text{g/mL}$ の2回目の適用で、収縮増大は観察されなかった (Fig.6).

2. マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対するカプサイシンの作用

カプサイシンは、 $0.003 \mu\text{g/mL}$ という極めて低い濃度から、マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対して顕著な抑制作用を示した (Fig.7). カプサイシンの IC_{50} 値は $0.0013 \mu\text{g/mL}$ ($0.0043 \mu\text{M}$) であった.

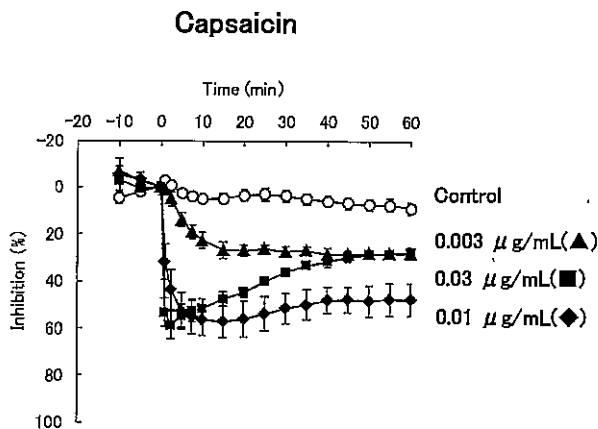


Fig.7 Effect of capsaicin on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Capsaicin was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

カプサイシンの $0.03 \mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で収縮の戻りがみられ、 $3 \mu\text{g/mL}$ で収縮の増大が観察された (Fig.8). カプサイシンの反復適用の場合、 $0.03 \mu\text{g/mL}$ 以上の2回目の適用で、1回目の適用でみられた twitch 収縮抑制作用が大きく減弱またはほとんどみられなくなった. $3 \mu\text{g/mL}$ の2回目の適用では、1回目とともに twitch 収縮の増大が観察された (Fig.8).

3. カプサイシン、ショーガオール及びギンゲロールの twitch 収縮抑制作用に対するカプサゼピンの作用

TRPV1 アンタゴニストであるカプサゼピン ($10 \mu\text{M}$) は、マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対して増大作用を示した (Fig.9). 適用の約 30 分後で twitch 収縮増大作用はほぼ最大となり、60 分経過後も twitch 収縮の増大状態は維持された.

カプサゼピン ($10 \mu\text{M}$) の存在下で、カプサイシン ($0.03 \mu\text{g/mL}$), ショーガオール ($1 \mu\text{g/mL}$) 及びギンゲロール ($3 \mu\text{g/mL}$) の twitch 収縮抑制作用は顕著に減弱した (Fig.10).

考 察

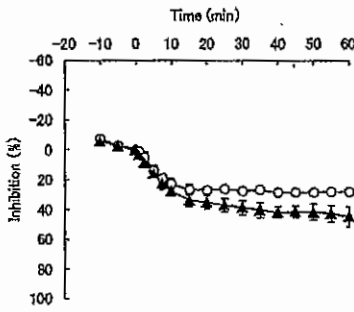
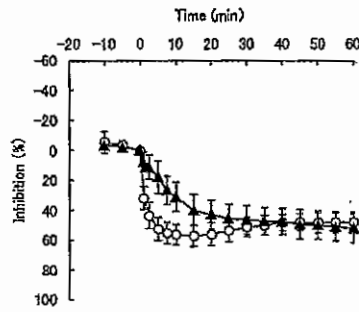
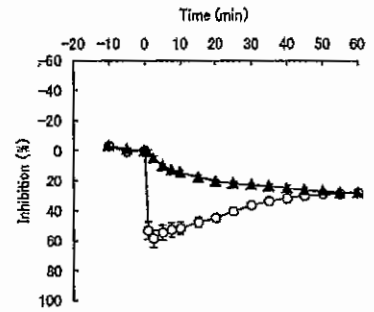
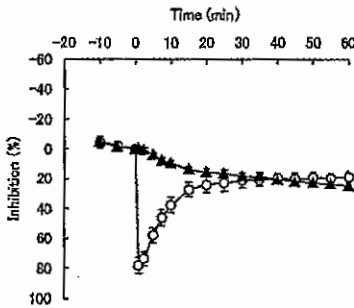
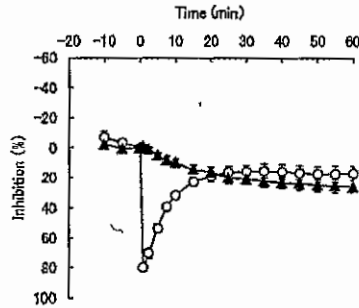
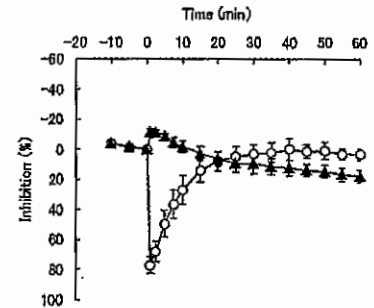
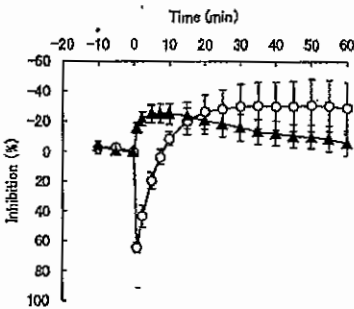
カプサイシンは極めて低濃度から、twitch 収縮抑制作用を示し、TRPV1 アンタゴニストであるカプサゼピンは、カプサイシンの抑制作用を減弱させたことから、カプサイシンの顕著な twitch 収縮抑制作用は、マウス精管のカプサイシン感受性知覚神経上の TRPV1 の活性化を介したものと考えられた. カプサイシンは、マウス精管の twitch 収縮を抑制することが報告されており¹⁷⁾、今回、同様な twitch 収縮抑制作用がみられたものと思われる.

カプサイシンの作用には脱感作という現象が知られている⁴⁾. カプサイシンの強い twitch 収縮抑制を示した後は、収縮の戻りが観察されたが、脱感作が関係しているかもしれない.

ショーガオールとギンゲロールは、マウス精管の twitch 収縮反応を低濃度で抑制し、反復適用での作用の減弱は、カプサイシンと類似していた. また TRPV1 アンタゴニストのカプサゼピンによって、カプサイシンと同様に twitch 収縮抑制作用が減弱したことから、マウス精管におけるショーガオールとギンゲロールの作用点は、カプサイシンと同じ TRPV1 受容体であると考えられた.

twitch 収縮抑制作用の効力を IC_{50} 値から比較すると、ショーガオールの効力は、カプサイシンよりも約 470 倍弱く、ギンゲローの効力は、ショーガオールよりも約 1.6 倍弱いという結果であった.

精管には、散在する知覚神経と高密度の交感神経系の筋神経が存在し、カプサイシンによって知覚神経からカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) が遊離するとされている¹⁷⁾. 外からの CGRP の適用によって、電気刺激による交感神経系伝達物質の遊離が抑制されるとともに、ノルアドレナリンや ATP による収縮や電気刺激収縮が抑制されることが報告されている¹⁷⁾. マウス精管の twitch 収縮反応は、カプサイシンや CGRP で抑制され、またカプサイシンの2回目の累積濃度作用曲線では初期相が抑制され、マウス精管を CGRP で前処理すると部分

A: Capsaicin 0.003 μ g/mL**B: Capsaicin 0.01 μ g/mL****C: Capsaicin 0.03 μ g/mL****D: Capsaicin 0.1 μ g/mL****E: Capsaicin 0.3 μ g/mL****F: Capsaicin 1 μ g/mL****G: Capsaicin 3 μ g/mL****Fig.8 Effect of repeated application of capsaicin on the twitch response in the isolated mouse vas deferens**

○ : First application of capsaicin, ▲ : second application of capsaicin after removal of capsaicin. Capsaicin was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

回復することから、CGRPが取り込まれ、再遊離することが報告されている¹⁸⁾。

今回、反復適用での twitch 収縮抑制作用の減弱は、カプサイシン、ショーガオール及びギンゲロールで同様にみられており、反復適用によって、遊離する CGRP 量が減少または枯渇するために、twitch 収縮抑制作用が減弱または消失することになったものと考えられた。

TRPV1 アンタゴニストであるカプサゼピンは、twitch 収縮増大作用を示した。TRPV1 の内因性活性化物質として、プロトンやアラキドン酸代謝物などがあり⁴⁾。定常状態で TRPV1 がある程度活性化している可能性があ

る。カプサゼピンは、TRPV1 による CGRP の遊離を介した抑制性調節を解除することで、ある程度の twitch 収縮増大作用を示した可能性が考えられた。

カプサイシンは、10 μ M 以上の比較的高い濃度で、ラット精管の twitch 収縮反応を強め、脱感作もみられないことが報告されている¹⁹⁾。マウス精管におけるカプサイシンの比較的高濃度適用による twitch 収縮増大は、ラット精管の場合と同様な作用であると考えられた。

知覚神経からは CGRP 以外にもサブスタンス P (SP) などが遊離するとされており、SP はモルモット精管やラットの精管で twitch 収縮増大を示すことが報告されてい

る^{19,20)}。TRPV1が活性化すると、知覚神経から遊離するCGRPとSPが増加し、CGRPによる抑制作用とSPなどによる増大作用が混じっているのかもしれない。さらに高濃度ではTRPV1の脱感作が加わり、抑制と収縮の戻りや増大という複雑な twitch 収縮反応が生じているのかもしれない。

シヨウガオールとギンゲロールは、TRPV1とTRPA1の活性化作用を有するとされている⁴⁶⁾。TRPA1を活性化する生薬成分にはシナナムアルデヒドがある⁴⁵⁾。以前、シナナムアルデヒドは、twitch 収縮抑制作用を示し、濃度を高めると収縮の戻りが観察されている¹⁶⁾。濃度を高めると収縮の戻りがみられる点では、今回と類似性があり、シヨウガオールとギンゲロールは、TRPV1だけでなく、TRPA1も介して、マウス精管の知覚神経を刺激し、twitch 収縮反応を変化させている可能性も考えられた。

シヨウガオールは、ギンゲロールと異なり、濃度を高めると顕著な twitch 収縮増大作用がみられた。マウス精管で twitch 収縮増大作用を示す物質は、交感神経機能の低下を改善する効果が期待できるかもしれない。

TRPV1は、血管や気管支の平滑筋に存在しているとされ、CGRRP、アセチルコリン及びNOを神経終末から遊離することで血管拡張につながり、気管支平滑筋ではCa²⁺流入を促進することで気管支収縮を起こすとされている⁴⁾。シヨウガオールのやや高濃度での顕著な twitch 収縮増大作用には、Ca²⁺流入の促進などが関与している可能性もあると思われる。

辛味生薬の山椒や乾姜を配合している大建中湯は、主な薬理作用が消化管運動亢進作用と腸管粘膜血流量増加作用とされ、腸管粘膜血流量増加作用には、カプサイシン感受性知覚神経系のパニロイド受容体、すなわちTRPV1の刺激によるCGRP放出作用やアドレメデュリン産生作用などが関与しているとされている²¹⁾。シヨウガオールとギンゲロールは、カプサイシン様の twitch 収縮抑制作用がみられたことから、シヨウガオールとギンゲロールは、TRPV1の活性化でCGRPが遊離する機序で、血流改善作用を有しているものと考えられた。

マウス精管の電気刺激収縮実験は、反復適用による評価を加えることで、辛味成分を含む多くの生薬成分の作用解析に役立つ評価系であると思われる。

- 1) 食品機能性の科学, 産業技術サービスセンター (2008), p.293, p.335, p.686,
- 2) 第十七改正日本薬局方解説書, 廣川書店(2016), D-202(カンキョウ), D-475(シヨウキョウ), D-598(無コウイ大建中湯), D-675(トウガラシ)
- 3) 日本生薬関係規格集2014 (監修: 合田幸広, 袴塚高志), じほう(2014), p.117, 129, 256
- 4) Premkumar L. S.: Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals, ACS Chem. Neurosci, 5, 1117-1130 (2014)
- 4) 富永真琴: 消化管におけるTRPV1の発現と機能, 日薬理誌, 128, 78-81 (2006)
- 5) 松本健次郎, 加藤伸一, 堀江俊治: TRPチャンネルと内臓痛, 日薬理誌, 146, 233-235 (2015)
- 6) Riera C.E., Menozzi-Smarrito C., Affolter M., Michlig S., Munari C., Robert F., Vogel H., Simon S.A., Coutre J.I.: Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels, British J. Pharmacol., 157, 1398-1409 (2009)
- 7) Nakamori S., Takahashi J., Hyuga S., Tanaka-Kagawa T., Jinno H., Hyuga M., Hakamatsuka T., Odaguchi H., Goda Y., Hanawa T., Kobayashi Y.: Ephedra Herb extract activates/desensitizes transient receptor potential vanilloid 1 and reduces capsaicin-induced pain, J. Nat. Med., 71, 105-113 (2017)
- 8) 小林義典: 麻黄及びエフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFE) の鎮痛作用と副作用, YAKUGAKU ZASSHI, 137, 187-194 (2017)
- 9) 小林義典: 呉茱萸アルカロイド“エボジアミン”のTRPV1を介した生理活性, 日薬理誌, 146, 135-139 (2015)
- 10) Riera C.E., Menozzi-Smarrito C., Affolter M., Michlig S., Munari C., Robert F., Vogel H., Simon S.A., Coutre J.I.: Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels, British J. Pharmacol., 157, 1398-1409 (2009)
- 11) 吉富太一, 大嶋直浩, 後藤祐斗, 中森俊輔, 安食菜穂子, 林茂樹, 杉村康司, 瀧野裕之, 飯田修, 香川聡子, 神野透人, 川原信夫, 小林義典, 丸山卓郎: 辛味受容体TRPV1賦活性化を指標したLC-MSメタボロームによるシヨウキョウ, カンキョウの品質多様性評価について, 第46回生薬分析シンポジウム講

