

研 究 業 績

IV 研究報告

シャクヤクの品種別薬理試験（1）

シャクヤクエキスにおける抗酸化作用

松永 孝之, 横田 洋一, 田村 隆幸, 田中 彰男*

*現所属：富山中央薬局

Comparative Pharmacological evaluation of Extracts from Various Species of *Paeonia lactiflora* (1) Antioxidative Effect of Extracts

Takayuki MATSUNAGA, Yoichi YOKOTA, Takayuki TAMURA and
Akio TANAKA*

* Present office: Toyama central pharmacy

要 約

薬用植物指導センターで栽培している62種のシャクヤクの根における抗酸化活性を比較検討した。その結果、優良品種とされる梵天種と同等あるいはそれ以上に活性の高い品種を6種認めた。シャクヤクエキスに含まれる成分の内、指標成分であるペオニフロリン及びアルビフロリンは極めて弱い抗酸化活性しか示さず、ポリフェノールの一種であるペンタガロイルグルコースが強い活性を示した。

これらの結果から、シャクヤクの各品種で抗酸化物質の含量が異なることが示され、酸化ストレスの関与する疾患の治療に用いる場合、有効性に差が見られる可能性が示唆された。

Summary

Antioxidative activity of root extracts from *Paeonia lactiflora* cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance was examined to compare among 62 species of this plant. 6 species possessed a similar or superior activity to Bonten, known as a high quality species. Among components included in *Paeonia lactiflora*, paeoniflorin and albiflorin, typical component in this plant, showed the weak activity and pentagalloylglucose, a polyphenol, exerted the strong antioxidative activity.

These results show that the antioxidative content differ from species of *Paeonia lactiflora* and suggest the possibility that the therapeutic efficiency was different among species when used for the treatment with disease induced by oxidative stress.

キーワード：シャクヤク, 品種, 抗酸化活性, ペンタガロイルグルコース

Keywords: *Paeonia lactiflora*, Species, Antioxidative activity, Pentagalloylglucose

シャクヤクは、鎮痛、鎮痙、婦人病及び瘀血の改善などを目的に数多くの処方配合されている重要な生薬である。国内生産量は年間約130トンで、輸入量は約800トンであり、大部分は中国からの輸入である¹⁾。国内産には、和芍の他に園芸用の洋種シャクヤクも含まれているとされる。これまでシャクヤクの薬理効果として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報告されている²⁾。薬効成分としては、モノテルペンであるペオニフロリン、アルビフロリンやそれらの関連化合物及びガロタンニン類が知られている³⁾。村上らは⁴⁻¹⁴⁾、これまで、シャクヤクの指標成分であるペオニフロリンやアル

ビフロリン含量で品種間の比較を行ってきたが、薬効で優良品種を選抜しようという試みはこれまでほとんどなかった。最近になって、大和シャクヤクからアンドロジェン結合活性を有する新規成分が報告されている^{15, 16)}。しかし、多品種間でホルモン結合活性を比較検討しているわけではない。また、小松らは、品種別及び産地別のシャクヤクについて、成分分析による比較及び塩基配列の比較による系統解析を行っている¹⁷⁾。

本研究では、薬用植物指導センターで栽培しているシャクヤクの内、薬効成分の含有率、園芸品種としての等級などを考慮して選抜した品種のエキスを用いて薬理活性を比較検討し、優良品種の選別を行って富山ブランドのシャクヤクの栽培普及につなげることを目的に実施している。今回、

ポリフェノールなど植物に多く含まれる成分が有する抗酸化作用について効力比較を行ったので報告する。

実験結果

実験方法

1. シャクヤク採取及びエキス調製

今回用いたシャクヤクは、薬用植物指導センターで栽培しているものであり、特に断らない限り植え付け後8年目の株を掘り起こして用いた。これらは、洗浄した後凍結乾燥し、生薬粉碎機で粉末にしてエキス調製に用いた。また、比較市販品として、国内産（ツムラ）及び中国産（ウチダ漢方）についても試験に供した。