演要旨, p.61-73 (2017)

- 12) 毒性試験講座7 機能毒性学 (責任編集: 福原武彦, 小野宏), 地人書館 (1990), p.67-68, p.229-233
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 川筋透, 石黒尋保, 松永孝之: シンナムアルデヒド及びケイヒ酸のマウス精油電気刺激収縮に対する作用及びマウスにおける体内動態の検討, 富山県薬事研究所年報, 43, 22-27 (2016)
- 17) Donoso M.V., Hermosilla D., Navarrete C., Álvarez P., Lillo J.G., Huidobro-Toro J.P.: Reciprocal sympatho-sensory control: functional role of nucleotides and calcitonin gene-related peptide in a peripheral neuroeffector junction, *Neuroscience*. 203, 216-229 (2012)
- 18) Sheykhzade M., Gupta S., Sørensen T., Sørensen O.A., Koch H., Boonen H.C., Back O., Fjalland B.: Characterization of capsaicin induced responses in mice vas deferens: evidence of CGRP uptake, *Eur. J. Pharmacol.*, 667, 375-382 (2011)
- 19) Moritoki H., Iwamoto T., Kanaya J., Ishida Y., Ando K., Kitagawa K.: Capsaicin enhances the non-adrenergic twitch response of rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 92, 469-475 (1987)
- 20) Anthes J.C., Chapman R.W., Richard C., Eckel S., Corboz M., Hey J.A., Fernandez X., Greenfeder S., McLeod R., Sehring S., Rizzo C., Crawley Y., Shih N.Y., Piwinski J., Reichard G., Ting P., Carruthers N., Cuss F.M., Billah M., Kreutner W., Egan R.W.: SCH 206272: a potent, orally active tachykinin NK(1), NK(2), and NK(3) receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 450, 191-202 (2002)
- 21) 佐藤雄己: 消化管ペプチドで大建中湯の効果を評価する 消化管ペプチドを介したモルヒネ誘発便秘に対する大建中湯の効果, *日薬理誌*, 143, 120-125 (2014)

パクリタキセルによるマウス精管電気刺激収縮増大に対する 芍薬甘草湯の作用

川筋 透

Effect of Shakuyakukanzoto on the Paclitaxel-induced Potentiation of the Twitch Response to Electrical Stimulation in the Isolated Mouse Vas Deferens

Toru KAWASUJI

要 約

芍薬甘草湯はシャクヤクとカンゾウからなる漢方処方である。芍薬甘草湯エキスは、マウス摘出精管の電気刺激収縮に対して抑制作用を示すことを前報で示した。抗がん薬のパクリタキセルは、主な副作用として末梢神経障害を起こすことが知られており、芍薬甘草湯はこの副作用を緩和するとされている。今回、パクリタキセル、芍薬甘草湯エキス及び関連化合物のマウス精管の twitch 収縮反応に対する作用を検討した。パクリタキセル (10-30 μ g/mL, 10 μ M) は、マウス精管の twitch 収縮を顕著に増大させた。ビンクリスチン (30 μ M) はある程度の収縮増大作用を示したが、オキサリプラチン (30 μ M) には作用はみられなかった。パクリタキセルの存在下及び非存在下で、芍薬甘草湯エキスは同様に twitch 収縮抑制作用を示した。シャクヤクの主成分のペオニフリンは twitch 収縮抑制作用を示さなかった。これらの結果は、パクリタキセルはマウス精管の神経刺激性収縮を増大させる作用を有し、芍薬甘草湯はパクリタキセルの twitch 収縮増大作用を緩和する可能性が示唆された。

Summary

Shakuyakukanzoto is a traditional Chinese medicine formulation consisting of Paeoniae Radix (peony root) and Glycyrrhizae Radix (licorice). In the previous report, Shakuyakukanzoto extract showed the inhibitory effect on the twitch response to electrical stimulation in the isolated mouse vas deferens. Paclitaxel, an anticancer drug, is known to cause the peripheral neuropathy as a main side-effect. Shakuyakukanzoto is considered to attenuate this side-effect of paclitaxel. In the present study, effects of paclitaxel, shakuyakukanzoto and the related compounds on the twitch response of mouse vas deferens were investigated. Paclitaxel (10-30 μ g/mL, 10 μ M) showed the remarkable potentiation of the twitch response. Vincristine (30 μ M) showed the twitch-potentiation and oxaliplatin (30 μ M) did not show the twitch-potentiation. Shakuyakukanzoto showed the twitch-inhibitory effect in the presence and absence of paclitaxel in similar manner. Paeoniflorin, a main constituent of peony root, did not show the twitch-inhibitory effect. These results suggest that paclitaxel possesses the ability to potentiate the neurogenic contraction in the mouse vas deferens and shakuyakukanzoto may attenuate the twitch-potentiating effect of paclitaxel.

キーワード：パクリタキセル、芍薬甘草湯、精管、電気刺激

Key words : Paclitaxel, Shakuyakukanzoto, Vas deferens, Electrical stimulation

芍薬甘草湯は、シャクヤクとカンゾウの2つからなる漢方処方であり、こむら返りなどの骨格筋の痙攣・痛みを緩和するほか、消化管などの内臓平滑筋に対しても鎮痙・鎮痛作用があるとされている^{1,3)}。

マウスの精管を低頻度で電気刺激すると、神経伝達物質の遊離を介した一過性の単収縮 (twitch) が連続的に生じる。マウス精管の電気刺激収縮実験は、神経終末部に作用する薬物の評価等に用いられる^{4,5)}。

twitch 収縮抑制作用がみられた場合は、鎮痙・鎮痛作用が期待されると思われる。薬用植物指導センターで栽培しているシャクヤクの生物活性評価に、マウス精管の

電気刺激収縮実験を用いており、シャクヤクのエキスや成分、市販の芍薬甘草湯エキス等に twitch 収縮抑制作用がみられている⁶⁻⁸⁾。

抗がん薬のパクリタキセルは、副作用として末梢神経障害 (しびれ、感覚障害、痛みなど) を生じさせることが知られている⁹⁾。また芍薬甘草湯は、パクリタキセルで末梢神経障害性の異常感覚を生じさせたマウスで、症状を緩和することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。

今回、マウス精管の電気刺激収縮実験で、パクリタキセルの末梢作用が検出できるかを検討したところ、興味深いことにパクリタキセルは顕著な twitch 収縮増大作用

を示した。他の抗がん薬の作用の検討や、パクリタキセル前処置後の芍薬甘草湯エキスの作用等も併せて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

パクリタキセル (和光純薬), 芍薬甘草湯エキス (小城製薬), ピンクリスチン硫酸塩 (和光純薬), オキサリプラチン (和光純薬), ペオニフロリン (生薬精製品) を使用した。芍薬甘草湯エキス, ピンクリスチン硫酸塩及びオキサリプラチンは蒸留水に懸濁して使用した。パクリタキセルは, ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。マグナス槽内での DMSO の終濃度は, 0.33% とした。

2. マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対する作用の検討

ICR 系雄性マウスを頸椎脱臼で致死し, 精管を摘出した。マウスの精管 1 本では発生張力が小さいので, 同じマウスからの 2 本の精管を並列につないで使用した。すなわち, 2 本の精管の下端は固定棒と一緒に結びつけ, 上端は小さい金属リングに通した糸で 2 本の精管を連結した。小リングは糸を介してアイソメトリックトランスジューサー (TB-651T, 日本光電) に連結した。精管標本は, 1 対のリング状白金電極の中に通した状態で, 34°C の McEwen 液 (130 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.9 mM NaH₂PO₄, 25.0 mM NaHCO₃, 13.1 mM スクロース及び 11.1 mM グルコース) を満たした 30 mL のマグナス槽内に懸垂した⁷⁾。電気刺激装置 (バイオメディカルサイエンス社) で発生した矩形波パルス (持続時間 1 msec, 刺激頻度 0.1 Hz) を栄養液中に通電し, 電場刺激によって生じる一過性の単収縮 (twitch) を等尺性に記録した。なお, 白金電極のリングの外側は, ポリエチレン樹脂で被覆し, 外側に電流が流れないようにした。標本を懸垂し, 約 0.15 g の静止張力のもとで電気刺激を開始した。30 分後に栄養液を 1 回交換し, その後, 電気刺激を行いながら 30 分経過してから検体を適用し, twitch 収縮反応の変化を 60 分間記録した。

検体適用直前の twitch 収縮反応の振幅に対する振幅減少率から抑制率を算出した。

収縮増大は抑制率のマイナス値として表した。

3. パクリタキセルで増大させた twitch 収縮反応に対する薬物の作用の検討

パクリタキセルによる twitch 収縮増大が安定し, 一定時間経過後 (30-75 分) に, 検体を適用し, twitch 収縮反

応の変化を 60 分間記録した。検体適用直前の twitch 収縮反応の振幅を基準として抑制率を算出した。

実験結果

1. マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対するパクリタキセルの作用

パクリタキセルは, 3-30 μ g/mL で, マウス精管の twitch 収縮反応を増大させた (Fig.1)。10 μ g/mL では, 60 分後まで収縮増大が維持されたが, 30 μ g/mL では, 25-45 分で収縮増大がほぼ安定し, 増大が最大時の抑制率は -142% (n=3) であった。その後, 60 分間までに, 若干の収縮増大の減弱がみられた。

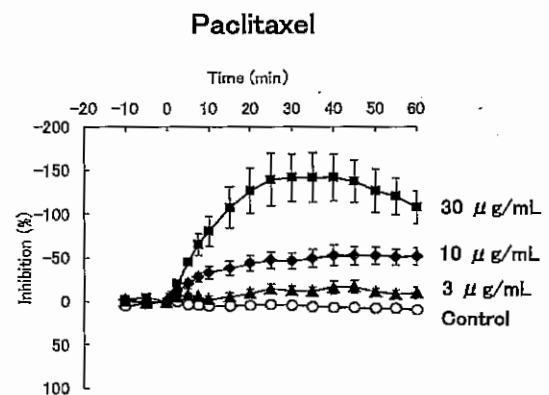


Fig.1 Effect of paclitaxel on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Paclitaxel was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

2. 芍薬甘草湯エキスの twitch 収縮反応に対する作用

芍薬甘草湯エキス (30-300 μ g/mL) は, マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対して顕著な抑制作用を示した (Fig.2)。60 分後の抑制率は, 100 μ g/mL で 60.1% であり, 300 μ g/mL で 93.2% であった。各濃度において 60 分間で最も大きな抑制率に基づき算出した 50% 抑制に要する濃度である IC₅₀ 値は 75.9 μ g/mL であった。

3. パクリタキセル存在下における twitch 収縮反応に対する芍薬甘草湯エキスの抑制作用

パクリタキセル存在下において, 芍薬甘草湯エキス (100 及び 300 μ g/mL) は, twitch 収縮反応を抑制し, 60 分後の抑制率は, 100 μ g/mL で 61.9% であり, 300 μ g/mL で 93.0% であった (Fig.3, Fig.4)。

4. パクリタキセル, ピンクリスチン及びオキサリプラチンの twitch 収縮反応に対する作用の比較

パクリタキセルは, 10 μ M (8.54 μ g/mL) で, twitch

Shakuyakukanzoto

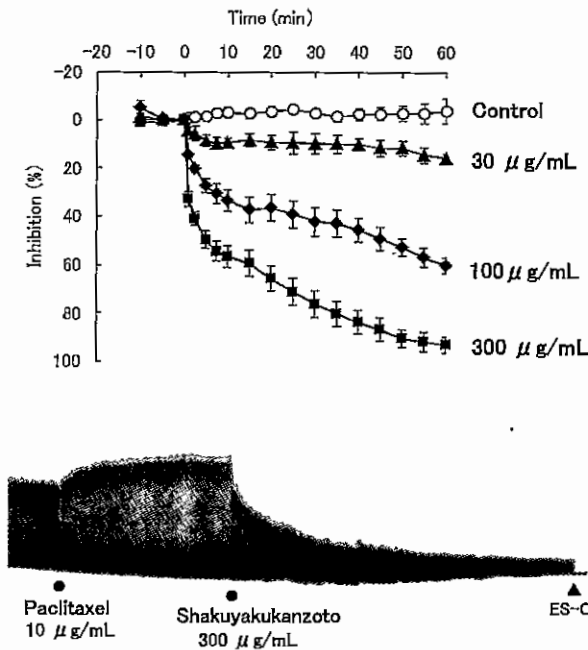


Fig.3 Typical recording of paclitaxel-induced potentiation of twitch response and shakuyakukanzoto-induced twitch-inhibition in the isolated mouse vas deferens

Paclitaxel and Shakuyakukanzoto were added to the bath at the point indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) was stopped at the point indicated.

Fig.2 Effect of shakuyakukanzoto on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Shakuyakukanzoto was dissolved in water. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

Shakuyakukanzoto

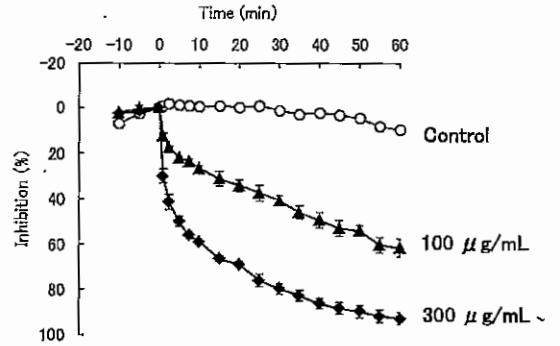
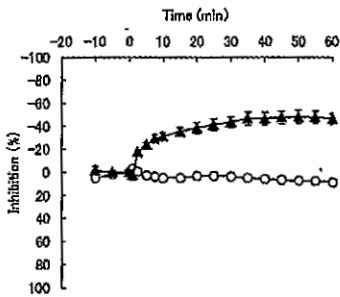


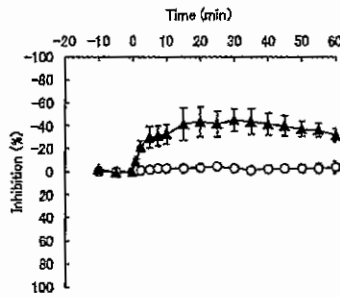
Fig.4 Effect of shakuyakukanzoto on the twitch response in the presence of paclitaxel

Shakuyakukanzoto was applied 30 min after paclitaxel application (10 μg/mL). Error bars indicate the SE from the mean of 3-5 experiments.

A: Paclitaxel 10 μM



B: Vincristine 30 μM



C: Oxaliplatin 30 μM

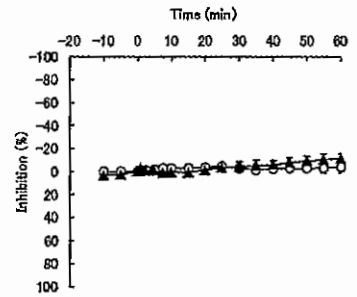


Fig.5 Effect of paclitaxel, vincristine and oxaliplatin on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

○ : Control, ▲ : drug application. Paclitaxel was dissolved in DMSO. Vincristine sulfate and oxaliplatin were dissolved in distilled water. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

Paeoniflorin 100 μM

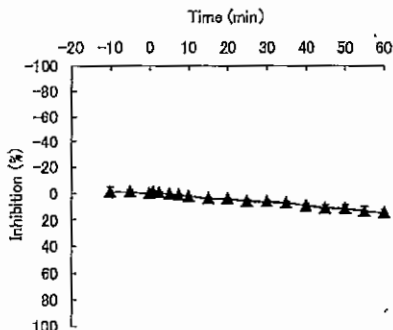


Fig.6 Effect of paeoniflorin on the twitch response in the presence of paclitaxel

Paeoniflorin was dissolved in distilled water and was added to the bath 80 min after application of paclitaxel (10 μM). Error bars indicate the SE from the mean of 3 experiments.

収縮反応を増大させた(30-60分での最大抑制率は-48.1%)。ピンクリスチンは、30 μ Mで、twitch収縮反応を増大させた(30分ではほぼ最大の抑制率は-44.9%)。オキサリプラチンは、30 μ Mで、twitch収縮反応に対して作用を示さなかった。

5. パクリタキセル存在下における twitch 収縮反応に対するペオニフロリンの影響

パクリタキセル 10 μ M (8.54 μ g/mL) の存在下で、シャクヤクの主要成分であるペオニフロリンは 100 μ M で、twitch 収縮反応に対して抑制作用を示さなかった。

考 察

twitch 収縮抑制作用を示す物質は、鎮静・鎮痛作用が期待される一方、twitch 収縮増大を示す物質は、交感神経系機能の低下した状態を改善する効果が期待されると考えられる。また、twitch 収縮の増大が非常に大きくなる場合は、神経が過敏な状態となり、痛みを強めることにつながる可能性も考えられる。

芍薬甘草湯エキスは、300 μ g/mL で、マウス精管の電気刺激収縮に対して顕著な抑制作用を示すことを以前に報告した⁸⁾。今回、別のメーカーの芍薬甘草湯エキスを用いて検討したところ、前回のエキスと同様に、適用後すみやかに抑制が出現した後、徐々に進行する収縮抑制パターンを示した。60分間で最も大きな抑制率に基づき算出した50%抑制に要する濃度であるIC₅₀値は、前回は82.1 μ g/mLであり、今回は75.9 μ g/mLで、ほぼ同じであった。芍薬甘草湯エキスのtwitch収縮抑制作用は、メーカーによる差が少ないものと思われた。

今回、抗がん薬のパクリタキセル(タキサン系)は、マウス精管の電気刺激収縮反応に対して顕著な増大作用を示した。パクリタキセル以外の抗がん薬でも末梢神経障害を生じることが知られていることから、別のタイプの抗がん薬にもtwitch収縮増大作用がみられるかを検討するため、ピンクリスチン硫酸塩(ピンカアルカロイド系)とオキサリプラチン(白金錯体)についても作用を検討した。その結果、ピンクリスチンは、30 μ Mでtwitch収縮増大作用がみられたが、オキサリプラチンには作用がみられなかった。パクリタキセルは、ピンクリスチン(30 μ M)よりも低濃度(10 μ M)で、同程度の増大作用を示したことから、パクリタキセルのtwitch収縮増大作用は、ピンクリスチンよりも強いものと思われる。

パクリタキセルやオキサリプラチンの痛覚過敏などには、TRP(transient receptor potential)が関与しているとされている。TRPは、温度や機械的刺激など多くの刺激で活性化するセンサーで、非選択性の陽イオンチャネ

ルを形成している。また、TRPは細かく分類されている。

パクリタキセルは、TRPA1やTRPV4の活性化物質とされ、パクリタキセルの末梢神経障害は、TRPA1やTRPV4が関与していると考えられている¹²⁻¹⁴⁾。精管には知覚神経も散在しているとされ¹⁵⁾、TRPV1を活性化する辛味物質のカプサイシンは、精管のtwitch収縮抑制作用を示すことが報告されている¹⁶⁾。一方で、カプサイシンは比較的高濃度でtwitch収縮増大作用を示すことも報告されている¹⁷⁾。パクリタキセルのマウス精管のtwitch収縮増大作用にTRPが関与している可能性はあると思われる。

ピンクリスチンにはTRPに対する作用の報告はみられないので、ピンクリスチンのtwitch収縮増大作用はTRPに対する作用によらないと思われる。

オキサリプラチンの末梢神経障害には、TRPが関与するという報告があるが¹⁸⁻¹⁹⁾、オキサリプラチンは、パクリタキセルのようなtwitch収縮増大作用がみられなかったことから、パクリタキセルとオキサリプラチンの作用機序が異なるためと思われる。

マウス精管の電気刺激によって、交感神経の終末部からノルアドレナリンとATPが遊離し、twitch収縮反応が生じるとされている⁵⁾。

カプサイシンによるマウス精管のtwitch収縮抑制には、TRPV1の活性化を介して遊離したカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が、神経及び平滑筋側に存在するCGRP受容体に作用し、収縮抑制を生じさせるとされている¹⁶⁾。知覚神経が刺激されて遊離する物質にはCGRP以外に、サブスタンスP(SP)などもあり、SPは、モルモット精管やラットの精管の電気刺激収縮を増大させることが報告されており^{17,20)}、遊離したSPがパクリタキセルによるマウス精管のtwitch収縮増大に関与している可能性もあると思われる。

桂皮の精油成分であるシンナムアルデヒドはTRPA1活性化物質であることが知られている^{12,21)}。以前に実施したマウス精管の電気刺激収縮実験において、シンナムアルデヒドは10 μ g/mLで、最大抑制を示した後、低濃度適用(1.3 μ g/mL)の場合と異なり、大きな収縮の戻りを観察している²²⁾。シンナムアルデヒドは抑制作用とその反対の作用を有し、TRPA1の活性化が関与している可能性があり、パクリタキセルはTRPA1活性化物質として知られており、パクリタキセルのtwitch収縮増大作用にTRPA1が関与しているかもしれない。

今回、パクリタキセルでtwitch収縮を増大させた条件下で、芍薬甘草湯エキスを作用させると、パクリタキセルを前処理しない場合と同様なtwitch収縮抑制作用がみられた。また、シャクヤクの主成分のペオニフロリンは、以前の実験でもtwitch収縮反応に変化を示さず^{6,7)}、今

回のパクリタキセル前処理においてもペオニフロリンに twitch 収縮を変化させる活性はみられなかった。

パクリタキセルの twitch 収縮増大作用の機序や、芍薬甘草湯中の twitch 収縮抑制作用成分とその作用機序が、今後解明の進むことを期待したい。

文 献

- 1) 中田敬吾：漢方基礎講座 処方解説シリーズ 29 芍薬甘草湯，漢方研究，426, 181-187 (2007)
- 2) 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
- 3) 中島正光：病棟でよく使う漢方薬 芍薬甘草湯，月刊薬事，60, 448-452 (2018)
- 4) 毒性試験講座 7 機能毒性学，地人書館(1990)，p.67-69, p.185-186, p.229-233
- 5) 廣川 生物薬科学実験講座 14 巻 臓器機能測定法 (編集：岡部進)，廣川書店 (1992)，p.643-646
- 6) 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)
- 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) 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)
- 9) Hidaka T., Shima T., Nagira K., Ieki M., Nakamura T., Aono Y., Kuraishi Y., Arai T., Saito S.: Herbal medicine Shakuyaku-kanzo-to reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in mice, *Eur. J. Pain*, 13, 22-27 (2009)
- 10) Andoh T., Kobayashi N., Kuraishi Y.: Prophylactic repetitive shakuyakukanzoto treatment inhibits paclitaxel-induced mechanical allodynia in mice via peripheral effects, *Trad. Kamp. Med.*, 3, 71-74 (2016)
- 11) 平成 28 年度富山県受託研究 (富山大学) 和漢薬・バイオテクノロジー研究 研究成果報告書，II. 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果とペオニフロリン含有外用薬の開発 (安東嗣修，齋藤滋)，p.17-27 (2017)
- 12) Prekumar LS.: Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals, *American Chemical Society Chem. Neurosci.*, 5, 117-1130 (2014)
- 13) Materazzi S., Fusi C., Benemei S., Pedretti P., Patacchini R., Nilius B., Prenen J., Creminon C., Geppetti P., Nassini R.: TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism, *Pflugers Arch.* 463, 561-569 (2012)
- 14) Matsumura Y., Yokoyama Y., Hirakawa H., Shigeto T., Futagami M., Mizunuma H.: The prophylactic effects of a traditional Japanese medicine, goshajinkigan, on paclitaxel-induced peripheral neuropathy and its mechanism of action, *Mol. Pain*, 10, 61 (2014)
- 15) Donoso M.V., Hermosilla D., Navarrete C., Álvarez P., Lillo J.G., Huidobro-Toro J.P.: Reciprocal sympatho-sensory control: functional role of nucleotides and calcitonin gene-related peptide in a peripheral neuroeffector junction, *Neuroscience*. 203, 216-229 (2012)
- 16) Sheykhzade M., Gupta S., Sørensen T., Sørensen O.A., Koch H., Boonen H.C., Back O., Fjalland B.: Characterization of capsaicin induced responses in mice vas deferens: evidence of CGRP uptake, *Eur. J. Pharmacol.*, 667, 375-382 (2011)
- 17) Moritoki H., Iwamoto T., Kanaya J., Ishida Y., Ando K., Kitagawa K.: Capsaicin enhances the non-adrenergic twitch response of rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 92, 469-475 (1987)
- 18) 田口恭治：抗悪性腫瘍薬パクリタキセルとオキサリプラチンにより誘発される末梢神経障害に対する Transient receptor potential チャネルの関与，*YAKUGAKU ZASSHI*, 136, 287-296 (2016)
- 19) Nakagawa T., Kaneko S.: Roles of transient receptor potential ankyrin I in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, *Biol. Pharm. Bull.*, 40, 947-953 (2017) (文献)
- 20) Anthes J.C., Chapman R.W., Richard C., Eckel S., Corboz M., Hey J.A., Fernandez X., Greenfeder S., McLeod R., Sehring S., Rizzo C., Crawley Y., Shih N.Y., Piwinski J., Reichard G., Ting P., Carruthers N., Cuss F.M., Billah M., Kreutner W., Egan R.W.: SCH 206272: a potent, orally active tachykinin NK(1), NK(2), and NK(3) receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 450, 191-202 (2002)
- 21) 松本健次郎，加藤伸一，堀江俊治：TRP チャネルと内臓痛，*日薬理誌*，146, 233-235 (2015)
- 22) 川筋透，石黒尋保，松永孝之：シナナムアルデヒド及びケイヒ酸のマウス精油電気刺激収縮に対する作用及びマウスにおける体内動態の検討，富山県薬事研究所年報，43, 22-27 (2016)

飲みやすい小児用製剤の剤形の検討 —ミニタブレットの製造条件の検討—

永井 秀昌, 明官 勇雄, 薬事研究会製剤部会

Examination of Appropriate Manufacturing Condition of Mini-tablets
Hidemasa NAGAI, Isao MYOKAN, Division of Drug Formulation Toyama
Pharmaceutical Research Association

要 約

小児製剤は製薬企業にとって採算性の確保が困難な上、小児に飲みやすい剤形に設計するための高度な製剤技術が求められることから、開発が進んでいない。近年、小児にも服用しやすい剤形として、小型錠剤であるミニタブレットが注目されている。ミニタブレットは通常サイズの錠剤を嚥下できない年齢の小児でも服用可能であることが報告されており、次世代の小児用剤形として関心が高まっている。

当センターでは、県内製薬企業の会員で構成する製剤部会において、ミニタブレットの最適な製造条件を検討するため、マルチチップ杵臼を用いて打錠可能な粉体特性や打錠時の含量バラツキについて検討を行った。

Summary

In addition to the difficulties which companies face when trying to make the fabrication of pediatric medicine a profitable operation, highly advanced technology is needed to create drug products that are quickly adopted by children, meaning that pediatric medicine has not been developing. In recent years, mini-tablets have been garnering attention as an easily ingestible dosage form for young children. Interest has been generated in mini-tablets as the next-generation dosage form for children. It has been reported that mini-tablets can be swallowed by children at ages where they cannot take regular-sized tablets. At the Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research, the formulation section composed of pharmaceutical companies in the prefecture investigated content uniformity during tableting and powder characteristics for tableting with multi-tip punches and dies to look into the optimum manufacturing conditions for mini-tablets.