シャクヤクのエキス調製は第15改正日本薬局方「シャクヤク」の定量法¹⁾を参考に、以下のように行った。すなわち、60gの粉末に10倍量のメタノール/水混液（1：1）を添加し、1時間、加熱還流して抽出した。これを、冷却後ろ紙でろ過して抽出液を採取した。抽出残渣は、同量の抽出溶媒により再度同条件で抽出した。各々の抽出液を40℃以下で約100mLになるまで濃縮した後、真空凍結乾燥を行い、エキスを調製した。これらエキスを粉末とした後、混合し、分包して乾燥剤と共にアルミ箔袋に入れ、密封して保存した。

2. ジフェニルピクリルヒドラジル還元能の測定

抗酸化作用は、安定ラジカルであるジフェニルピクリルヒドラジル（DPPH）に対する還元能により測定した。すなわち、0.1mM DPPH エタノール溶液0.75mlに試料溶液を添加し、エタノールを添加して全量1mlにした。37℃で20分間反応した後517nmの吸光度を測定し、対照の吸光度に対する減少率を求めた。

3. 試薬

本試験に供した試薬は、ペオニフロリン、アルビフロリン、ペオノール、ペンタガロイルグルコース（PGG）、没食子酸（以上、和光純薬）及びカテキン（東京化成）である。

1. シャクヤク成分の抗酸化活性

シャクヤクの含有成分であるペオニフロリン、アルビフロリン、ペオノール、PGG、没食子酸及びカテキンの抗酸化作用を検討した。その結果、表1に示すように、モノテルペン配糖体であるペオニフロリンでは、39.8%（1mM）、アルビフロリンでは22.4%（1mM）の還元能を示した。また、ペオノールでは用いた最大量0.5mMでもまったくDPPHを還元しなかった。一方、PGGは、強い抗酸化活性を示し、DPPHの半量を還元するのに必要な濃度（EC₅₀）は、1.45μMと陽性対照のα-トコフェロールやアスコルビン酸より10倍以上強かった。また、没食子酸のEC₅₀値は、5.46μM、カテキンでは10.6μMとPGGより弱いものの、いずれも陽性対照より強い活性を示した。

2. 各品種のシャクヤクエキスの抗酸化活性

次に、各品種のシャクヤクエキスの抗酸化活性を、優良品種とされる梵天種及び市販品の活性を対照として比較検討した（表2）。その結果、対照品の中では梵天種が最も強い活性を示し、EC₅₀値は13μg/mlであった。また、市販品の国産品は23.3μg/ml、中国産は、24.7μg/mlであり、梵天種より弱かった。

シャクヤクエキスの抗酸化活性は、品種間でかなりの差が見られ、最も強い活性を示したブライダルシャワーのEC₅₀値は10.5μg/mlであるのに対して、最も弱いカンサスのEC₅₀値は39.4μg/mlと3.75倍の差が見られた。優良品種とされる梵天種の効力と同等あるいはそれ以上に強い品種は、ブライダルシャワーの他に、エジェリスパーパー、春の虹、白雪、ピンクドクター及び華燭の典の6種であった。

今回、華燭の典及び梵天種では、栽培期間の異なる標品についても抗酸化活性を検討した。その結果、華燭の典の8年物のEC₅₀値は12.2μg/ml、3年物では22.9μg/ml、また、梵天の8年物のEC₅₀値は13μg/ml、4年物では34.6μg/mlと長期栽培品の方が、活性が強い傾向が見られた。

Table 1 Potency of components in *Paeonia lactiflora* for the reduction of DDPH

	EC ₅₀ value (μM)
Pentagalloylglucose	1.45
Gallic acid	5.46
Catechin	10.6
Paeonol	>500 (0%)
Paeoniflorin	>1,000 (22.4%)
Albiflorin	>1,000 (39.8%)
α-tocopherol	16.7
Ascorbic acid	17.5

Each value shows the mean value of 2-3 experiments. Number in parenthesis shows the mean reduction percentage of 2 experiments in 500 or 1,000μM of each compound.

考 察

薬用植物指導センターでは、シャクヤクの栽培普及を図るため、生薬生産と切り花生産を兼用できる品種の調査研究を行っている。村上らは、これまで順次導入してきた *Paeonia lactiflora* 種について、ペオニフロリン、アルビフロリン及び灰分分析などを実施し、薬用種としての適性などを評価し、報告している⁴⁻¹⁴⁾。小松は、シャクヤクの遺伝子解析により国産及び中国産の系統分析及び成分分析による薬用種としての適合性を報告している¹⁷⁾。また、柴原¹⁸⁾

Table 2 Potency of extracts from 62 specoes of *Paeonia lactiflora* for the reduction of DPPH

Name	EC ₅₀ value	Name	EC ₅₀ value	Name	EC ₅₀ value	Name	EC ₅₀ value
Bridal shower	10.5	Sarah Bernhardt	20.9	Bunker Hill	25.8	Sorbet	32.4
Edulis Superba	10.9	Mine-no-yuki	21.4	Hyouten	26.4	Haresugata	32.4
Haru-no-niji	11.3	Shinano No. 3	22.2	Sebastian Maas	26.9	Komazawa	32.8
Shirayuki	11.4	Yukuharu	22.3	Takizawa-aka	27.1	Kagerou	32.9
Pink doctor	11.9	Sugadaira No.30	22.6	Honey Gold	27.2	Bonten (cultivation for 4 years)	34.6
Kashoku-no-ten	12.2	Kashoku-no-ten (cultivation for 3 years)	22.9	Red Baron	27.5	Karl Rosenfield	34.7
Bonten	13.0	Venus	23.1	Yamabiko	27.5	Hinamatsuri	35.1
Miss claim	13.6	Mister Hermeric	23.1	Flora	27.6	Festiva Maxima	35.1
Miyama-no-yuki	16.3	Yuubae	23.3	Momoyama	27.9	Aratama	35.9
Shinano-no-yuki	16.3	Domestic product (on the market)	23.3	Roosevelt	28.2	Shinano-no-haru	36.8
Kitasaisyuu	16.5	Miss Eckhart	23.4	Elsa Sass	28.2	Shinsetsu	37.3
Alps	16.7	Taki-no-yosooi	23.6	Gion	28.5	Eclipse	37.5
Haru-no-yosooi	16.9	Peter Brand	23.6	Rinbu	28.8	Miss America	38.3
Bridal Icing	17.0	Himatsuri	24.6	Esugata	29.4	Haru-no-sato	38.3
Yatoris	17.3	Chinese product (on the market)	24.7	Avalanche	31.7	Kansas	39.4
Martha Reed	17.7	Madame Purple	25.2	La Tendresse	32.0		
Richard	18.9	Fujimusume	25.4	Dachesse de Nemours	32.2		

Each value shows the mean value(μM) of 3 experiments.

ら、後藤¹⁹⁾ら、島田²⁰⁾らは、富山県産、国内産及び中国産シャクヤクの薬効について、培養細胞、病態動物を用いた試験及び臨床試験などで比較検討している。しかし、多数の薬用品種を用いた薬理試験の報告は見当たらない。そこで、選択した62品種について、生薬シャクヤクで期待される薬効の薬理試験及び成分分析を現在検討中である。今回、種々の疾患の発症に関与することが示唆されているフリーラジカルの消去能について検討した。

植物には、抗酸化作用を有するポリフェノールやフラボノイドなどが多く含まれることが知られており、活性酸素が種々の疾患の発症原因として知られていることから、これらの化合物も各種疾患予防あるいは治療の有効成分として関与していることが推察される^{21,22)}。シャクヤク中には、指標成分であるペオニフロリンの他、アルビフロリン、ペオノール、カテキン及びPGGなどが含まれることが報告されている。そこで、いくつかの成分について、DPPH還元能で抗酸化活性を検討した結果、ペオニフロリン、アルビフロリン及びペオノールは、抗酸化活性をほとんど示さないが、ポリフェノールの一種であるPGGが強い活性を示した。データには示さないが、緑茶に含まれる代表的なカテキンであるエピガロカテキンガレート (EGCG) のEC₅₀値は3.36 μMであるのに対して、PGGのそれは1.45 μMと倍以上の効力を示した。この他、没食子酸の抗酸化活性は、5.46 μM、カテキンのそれは10.6 μMであり、シャクヤクエキスの抗酸化活性は、モノテルペン類ではなく、カテキンや没食子酸の関連化合物の活性に起因するものと考えられる。