キーワード：小児製剤；ミニタブレット；マルチチップ杵臼

Key words : Pediatric medicine ; Mini-tablets ; Multi-tip punches and dies

小児にも服用しやすい剤形としてミニタブレット（直径1～4 mm程度の小さな錠剤）が注目されている。ミニタブレットは通常サイズの錠剤を嚥下できない年齢の小児でも服用可能であることが報告されており、次世代の小児用剤形として関心が高まっている。しかしながら、ミニタブレットを打錠する際に用いる「マルチチップ杵」には打錠障害など、多くの課題がある。このため、マルチチップ杵を用いたミニタブレットの最適な製造条件を確立することが、小児用剤形の選択肢を広げ、小児の服薬コンプライアンス向上に貢献できる。そこで本研究では、ミニタブレットの最適な打錠条件を検討したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 処方

1) 処方 A

アセトアミノフェン (AA, 結晶グレード)	4.0 mg
直打用賦形剤 (PartechODT, メルク)	16.0 mg
ステアリン酸 Mg (外添加 2%)	0.4 mg
計	20.4 mg

2) 処方 B

アセトアミノフェン (AA, 微粉グレード)	4.0 mg
直打用賦形剤 (PartechODT, メルク)	16.0 mg
ステアリン酸 Mg (外添加 4%)	0.8 mg
計	20.8 mg

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 1 に示す。

Table 1 使用機器

名称	メーカー名	型式
ロータリー打錠機	(株)菊水製作所	VELA5
シングルパンチ杵臼	モリマシナリー(株)	φ 3mm, IPT-typeB
マルチチップ杵臼	ファーマシン	φ 3mm, 7チップ
ダイヤルシクネスゲージ	(株)尾崎製作所	G2-257M
錠剤硬度計	岡田精工(株)	PC-30

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）

上記処方に滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム）を添加・混合し、直打法により、直径 3.0 mm のマルチチップ杵及びシングルパンチ杵を用いて下記条件にてミニタブレットを試作した。打錠時は打錠速度を 2 段階に変えて打錠し、錠剤の重量バラツキ及び主薬含量バラツキ（CV 値）によって錠剤物性を評価した。

<打錠条件>打圧:1 kN（シングルパンチ杵）、5kN（マルチチップ杵）

4. 評価方法

1) 重量偏差

錠剤の重量を精密に測定し、バラツキ（変動係数：CV 値）を測定した（n=10）

2) 硬度試験

錠剤硬度計を用いて測定し、その平均値で評価した（n=10）

3) 含量均一性試験

主薬である AA について下記の通り吸光度法を用いてミニタブレット中の含量を定量し、10 錠あたりのバラツキ（変動係数：CV 値）を測定した。

AA 秤取量（指示：約 20 mg）:20.44 mg（処方 A）

AA 秤取量（指示：約 20 mg）:22.65 mg（処方 B）

AA（ $C_8H_9NO_2$ ）の量（mg/tab）= MS × AT / AS / 5

MS：AA 原薬の秤取量（mg）

AT：試料溶液の吸光度

AS：標準物質の吸光度

測定波長： 244 nm，光路長： 1 cm（装置：UVIDEC-340Q 日本分光(株)製）

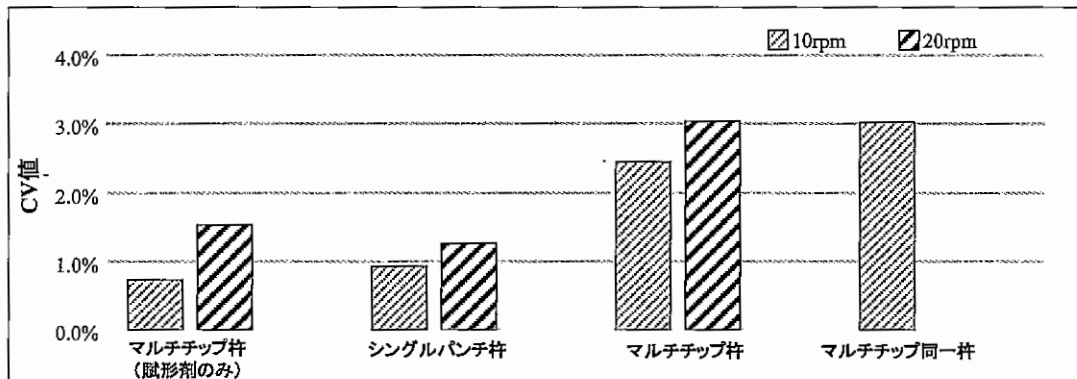


Fig. 1 シングルパンチ杵とマルチチップ杵の錠剤重量バラツキの比較（AA 結晶）

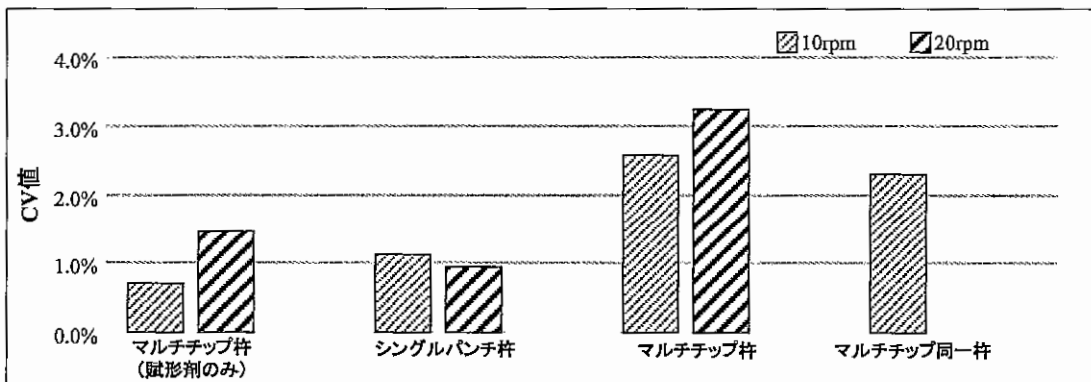


Fig. 2 シングルパンチ杵とマルチチップ杵の錠剤重量バラツキの比較（AA 微粉）

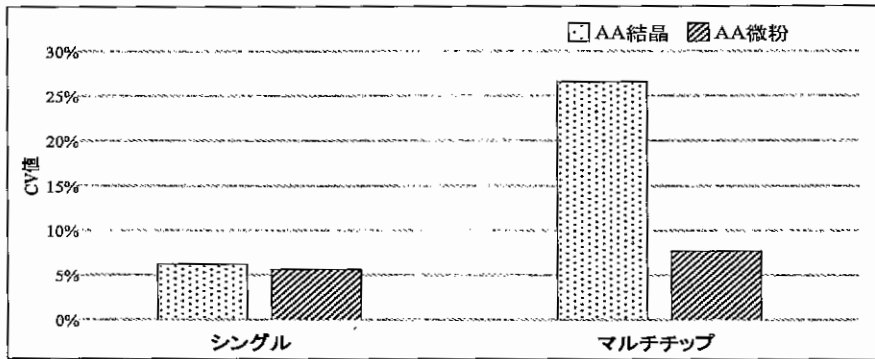


Fig. 3 ミニタブレット中のAA含量バラツキの比較

実験結果

1. ミニタブレットの重量バラツキ

今回の実験ではAA結晶グレード及び微粉グレードの2処方を用いてミニタブレットを打錠したが、微粉グレードの処方ではバインディングによる打錠障害が発生したため、ステアリン酸マグネシウム含量を4%に増量させて打錠を行った。それぞれの杵で打錠して得られた錠剤の重量を測定し、変動係数を比較した結果をFig.1及び2に示す。AA結晶及び微粉グレードともに、シングルパンチ杵では変動係数がほぼ1.0%程度であったのに対し、マルチチップ杵では2.0%以上となり、シングルパンチ杵よりも顕著にバラツキが大きくなった。また、回転盤の回転速度は、10rpmよりも20rpmにおいて、重量バラツキが大きくなっていた。

2. ミニタブレットのアセトアミノフェン含量バラツキ

それぞれの杵で打錠して得られた錠剤中のアセトアミノフェン(AA)含量を吸光度法により定量し、変動係数を比較した結果をFig.2に示す。シングルパンチ杵ではAA結晶グレードおよび微粉グレードともに変動係数が5%程度であったのに対し、マルチチップ杵ではAA結晶グレードを用いることで、変動係数が25%以上と顕著にバラツキが大きくなっていた。

考 察

今回、我々は小児に服用しやすい剤形を開発し、小児用製剤の開発促進に貢献することを目的として、マルチチップ杵臼を用いたミニタブレットの試作研究を昨年度に続き実施した。

AAを配合する処方を用いて、重量バラツキの比較を行った結果、シングルパンチ杵と比較して、マルチチップ杵ではバラツキが大きく、回転盤の回転速度が速くな

ることにより、その傾向は顕著になった。賦形剤のみの場合と比較した場合、AA処方ではバラツキが大きくなっていることから、AA原薬による流動性の低下が原因の一つと考えられる。また、マルチチップ杵の同一杵間での重量バラツキも大きいことから、杵の精度や同一臼穴間への充填バラツキの影響も考えられる。

また、AA含量を定量して含量バラツキを測定した結果、シングルパンチ杵ではAAの粒子径により、含量バラツキに差が認められなかったのに対し、マルチチップ杵では結晶グレードを用いることにより、顕著にバラツキが大きくなった。この結果より、マルチチップ杵を用いてミニタブレットを製造する際には直打であればより細かい微粉グレードを選択するか、直打法ではなく、あらかじめ造粒する方法が好ましいと考えられる。

今後は、加工精度を高めた高性能マルチチップ杵臼を用いてミニタブレットを試作し、主薬の含量均一性を指標にして評価を実施し、小児製剤の開発促進につなげていきたいと考えている。

EG7 T リンパ腫皮下移植マウスモデルを用いた ベツリン誘導体と抗 PD-1 抗体との併用効果の検討

小笠原勝, 榊崎浩亮, 濱田昌弘¹, 藤本亮太¹, 斎藤真冬¹, 松永孝之, 大戸幹也, 川筋透,
中島範行¹, 長井良憲², 高津聖志,

Combined effects of a betulin derivative and anti-PD-1 antibody in an EG7
T lymphoma subcutaneously inoculated mouse model.

¹ 富山県立大学工学部医薬品工学科製薬化学工学講座

² 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

Masaru OGASAWARA, Hiroaki MASUZAKI, Masahiro HAMADA¹,
Ryota FUJIMOTO, Mafuyu SAITOH, Takayuki MATSUNAGA, Mikiya OHTO,
Toru KAWASUJI, Noriyuki NAKAJIMA¹, Yoshinori NAGAI², Kiyoshi TAKATSU

¹ Department of Pharmaceutical Engineering, Faculty of Engineering,
Toyama Prefectural University

² Department of Immunobiology and Pharmacological Genetics,
Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for Research, University of Toyama

要 約

我々はこれまでに、B16メラノーマの皮下移植マウスモデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示すベツリン誘導体（以下、誘導体 A）を開発してきた。本研究では、EG7 T リンパ腫の皮下移植マウスモデルを用いて誘導体 A の抗腫瘍効果を検討するとともに、抗 PD-1 抗体との併用効果について検討した。EG7 T リンパ腫の皮下移植モデルにおいて誘導体 A を腫瘍内に直接投与すると、腫瘍の増殖は有意に抑制された。一方、CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスでは、誘導体 A の抗腫瘍効果は消失した。このことから、誘導体 A の抗腫瘍効果には腫瘍特異的な CD8 陽性 T 細胞の関与が示唆された。そこで、抗 PD-1 抗体と誘導体 A との併用効果について検討したところ、誘導体 A は抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を有意に増強することが分かった。その増強メカニズムについて検討した結果、誘導体 A は EG7 細胞の増殖能を試験管内において顕著に抑制するとともに、細胞膜上における PD-L1 分子の発現量を有意に増加させることが分かった。がん細胞における PD-L1 分子の発現増加は、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果の増強に繋がることが報告されている。これらのことから、誘導体 A は EG7 細胞に対して PD-L1 分子の発現誘導することで、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

Summary

We have developed a betulin derivative (derivative A) which shows remarkable anti-tumor effects in a tumor-burden mouse model. In this study, we evaluated anti-tumor effects of derivative A in a EG7 subcutaneously inoculated mouse model and combined effects of derivative A administration and anti-PD-1 therapy. We found that intratumor injection of derivative A significantly inhibited EG7 growth in the mouse model. In contrast, its inhibitory effect was cancelled when used CD8⁺T cell-depleted mice. These results indicated that tumor-specific CD8⁺T cells may be involved in the derivative A's effect. Therefore, we evaluated combined effects of derivative A and anti-PD-1 and found that derivative A significantly increases anti-tumor effects of anti-PD-1 antibody. Through examination on the mechanism of action underlying the augmentation by derivative A administration, we found that derivative A inhibits markedly the *in vitro* growth of EG7 and increases expression of PD-L1 on EG7 cells *in vitro*. Induction of PD-L1 expression on cell surface is demonstrated to be responsible for augmentation of effectiveness of PD-1 therapy. These results suggest that derivative A potentiates the anti-tumor activity of anti-PD-1 antibody by both inhibiting growth of and increasing PD-L1 expression on EG7 cells.

キーワード：ベツリン誘導体；抗 PD-1 抗体；PD-L1 分子

Key words：betulin derivative；anti-PD-1 antibody；PD-L1

悪性黒色腫などのがん細胞は、免疫細胞からの攻撃を回避するために、PD-1/ PD-L1分子機構などの免疫チェックポイントを介した免疫逃避機構をもっている。現在、がんの免疫逃避機構を阻止する薬剤の研究開発が盛んに進められており、日本では2014年に抗PD-1抗体(nibolumab)が、2015年に抗CTLA-4抗体(ipilimumab)が悪性黒色腫に対する免疫チェックポイント阻害剤として承認された。これらは今後のがん治療に不可欠な医薬品の一つになりつつある。一方、がんの免疫逃避機構には、これら免疫チェックポイント以外にも様々な免疫抑制因子が複雑に絡み合っていることも明らかにされつつあり、免疫逃避機構を効果的に解除するには複数の抑制機構を同時に阻止する必要がある¹⁾。

我々は平成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、白樺成分のベツリンに目的とする有効性を見出した²⁾。さらに、その誘導体の開発を進め、B16メラノーマの皮下移植マウスモデルにおいて顕著な抑制作用を示すベツリン誘導体(以下、誘導体A)を見出した。本研究では、EG7 Tリンパ腫の皮下移植マウスモデルを用いて抗腫瘍効果を検討するとともに、抗PD-1抗体との併用効果について検討した。

実験方法

1. 実験試薬

ベツリンはExtrasyntheseより購入した。ベツリン誘導体(以下、誘導体A)は富山県立大学工学部医薬品工学科製薬化学工学講座において合成された。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。抗PD-1抗体及び抗CD8 α 抗体はBio X cellより購入し、PBSで希釈して実験に供した。

2. 細胞及び細胞培養

マウスEG7 Tリンパ腫はATCCより購入し、10%の非働化ウシ胎児血清、0.4 mg/mLのG418、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 μ 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

EG7細胞を 5×10^5 個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス(8週令、雌、5-6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 μ l/マウス)。細胞傷害性T細胞の影響を検討する場合は、予め抗CD8 α 抗体を投与してCD8陽性T細胞を除去したマウスにEG7細胞(2.5×10^5 個/マウス)を移植した。抗PD-1抗体はEG7細胞を接種後、1週間に2回の間隔で腹腔内に投与した。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. OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出

EG7細胞を皮下移植し、誘導体Aあるいは溶媒を投与したマウスより17日目に腫瘍組織を摘出し、酵素処理により細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を蛍光標識されたOVAテトラマー(MBL)、抗CD8 α 抗体、及び、抗PD-1抗体で処置した。細胞を洗浄後、7AADを添加してフローサイトメーター(FACSCanto II、日本BD)により測定した。

5. CD8 陽性 T 細胞の調製

マウスから脾臓を採取し、フロストスライドグラスを使って、5 mlのFACS buffer(2% 非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン及び、0.1 mg/mlストレプトマイシンを含むHBSS溶液)中で磨り潰し、脾細胞を抽出した。脾細胞浮遊液をメッシュ(ポアサイズ:70 μ m)に通し、組織片を除去した。遠心分離後、上清を除去し、ACK bufferを加え十分に混合させた。そこに、FACS bufferを加え遠心分離し上清を除去した後、FACS bufferに懸濁してメッシュに通した。この脾細胞調製液に抗Fc γ 受容体抗体(2.4G2)を加え、氷上で15分間静置してFc γ 受容体をブロックした。さらに、以下のビオチン化抗体、抗マウスCD105、抗マウスCD19、抗マウスCD11b、抗マウスCD45R、抗マウスCD11c、抗マウスNK1.1、抗マウスMHC Class II、抗マウスCD4抗体を加え、氷上で30分間静置した。その後、余分な抗体を洗浄除去し、Streptavidin Particles Plus-DMを加え30分間静置後、IMag装置でNegative selectionを行った。吸着しなかった画分に対して、再度、negative selectionを行い、非吸着画分を回収した。RPMI培地で洗浄後、RPMI培地に懸濁して実験に供した。

6. PD-1 分子の FACS 解析

単離したCD8⁺T細胞(2×10^6 cells/ml)を予め抗CD3 ϵ 抗体を固相化した96ウェルプレートの各ウェルに0.1 mLずつ播種し、ベツリンあるいは誘導体Aを添加して3日間処置(5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C)した。処置した細胞を回収しFACS bufferで洗浄後、抗Fc γ 受容体抗体(2.4G2)を加え、氷上で15分間静置してFc γ 受容体をブロック

した。さらに、蛍光色素で標識された抗 PD-1 抗体で 30 分間処置した。余分な抗体を洗浄除去後、7AAD を添加してフローサイトメーター (FACSCanto II, 日本 BD) により測定した。

7. 細胞毒性の評価

10% FBS を含む DMEM 培地 (GIBCO) で B16F10 細胞を 4×10^4 個/ml に調製し、96 ウェルプレート (Corning) に各ウェル当たり 4×10^3 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% CO₂) 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。

8. PD-L1 分子の FACS 解析

試験管内で培養した EG7 細胞に種々の濃度で誘導体 A を添加し、37°C, 5% CO₂ 存在下で 1-3 日間処置した。細胞を洗浄後、蛍光色素で標識された抗 PD-L1 抗体で処置した。余分な抗体を洗浄除去後、7AAD を添加してフローサイトメーター (FACSCanto II, 日本 BD) により測定した。

9. 統計処理

測定値の有意差検定は、Student の t 検定により行った。

結 果

EG7 細胞の皮下移植モデルにおけるベツリン誘導体 A の抗腫瘍効果と抗 PD-1 抗体との併用効果

EG7 細胞の皮下移植モデルを用いて、ベツリン誘導体 A (以下、誘導体 A) の抗腫瘍効果について検討した (Fig. 1A)。EG7 移植後 2 日目より 16 日目まで誘導体 A を腫瘍内に直接投与したところ、対照群に比較して腫瘍の増殖が有意に抑制された。EG7 細胞は卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として細胞表面に発現するがん細胞であり、OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されやすいと考えられる。そこで、抗 CD8 α 抗体により CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスを用いて、誘導体 A の抗腫瘍効果における CD8 陽性 T 細胞の関与について検討した (Fig. 1B)。その結果、CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスでは腫瘍の増殖が亢進し、誘導体 A の抗腫瘍効果は減弱した。このことから、誘導体 A の抗腫瘍効果には CD8 陽性 T 細胞が関与していることが示唆された。

癌抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞による腫瘍傷害作用は、極めて特異的かつ強力であることが知られているが、

がん細胞は PD-1/PD-L1 経路などを介して CD8 陽性 T 細胞からの攻撃を回避している³⁾。実際、EG7 皮下移植マウスモデルにおいて高用量の抗 PD-1 抗体を投与すると腫瘍の増殖は顕著に抑制された (データ省略)。そこで、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果に及ぼす誘導体 A の影響を明らかにするため、EG7 皮下移植マウスモデルを用いて両者の併用効果について検討した (Fig. 2)。その結果、両者を併用することにより腫瘍の増殖は顕著に抑制されることが明らかとなった。

OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞に対する誘導体 A の影響

誘導体 A が OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞の誘導に影響を与えているのかを明らかにするため、腫瘍移植後 17 日目に腫瘍を摘出して細胞懸濁液を調製し、OVA テトラマーを用いて OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、誘導体 A の投与により OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞の割合は増加したが、誘導体 A 投与群では腫瘍内に浸潤した CD8 陽性 T 細胞の腫瘍重量当たりの絶対数が対照群に比較して顕著に減少した。このため腫瘍重量当たりで比較すると、対照群と誘導体 A 投与群との間で OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の数に明らかな差は認められなかった (データ省略)。

そこで、誘導体 A の抗腫瘍メカニズムについて、免疫抑制解除の視点から OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子に着目し、その発現量をフローサイトメトリーにより解析した (Fig. 3A)。その結果、誘導体 A 投与群では腫瘍内に浸潤した OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子の発現量が低下している傾向が認められた (Fig. 3B)。

この PD-1 分子の発現低下が誘導体 A の直接的な作用に依るのかを明らかにするため、マウス脾臓から調製した CD8 陽性 T 細胞を用いて、抗 CD3 ϵ 抗体及び抗 CD28 抗体で刺激した際の PD-1 分子の発現誘導に対する誘導体 A の影響を検討した (Fig. 4)。その結果、誘導体 A は検討した濃度範囲において PD-1 分子の発現を有意に抑制しなかった。これらのことから、誘導体 A 投与群で認められた OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子の発現量の低下は、CD8 陽性 T 細胞に対する誘導体 A の直接的な作用に依るものではないと考えられた。

EG7 細胞における PD-L1 分子の発現に対する誘導体 A の影響

抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果は、がん細胞上に PD-1 分子のリガンドである PD-L1 分子が増加することで増強されることが報告されている⁴⁾。そこで、EG7 細胞上の

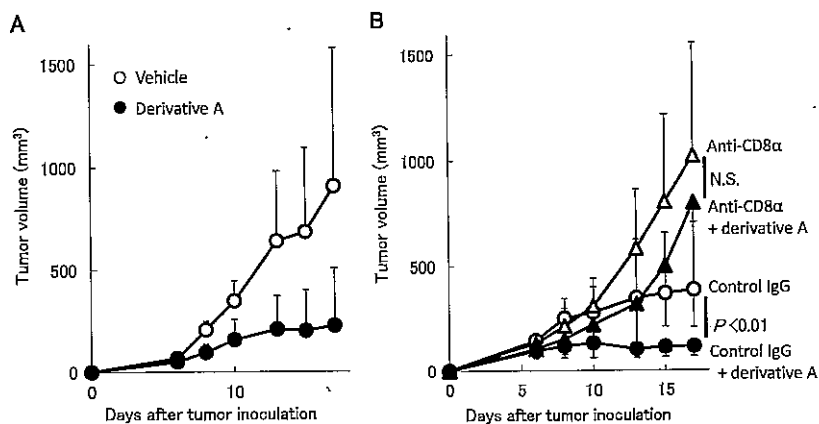


Figure 1 Effects of a derivative A on the growth of EG7 T lymphoma in mice.

(A) EG7 cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Derivative A 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. Data are expressed as mean \pm S.D. of 6 mice. (B) EG7 cells were subcutaneously inoculated into naïve or CD8T cell-depleted mice on day 0. Derivative A was administered in the same way as in (A). Data are expressed as mean \pm S.D. of 10 mice of sum of two independent experiments. N.S.: not significant.

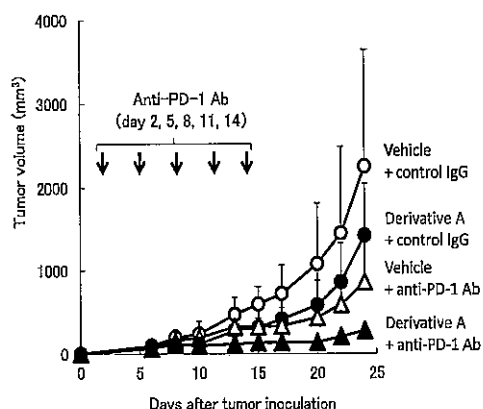


Figure 2 Combined effects of derivative A and anti-PD-1 antibody on the growth of EG7 T lymphoma in mice.

EG7 cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Derivative A was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Anti-PD-1 antibody or control IgG was injected intravenously on the indicated days. Tumor volume was evaluated 2 or 3 times in a week. Data are expressed as mean \pm S.D. of 6 mice.

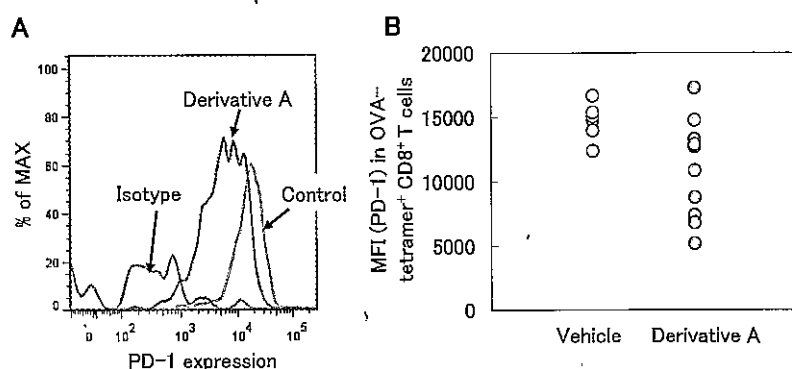


Figure 3 Effects of derivative A on expression of PD-1 on OVA-specific CD8⁺ T cells.

EG7 cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Derivative A was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. On day 17, tumor nodules were resected and digested with collagenase to prepare tumor infiltrated lymphocytes. The prepared cells were treated with fluorescence-labeled OVA tetramer, anti-CD8 α Ab and anti-PD-1 Ab, and then, analyzed with flow cytometer. (A) A representative histogram of PD-1 expression. (B) Mean fluorescent intensity of PD-1 expression on OVA-tetramer⁺CD8 α ⁺PD-1⁺ cells from vehicle- or derivative A-treated mice. Data are expressed as mean \pm S.D. of 7 or 10 mice.