今回、シャクヤクエキス62種について、抗酸化活性を比較検討した。その結果、ブライダルシャワーが最も強い

抗酸化活性を示し、EC₅₀値は10.5 μg/mlであるのに対して、最も弱いカンサスでは、EC₅₀値は39.4 μg/mlと3.75倍の差が品種間で認められた。優良品種とされる梵天 (8年物) のEC₅₀値は13.0 μg/mlであり、同等あるいは、より優れた効力を有する品種は6種類であった。即ち、ブライダルシャワーの他、エジェリスパーパー、春の虹、白雪、ピンクドクター及び華燭の典 (8年物) であった。今回、対照に用いた市販品は、国産が23.3 μg/ml、中国産が24.7 μg/mlで中程度の抗酸化能を示した。興味あるデータとして、栽培年数の異なる品種の抗酸化能である。即ち、梵天 (8年物) のEC₅₀値は13.0 μg/mlであるのに比べ、4年物では、34.6 μg/mlであった。また、華燭の典 (8年物) では、EC₅₀値は12.2 μg/mlであるのに比べ、3年物では22.9 μg/mlと抗酸化能は弱かった。この結果から、小なくともこの2品種は、栽培年数の経た根の方が、抗酸化効力が強い事が示唆された。今後、成分分析の結果を待たなければならぬが、抗酸化物質が生育と共に増加するものと推察される。

Leeらは、シャクヤクのメタノール抽出物にDPPH還元能及び過酸化水素消去能があることを認め、さらにこのエキスに過酸化水素による神経細胞のアポトーシスを抑制する効果のあることを報告している²³⁾。また、糖尿病合併症の一つである腎症の発症には酸化ストレスが関与するが、シャクヤクの配糖体画分がこれを阻止する事が報告されている²⁴⁾。さらに、柴原は¹⁸⁾、産地別及び修治の異なるシャクヤクの活性酸素消去能を検討し、シャクヤクエキスは、強い活性酸素消去能を有するが、産地及び修治による有意な差は認めないと報告している。今回、調べたシャクヤクエキスの抗酸化能は、最も効力の強かったブライダルシャ

ワ-の10.5 $\mu\text{g/ml}$ から、最も弱いカンサスの39.4 $\mu\text{g/ml}$ まで3.5倍以上の差が認められた。種々の疾患の発症因子の一つに活性酸素が上げられていることから、抗酸化能の効力も考慮して、シャクヤクに期待されている生物活性の評価の結果から最終的に優良品種を選抜出来ればと考える。