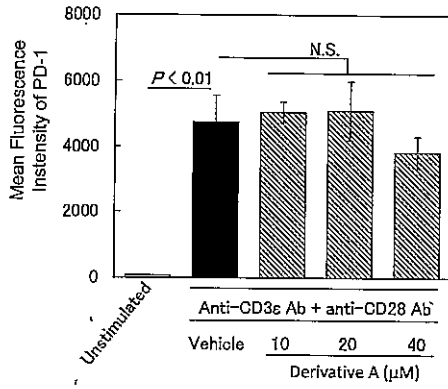


Figure 4 Effects of derivative A on expression of PD-1 on OVA-specific CD8⁺ T cells *in vitro*.

CD8⁺T cells were prepared from spleen cells of mice and treated with derivative A in a multiwell plate coated with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 Abs for 3 days. Then, cells were collected and stained with fluorescence-labeled anti-PD-1 Ab and analyzed with flow cytometer. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells. N.S.: not significant.

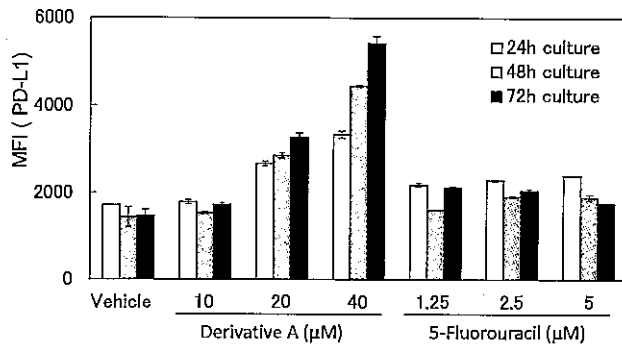


Figure 5 Effects of derivative A on expression of PD-L1 on EG7 cells *in vitro*.

EG7 cells were treated with derivative A or 5-fluorouracil for 24 to 72 h, and then, stained with fluorescence-labeled anti-PD-L1 Ab and analyzed with flow cytometer. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells.

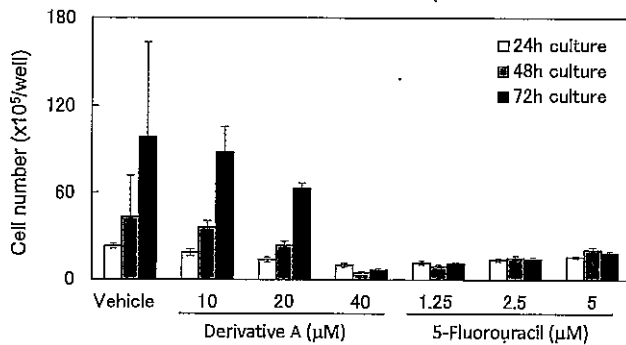


Figure 6 Effects of derivative A on proliferation of EG7 cells *in vitro*.

EG7 cells were treated with derivative A or 5-fluorouracil for 24 to 72 h. Then, cell were collected and counted with a hemocytometer. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells.

PD-L1分子の発現に与える誘導体Aの影響について検討した (Fig.5). 試験管内で培養したEG7細胞に誘導体Aを添加し1~3日間処置したところ、処置した濃度に依存してEG7細胞膜上にPD-L1分子の発現が誘導されることが分かった。

一方、作用が認められた濃度範囲においてEG7細胞の増殖能も有意に抑制された (Fig.6). このことから、PD-L1分子の発現抑制が細胞増殖阻害の結果である可能性が考えられた。そこで、5-フルオロウラシルを用いてEG7細胞の増殖能を強く抑制する濃度においてPD-L1分子の発現に及ぼす影響を検討した (Fig.5). その結果、5-フルオロウラシルはPD-L1分子の発現には影響を与えなかった。これらのことから、誘導体AはEG7細胞の増殖能を阻害するとともに、PD-L1分子の発現を顕著に増強することが明らかとなった。

考 察

我々はこれまで、白樺成分のベツリンが免疫系の増強作用を介して抗腫瘍効果を発揮する可能性を見出し、その有効性の増強を図る目的で種々の誘導体合成と担癌マウスを用いた薬効評価を進めてきた。その結果、ベツリンにカルバメート構造やアミノ酸を付加させた誘導体に、顕著な抗腫瘍効果が認められることを報告してきた^{5,6)}。しかし、それら誘導体は強い炎症誘導作用や正常細胞に対する毒性を示したことから、より副作用が少なく、かつ、高い抗腫瘍効果を示す化合物を開発する必要があった。

今回新たに開発した誘導体Aは、本研究で示したEG7リンパ腫の皮下移植マウスモデルに加えて、B16メラノーマの皮下移植マウスモデルにおいても顕著な腫瘍増殖抑制作用を示す一方で、これまでの誘導体で認められたような明らかな炎症誘導作用は認められていない(データ省略)。この点については副作用がある程度は改善されたと考えている。しかし、正常細胞に対する毒性の評価は今後の課題であることから、引き続き注意深く検討を進めたい。

本研究で用いたEG7細胞はOVAをモデル抗原として発現するがん細胞であることから、EG7細胞の皮下移植モデルではOVA特異的なCD8陽性T細胞が誘導されやすいと考えられる。実際、当該モデルではCD8陽性T細胞を除去することにより腫瘍の増殖は顕著に亢進することから、また抗PD-1抗体の治療効果が強く認められることから、腫瘍の排除におけるCD8陽性T細胞の関与を検出しやすい評価系と言える。これらのことから、本研究では、誘導体Aに抗PD-1抗体の治療効果に対する増強作用を認めたが、当該モデルの特徴を考慮すると、他の担がんマウスモデルを用いた検討がさらに必要であ

ると考える。

一方、誘導体AがEG7細胞に対してPD-L1分子の発現を強く誘導した点については興味深い。PD-L1分子の発現増加が抗PD-1抗体の治療効果の増強に繋がる可能性があることが報告されていることを考えると、他のがん種に対しても誘導体Aが同様の作用を示すのか検討を進める必要がある。今後、その分子メカニズムも含めて、誘導体Aの有用性について詳細に検討を進める予定である。

謝 辞

本研究の一部はJSPS科研費15K08041の助成を受けて実施された。

文 献

- 1) Kawakami Y., Yaguchi T., Sumimoto T., Kudo-Saito C., Iwata-Kajihara T., Nakamura S., Tsujikawa T., Park J. H., Popivanova B. K., Miyazaki J., Kawamura N., Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy., *Front Oncol.*, **28**(3), 136-143 (2013)
- 2) 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)
- 3) Robert C., Long G. V., Brady B., Dutriaux C., Maio M., Mortier L., Hassel J. C., Rutkowski P., McNeil C., Kalinka-Warzocha E., Savage K. J., Hernberg M. M., Lebbé C., Charles J., Mihalciou C., Chiarion-Sileni V., Mauch C., Cognetti F., Arance A., Schmidt H., Schadendorf D., Gogas H., Lundgren-Eriksson L., Horak C., Sharkey B., Waxman I. M., Atkinson V., Ascierto P. A., Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N. Engl. J. Med.*, **372**, 320-330 (2015).
- 4) Zhang J., Bu X., Wang H., Zhu Y., Geng Y., Nihira N. T., Tan Y., Ci Y., Wu F., Dai X., Guo J., Huang Y. H., Fan C., Ren S., Sun Y., Freeman G. J., Sicinski P., Wei W., Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance., *Nature.*, **553**(7686), 91-95 (2018)
- 5) 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)
- 6) 小笠原勝、松永孝之、大戸幹也、川筋透、長井良憲、高津聖志：アミノ酸付加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, 44, 17-20 (2017)

V 資 料

「平成 29 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 2017

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^{1,2,3,4)}。

平成 28 年度においては、pH 測定、旋光度測定、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 96% 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⁵⁾。そのため平成 29 年度においては、前年度に問題があった試験項目の他、これまで実施したことがない水分測定 (電量滴定法) を新たに追加して実施し、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、リン酸緩衝液 pH6.5 の pH 測定、チアミン塩酸塩の水分測定 (電量滴定法)、オキシベンゾンの定量 (UV 法)、スピロラクトン錠 25mg の定量 (HPLC 法)、トロキシピド錠 100mg の溶出試験とした (下表参照)。なお、pH 測定、水分測定 (電量滴定法) 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。

オキシベンゾンの定量 (UV 法) は医薬品添加物規格に準じた試験方法とし、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、スピロラクトン錠 25mg の定量 (HPLC 法) ではカラム温度を変更した。

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	リン酸緩衝液 pH6.5	pH 計	41
	水分測定 (電量滴定法)	チアミン塩酸塩	水分計 (電量滴定法)	19
	定量 (UV 法)	オキシベンゾン	分光光度計	40
製剤試験	定量 (HPLC 法)	スピロラクトン錠 25mg	高速液体クロマトグラフ	30
	溶出試験	トロキシピド錠 100mg	溶出試験器, 分光光度計, 乾燥機	9

(2) スケジュール

平成 29 年 10 月 30 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 15 日とした。報告内容を取りまとめて下記 (3) の方法により評価し、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 30 年 3 月 6 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、メルク(株)の技術担当者を外部講師として、水分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±0.10以内」の場合、溶出試験は「平均値±5.0%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) リン酸緩衝液 pH6.5 の pH 測定

報告されたpH値を評価したところ、リン酸緩衝液 pH6.5 のpH測定については、41社のうち39社が平均値±0.10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)

結果が「不満足」となった原因を調査したところ、1社は電極を交換して再試験を実施すると改善したため、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。

今回試料として配布したリン酸緩衝液 pH6.5 は、市販されているものである。各社で購入して定期的に測定し、メーカー規格内 (pH6.4～6.6) の値が得られるか確認することで、装置(電極を含む)の性能確認として応用できる可能性があると考えられた。

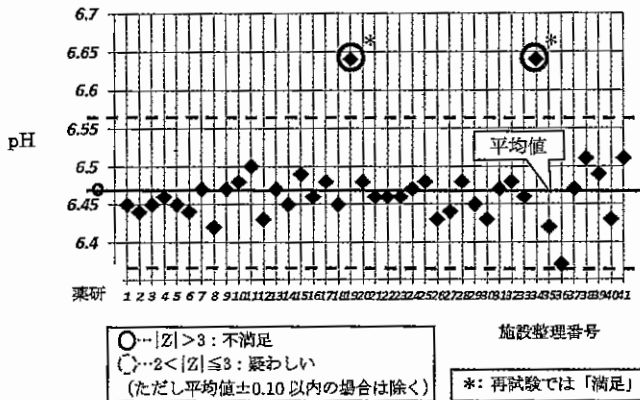


図1 リン酸緩衝液 pH6.5 の pH 測定の報告値

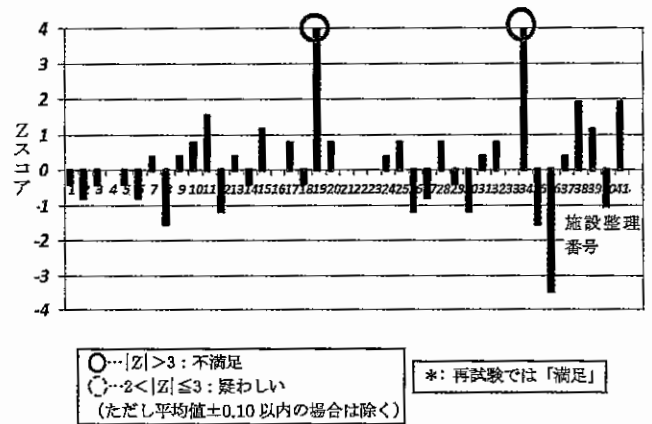


図2 リン酸緩衝液 pH6.5 の pH の Zスコア

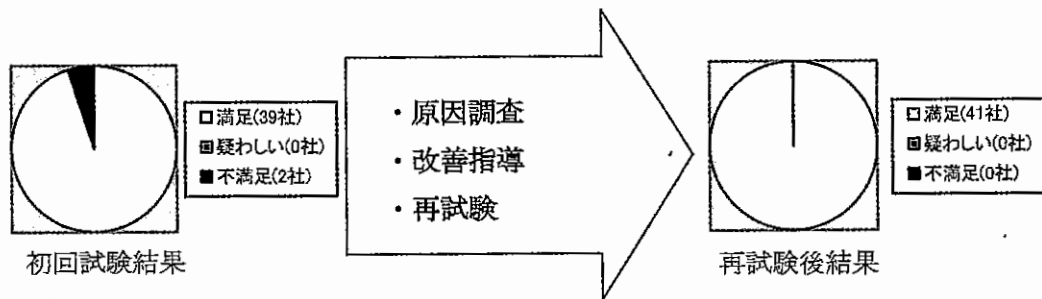


図3 リン酸緩衝液 pH6.5 の pH 測定の評価結果

(2) チアミン塩酸塩の水分測定（電量滴定法）

19社のうち、全社が「満足」と判定される結果が得られた。（図4～6参照）

水分測定（電量滴定法）は、試料中の非常にわずかな量の水分を測定するため、試料を精密かつ正確に秤量した後、空気中の水分をなるべく入れずに、秤量したものを全量投入して完全溶解させることに注意しなくてはならない。参加者はこれらの操作を適切に行うことにより良好な結果を得たと考えられた。

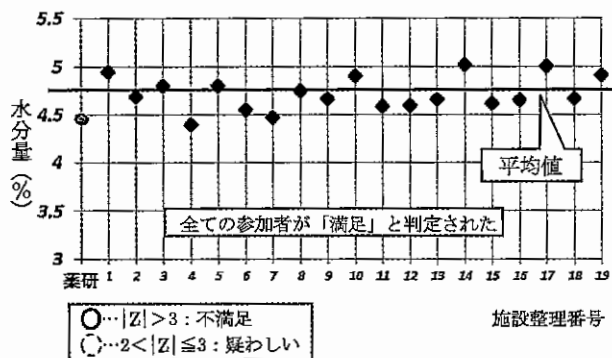


図4 チアミン塩酸塩の水分測定（電量滴定法）の報告値

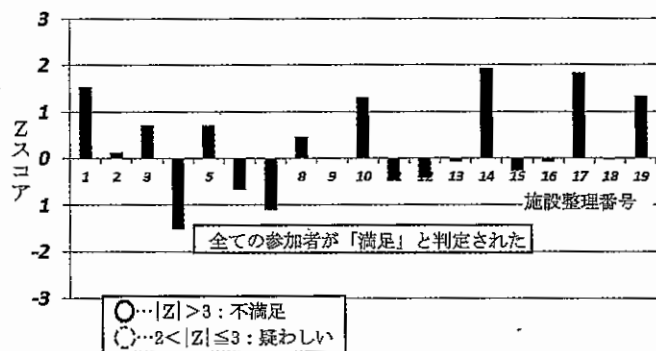


図5 チアミン塩酸塩の水分測定（電量滴定法）のZスコア

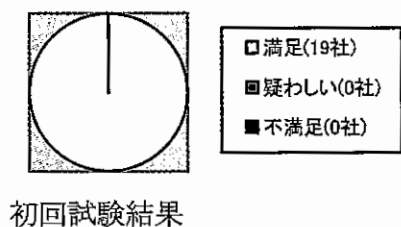


図6 チアミン塩酸塩の水分測定（電量滴定法）の評価結果

(3) オキシベンゾンの定量（UV法）

40社のうち、「疑わしい」はなかったが、3社が「不満足」と判定された。そのうち2社は、再試験で「満足」と判定される結果が得られた。（図7～9参照）

結果が「不満足」となった原因としては、試料溶液の調製ミス、測定時のセルの汚れ、装置の不具合、ゼロ点補正の方法に問題があったことなどが考えられた。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とともに、温度による体積変化の影響を受けないようにしながら試料溶液を正確に調製し、セルに汚れがないことを確認してから測定することが重要であると考えられた。

(4) スピロラクトン錠の定量試験（HPLC法）

30社のうち、3社が「疑わしい」、2社が「不満足」と判定された。そのうち3社は、再試験で「満足」と判定さ

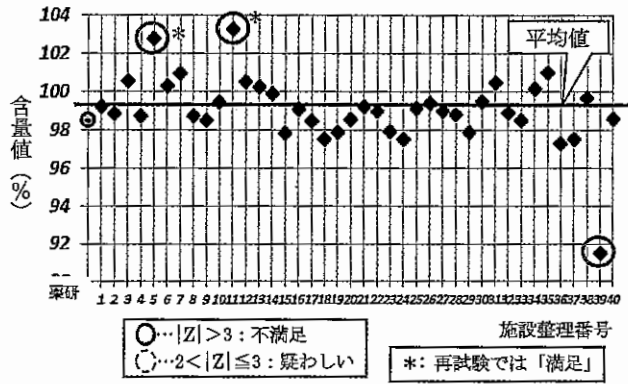


図7 オキシベンゾンの定量 (UV 法) の報告値

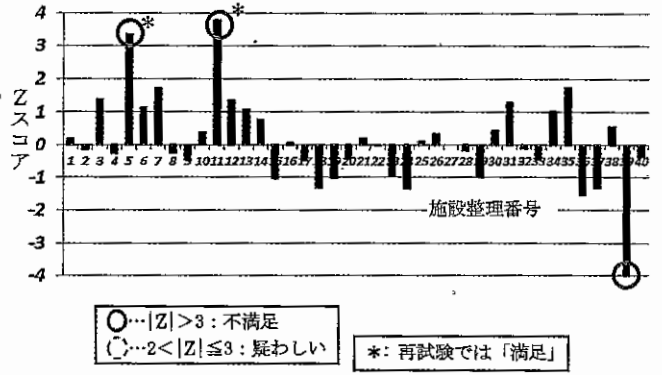


図8 オキシベンゾンの定量 (UV 法) のZスコア

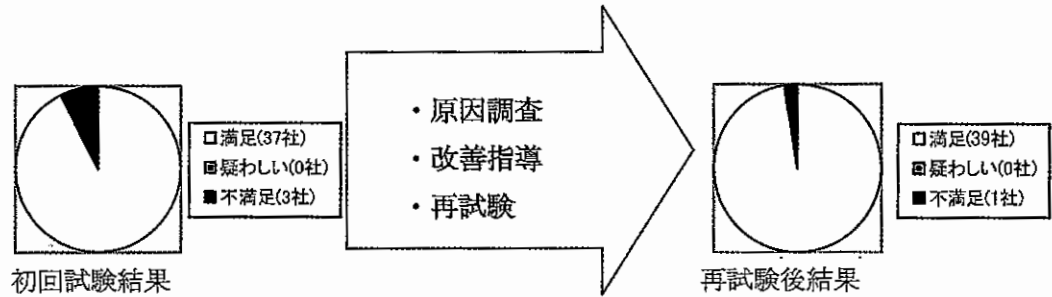


図9 オキシベンゾンの定量 (UV 法) の評価結果

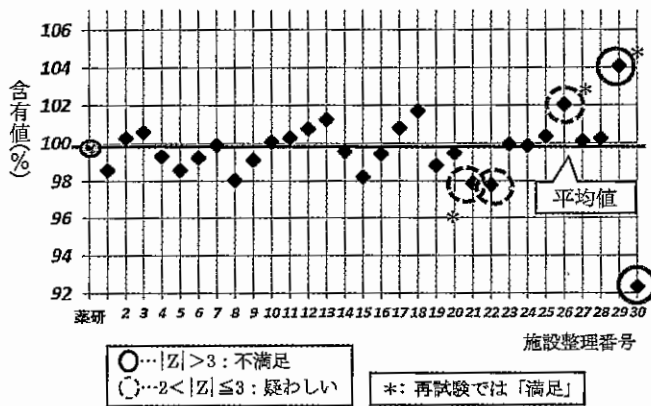


図10 スピロラクトン錠の定量試験 (HPLC 法) の報告値

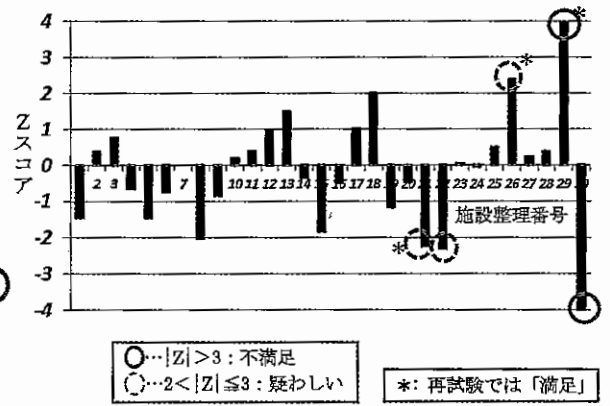


図11 スピロラクトン錠の定量試験 (HPLC 法) のZスコア

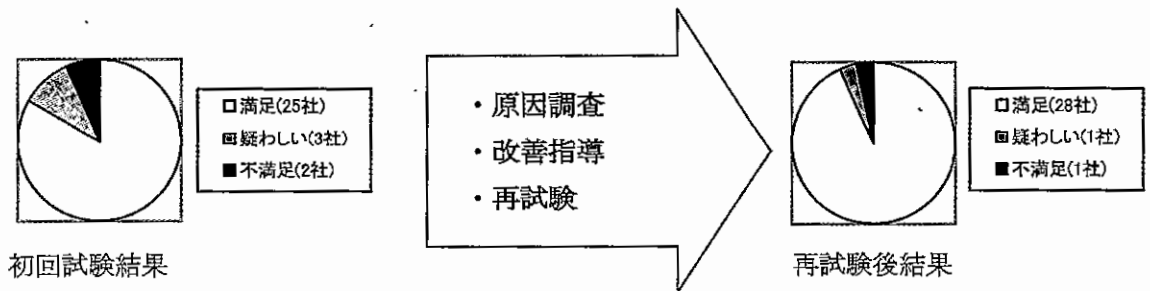


図12 スピロラクトン錠の定量試験 (HPLC 法) の評価結果

れる結果が得られた。(図10～12参照)。

カラムの状態に問題があった事例や、標準溶液の調製ミス等が原因と考えられた事例があった。また、絶対検量線法の試験であったため、温度変化や溶媒揮発等に伴う濃度変化が影響していた可能性も考えられた。

実際に当センターで、水/アセトニトリル混液(1:1) 250mLをメスシリンダーに入れて冷蔵庫(約3℃)に移したところ、体積が約1%減少した。このことから、HPLCのサンプルクーラー内の標準溶液と試料溶液に大きな温度差があった場合は、測定結果に影響を与えるため、両溶液の温度に差がないように注意する必要があると考えられた。さらに、実際に当センターで、HPLCの注入により穴が開いているセプタムを装着したバイアルに、水/アセトニトリル混液(1:1)を入れて4時間放置し、重量を量ることで溶媒の揮散量を確認したところ、セプタムの種類によっては約1%揮散したものがあつた。このことから、HPLCで1回測定したバイアルの液を長時間経過した後に再測定する場合は、溶媒揮散により測定結果に影響を与えるため、あらかじめ新しいセプタムに変えるなどの対策が必要と考えられた。

(5) トロキシピド錠 100mg の溶出性

9社のうち、「疑わしい」はなかったが、1社が「不満足」と判定された。その1社は、再試験で「満足」と判定される結果が得られた(図13～14参照)。

結果が「不満足」となった原因としては、標準品秤量時の静電気により秤量値が不正確であったことが考えられた。なお、実際に当センターで測定して確認したところ、今回の品目は試験液脱気の有無が溶出率にほとんど影響しない品目であった。一方、前年度本事業で実施した品目(アラセプリル錠 12.5mg)は、その影響を大きく受ける品目であった。品目によりその影響の受けやすさが大きく異なるため、品目毎に試験液脱気の必要性に注意することが重要であると考えられた。

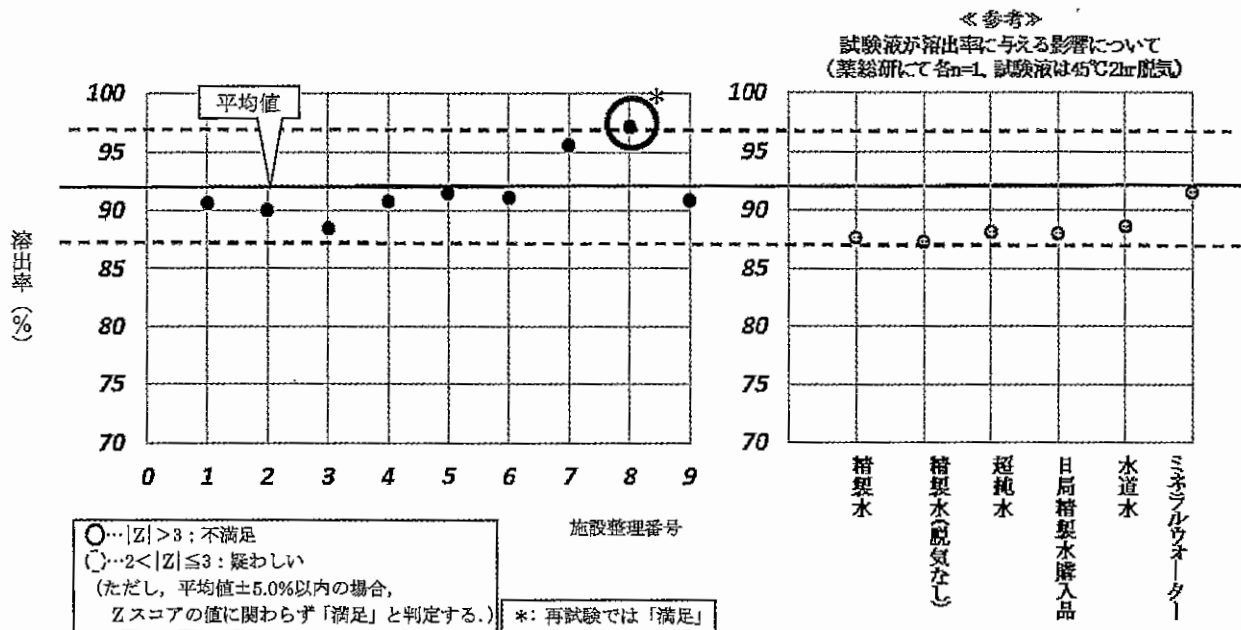


図13 トロキシピド錠 100mg の溶出試験の報告値

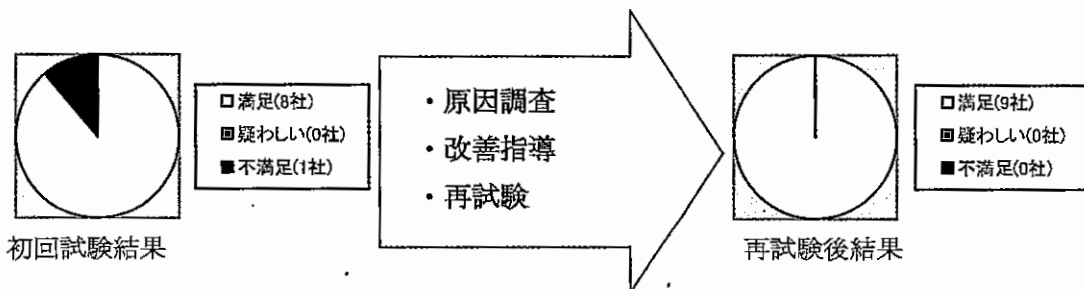


図14 トロキシピド錠 100mg の溶出試験の評価結果

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94%（のべ139社中131社）であり、前年度の96%（のべ137社中132社）と同様に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ので、日常点検や過去のデータとの比較など、異常の有無を都度確認することが重要であると考えられた。また、日常の使用時では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。

HPLC法による絶対検量線法の定量試験では、バイアル内の液が、温度変化や溶媒揮発等に伴い濃度が変化し、結果に影響することが考えられた。内標準法とは異なるそれらの注意点を考慮して試験することが重要であると考えられた。

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
- 5) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成28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, 44, 43-48

VI 誌上・学会発表など

1. 原著の抄録

家庭薬研究 37, 42-47 (2018)

微粒子コーティング法を用いた苦味マスキング法の検討と評価

佐藤 公, 早苗 秀敏, 玉川 清崇, 白江 直子, 坂本 弘幸, 庄野 未来, 山下 成彬, 西村 友快, 布目 基倫, 村本 瑞宜, 川岸 貴博, 西森 豪, 霜鳥 武司, 向 勝臣, 佐々木 優, 下平 隆樹, 米尾 亮平, 久保 卓也, 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 (OD 錠) の製剤設計においては, 口腔内で数十秒程度に崩壊させるための優れた崩壊性に加え, 苦味の遮蔽 (マスキング) を施す必要がある。これまで, 苦味マスキングの評価法としてはボランティアによる官能的评价に頼る場合が多く, 客観的な評価が十分とは言えなかった。我々はこれまで, 化学的苦味マスキング剤として知られるシクロデキストリンを用いて苦味薬物のマスキングを行い, 試作した OD 錠の苦味を味覚センサにて評価を行ってきた。今回は, これまで検討してきた薬物を微粒子コーティング法により物理的にマスキングし, その苦味強度を味覚センサにより評価を行った。その結果, コーティング顆粒はアセトアミノフェンの苦み (味覚センサ電圧値) はコーティングを施すことよって低下し, 苦味マスキング効果を示すことが確認された。

家庭薬研究 37, 25-32 (2018)

医薬品試験の効率化に関する検討 (第 5 報)

— グラジエント法を用いたかぜ薬成分の分析法の検討 —

嶋田 貴弘, 水越 悠輔, 田中 爾織, 森元 久美子, 亀田 奈穂美, 中山 和樹,
宮下 雅志, 横田 洋一

医薬品試験の効率化を図るため, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のグラジエント法を検討した。グラジエント法は移動相組成を連続的に変化させることで, 多成分同時分析が可能であるが, 使用機器により保持時間のバラツキが大きいこともあり, 機器間の再現精度が良くないと考えられていた。そこで, 今回かぜ薬成分について多成分分析を行い, その機器間再現性及び定量性を検証した。アセトアミノフェン, カフェイン, ジヒドロコデインリン酸塩, ノスカピン, dl-メチルエフェドリン塩酸塩, グアヤコールスルホン酸, ベンフォチアミン及び内標準物質 2 種類について, グラジエント遅れを補正したプログラムを使用した 7 社 9 種類の機器を用いて検討したところ, 各成分の保持時間のバラツキが小さく, また良好な分離度及び再現性 (内標準物質に対する面積比) が得られた。よって, 医薬品の品質管理試験において, グラジエント法の効率化が示唆された。

HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 10 報) — JP17 「カンゾウ (末)」中のグリチルリチン酸の定量法について—

金井 恵子, 大根谷 章浩, 堀井 周文, 原井 健司, 小此木 明, 王 文婧,
横田 洋一

第十七改正日本薬局方 (JP17) において、「カンゾウ」及び「カンゾウ末」のグリチルリチン酸の定量法が、グリチルリチン酸とガラクトログリチルリチン酸を分離する緩衝液法に改定された。そこで、緩衝液法におけるカンゾウのグリチルリチン酸の分析時間短縮化について、従来の粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm のカラム (以下, 150 mm カラム) を粒径 3 μ m, 内径 4.6 mm, 長さ 75 mm のカラム (以下, 75 mm カラム) に変更して検討を行った。その結果, 今回使用した 3 種類の 75 mm カラムにおいて, 対照の 15cm カラムと同様のグリチルリチン酸含量, ガラクトログリチルリチン酸のグリチルリチン酸に対する相対保持時間及び分離度を示した。さらにグリチルリチン酸の保持時間は 150mm カラムの 1/2 ~ 1/3 となり分析時間の短縮化に成功した。

2. 講演・学会発表

「*Phialophora* sp. によるシヤクヤク根腐病 (新称)」

川部眞登, 築尾嘉章, 田村隆幸, 守川俊幸

平成 29 年度 日本植物病理学会大会, 2017.4.27, 岩手県盛岡市

「トウキとミシマサイコから分離された植物病原糸状菌」

佐藤豊三, 廣岡裕吏, 菱田敦之, 林茂樹, 安食菜穂子, 川原信夫, 田村隆幸, 辰尾良秋, 村上芳哉, 高尾泰昌, 黒崎文也, 一木 (植原) 珠樹, 根本博

平成 29 年度 日本植物病理学会大会, 2017.4.27, 岩手県盛岡市

「薬用植物ミシマサイコとカノコソウから見いだされた植物ウイルス」

一木 (植原) 珠樹, 大橋美保, 田村隆幸, 辰尾良秋, 村上芳哉, 高尾泰昌, 黒崎文也, 佐藤豊三, 花田薫, 青木孝之,

平成 29 年度 日本植物病理学会大会, 2017.4.27, 岩手県盛岡市

「IL-5 とアレルギー性炎症」

高津聖志

第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 2017.6.16, 東京

「薬事研究所って、何をしているの？」

高津聖志

平成 29 年度県民カレッジ富山地区ミニ講座, 2017.7.14, 富山

「天然物を活用した炎症・線維化の抑制」

高津聖志

第 19 回免疫サマースクール 2017, 2017.8.1, 神奈川

「日本産薬用作物の主要 5 品目より分離された植物病原菌類」

佐藤豊三, 廣岡裕吏, 菱田敦之, 林茂樹, 安食菜穂子, 飯田修, 川原信夫, 田村隆幸, 辰尾良秋,
村上芳哉, 高尾泰昌, 黒崎文也, 一木(植原)珠樹, 根本博

環境微生物系学会合同大会 2017, 2017.8.30, 宮城県仙台市

「[芍薬甘草湯エキス]を用いた, 漢方エキス含有チュアブル錠の製剤化に関する研究」

島谷隆夫, 伊東宏子, 永井秀昌, 明官勇雄

日本生薬学会第 64 回年会, 2017.9.9, 千葉.

「Funiculosin variants and their synthetic derivatives are novel agonists for murine and human TLR4/MD-2 complex」

Nagai Y, Okamoto N, Takatsu K.

Potential reagents for developing vaccine adjuvants, Innovation Forums Basel Life 2017, 2017, 9.11-13, Basel, Switzerland.

「Initiatives for paediatric medicine development in Toyama Prefecture, Japan's top pharmaceutical production base - Unique collaboration between regional government, academia and industries」

Tomonori SHIOKAWA, Hidemasa NAGAI.

9th EUPFI, 2017.9.20, ポーランド

「トウキ及びミシマサイコの本州以南における栽培適性の解明と持続的栽培技術の開発(第1報) 栽培1年目の各地の生育状況・品質の比較」

甲村浩之, 横井直人, 諸橋修一, 田村隆幸, 由井秀紀, 安永真, 白石豊, 矢野孝喜, 野下俊朗, 五十嵐元子, 瀧野裕之,
安食菜穂子, 林茂樹, 菱田敦之, 川原信夫

日本生薬学会 第 64 年会, 2017.9.10, 千葉県舟橋市

「薬都とやま」の新展開～異分野融合からのイノベーション～: 富山県薬事研究所の新たな挑戦, 田中耕一先生とともに「薬都の未来を語る会」

高津聖志

2017.9.26, 富山

「飲みやすい小児製剤の剤形の検討—ミニタブレットの製造条件の検討—」

富山県薬事研究会製剤部会, 明官勇雄, 永井秀昌

第 19 回富山県薬学会年会, 2017.10.21, 富山.

「くすりの富山」と医薬品開発研究の新展開を求めて～異分野融合からのイノベーション～」

高津聖志

富山大学薬学部講義, 2017.11.6, 富山

「くすりの富山」の目指すべき方向について: 生産額日本一から 1 兆円産業へ」

高津聖志

第 1 回富山県医薬品業者大会, 2017.11.24, 富山

「Chronic IL-33-induced inflammation results in pulmonary arterial hypertrophy」

Ikutani M, Tsuneyama K, Nakae S, Takatsu K, Takaki S.

第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.12.12, 宮城

「The interaction of neutrophils with adipocytes plays a key role in the infiltration of macrophage into the adipose tissue」

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K.

第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.12.12, 宮城

「IL-5-producing ILC2s in the large intestine contribute to T cell-independent IgA production through the regulation of eosinophil homeostasis」

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

第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.12.14, 宮城

「常識では考えられない研究」に挑戦した経験 IL-5 とレセプターの発見→好酸球性喘息の治療へ TGF- β による IgA 産生増強」

高津聖志

富山大学医学部ウイルス学講義, 2018.1.17, 富山

「IL-5 の過去, 現在, 未来: ~重症喘息における 2 型サイトカインの役割~」

高津聖志

Scientific Exchange Meeting in 長野 基礎と臨床のトランスレーション: 好酸球と重症喘息を考える, 2018.2.17, 長野

「飲みやすさに重点を置いた製剤研究 - 小児用製剤の剤形検討と漢方チュアブル錠の開発について -」

永井秀昌

平成 29 年度富山県薬事研究所研究成果発表会, 2017.2.13, 富山.

「富山シャクヤクのブランド化推進事業 - 実生産規模での乾燥条件の違いによる生薬成分変動 -」

田村隆幸

平成 29 年度富山県薬事研究所研究成果発表会, 2018.2.13, 富山市

「微粒子コーティング法を用いた苦味マスキング法の検討と評価」

佐藤公, 早苗秀敏, 玉川清崇, 白江直子, 坂本弘幸, 庄野未来, 山下成彬, 西村友快, 布目基倫, 村本瑞宣, 川岸貴博, 西森豪, 霜鳥武司, 向勝臣, 佐々木優, 下平隆樹, 米尾亮平, 久保卓也, 明官勇雄, 永井秀昌 (富山県薬事研究会製剤部会)

第 37 回家庭薬開発シンポジウム, 2017.2.13, 富山

「重症喘息における 2 型サイトカインの役割」

高津聖志

重症喘息領域ワークショップ, 2018.2.25, 東京

「糖尿病モデルマウスの内臓脂肪組織に対するインソリクイリチゲニンの抗炎症・抗線維化作用の解析」

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

日本薬学会 第 138 年会, 2018.3.26, 金沢

「人工水耕－圃場ハイブリッド栽培で育成したエゾウコギの品質評価 (1)」

高尾汐織, 村上守一, 田村隆幸, 朱妹, 川本元裕, 中井秀人, 吉松嘉代, 小松かつ子

日本薬学会第 138 年会, 2018.3.27, 石川県金沢市

3. 共同研究論文リスト

Nagai Y, Watanabe Y, Honda H, Takatsu K: Chapter 8 Isoliquiritigenin: A unique licorice component that attenuates adipose tissue inflammation and fibrosis by targeting the innate immune sensors. In "Biological activities and action mechanisms of licorice ingredients" (ed. H. Sakagami), InTech, Zagreb, 2017, pp. 121 – 134 (ISBN 978-953-51-3119-9).

Ikutani M, Tsuneyama K, Kawaguchi M, Fukuoka J, Kudo F, Nakae S, Arita M, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K: Prolonged activation of IL-5-producing ILC2 causes pulmonary arterial hypertrophy. *JCI Insight*. 2017;2(7):e90721.

Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo B.N, Kita S, O' Donnell E, Osawa T, Takahashi H, Takano KI, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M: A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. *Sci. Rep.*, 2017 Jun 20;7(1):3855.

Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K: CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nat. Commun.*, 2017 Aug 18;8(1):286.

Okamoto N, Mizote K, Honda H, Saeki A, Watanabe Y, Yamaguchi-Miyamoto T, Fukui R, Tanimura N, Motoi Y, Akashi-Takamura S, Kato T, Fujishita S, Kimura T, Ohto U, Shimizu T, Hirokawa T, Miyake K, Fukase K, Fujimoto Y, Nagai Y, Takatsu K: Fuculosin variants and phosphorylated derivatives promote innate immune responses via the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017 Sep 15;292(37):15378-15394.

Wada T, Ishikawa A, Watanabe E, Nakamura Y, Aruga Y, Hasegawa H, Onogi Y, Honda H, Nagai Y, Takatsu K, Ishii Y, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T: Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J. Endocrinol.*, 2017 Dec;235(3):179-191., pii: JOE-17-0351.

Ikutani M, Ogawa S, Yanagibashi T, Nagai T, Okada K, Furuichi Y, Takatsu K: Elimination of eosinophils using anti-IL-5 receptor alpha antibodies effectively suppresses IL-33-mediated pulmonary arterial hypertrophy. *Immunobiology*, 2017 Dec 13., pii: S0171-2985(17)30215-2.

Yanagibashi T, Satoh M, Nagai Y, Koike M, Takatsu K: Allergic diseases: From bench to clinic - Contribution of the discovery of interleukin-5. *Cytokine*, 98:59-70, 2017.

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
抗齲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
I L - 1 及 び T N F 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