謝 辞

本研究の実施に際し、ご協力いただきました種村政浩さん、山下景子さんに感謝いたします。

引用文献

- 1) 第十五改正日本薬局方解説書, 広川書店(2006), D-324
- 2) 鳥居塚和生: 生薬の薬効・薬理 (伊田喜光, 寺沢捷年監修), 医歯薬出版 (2003)
- 3) 和漢薬物学 (高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男編), 南山堂 (1983) p286-289
- 4) 村上守一, 寺西雅弘, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について-, 富山県薬事研究所年報, **15**, 112-121 (1988)
- 5) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (その3)-, 富山県薬事研究所年報, **19**, 116-122 (1992)
- 6) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (その4)-, 富山県薬事研究所年報, **21**, 90-99 (1994)
- 7) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (その5)-, 富山県薬事研究所年報, **22**, 108-117 (1995)
- 8) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (その6)-, 富山県薬事研究所年報, **23**, 98-103 (1996)
- 9) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (その7)-, 富山県薬事研究所年報, **25**, 67-72 (1998)
- 10) 村上守一: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (第8報)-, 富山県薬事研究所年報, **28**, 86-89 (2001)
- 11) 村上守一, 田中彰雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (第9報)-, 富山県薬事研究所年報, **32**, 60-63 (2005)
- 12) 村上守一, 田中彰雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (第10報)-, 富山県薬事研究所年報, **34**, 39-42 (2007)
- 13) 村上守一, 田中彰雄: シャクヤクの栽培研究一切花用品種の品質について (第11報)-, 富山県薬事研究所年報, **36**, 54-58 (2009)
- 14) 田村隆幸, 田中彰雄, 内正人, 村上守一: シャクヤクの栽培研究-8年間栽培したシャクヤクの品質について-, 富山県薬事研究所年報, **37**, 57-64 (2010)
- 15) Washida, K., Itoh, Y., Iwashita, T. and Nomoto, K.: Androgen modulators from the roots of *Paeonia lactiflora* (Paeoniae radix) grown and processed in Nara prefecture, Japan, Chem. Pharm. Bull., **57**, 971-974 (2009)
- 16) Washida, K., Yamagaki, T., Iwashita, T. and Nomoto, K.: Two new galloylated monoterpene glycosides, 4-O-galloylbiflorin and 4'-O-galloylpaeoniflorin, from the roots of *Paeonia lactiflora* (Paeoniae radix) grown and processed in Nara prefecture, Japan, Chem. Pharm. Bull, **57**, 1150-1152 (2009)
- 17) 小松かつ子, 富山県ブランド生薬の開発: 遺伝的・成分的多様性の解析, 和漢薬・バイオテクノロジー研究 研究成果報告書 (平成21年度富山県受託研究), p17-21 (2010)
- 18) 柴原直利, 富山県産芍薬の抗酸化作用および臨床効果に関する研究, 和漢薬・バイオテクノロジー研究 研究成果報告書 (平成14年度富山県受託研究), p43-47 (2003)
- 19) 後藤博三, 芍薬の血管作動性と病態モデル動物に対する効果に関する研究, 和漢薬・バイオテクノロジー研究 研究成果報告書 (平成15年度富山県受託研究), p49-54 (2004)
- 20) 嶋田豊, 富山県産生薬の神経細胞保護作用に関する研究, 和漢薬・バイオテクノロジー研究 研究成果報告書 (平成14年度富山県受託研究), p60-63 (2003)
- 21) 寺尾純二, 芦田均, 機能性ポリフェノール, 化学と生物, **44**, 688-698 (2006)
- 22) 抗酸化物質 (二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真編集), 学会出版センター (1995)
- 23) Lee, S.-M., Yoon, M.-Y. and Park, H.-R.: Protective effect of *Paeonia lactiflora* pall on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells, Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 1272-1277 (2008)
- 24) Su, J., Zhang, P., Zhang, J.-J., Qi, X.-M., Wu, Y.-G. and Shen, J.-J.: Effects of total glucosides of paeony on oxidative stress in the kidney from diabetic rats, Phytomedicine, **17**, 254-260 (2010)

がん細胞による免疫抑制を克服する天然薬物の探索

小笠原勝, 生谷尚士¹, 刈米アイ¹, 長井良憲¹, 松永孝之

¹ 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

Screening of natural compounds for the restorative activity against immunosuppression by tumor cells.

Masaru OGASAWARA, Masashi IKUTANI, Ai KARIYONE,
Yoshinori NAGAI, Takayuki MATSUNAGA

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

要 約

TGF- β などの免疫抑制因子は、制御性T細胞の誘導、エフェクターT細胞の増殖阻害、Th1サイトカインの産生阻害、及びナチュラルキラー(NK)細胞の機能障害などを介して、抗腫瘍免疫応答を抑制していることが示されている。このことから、免疫抑制因子の作用を阻止することは、低下した抗腫瘍免疫応答を回復させる上で極めて重要であると考えられている。本研究では、まず、免疫抑制因子の阻害作用を解除できる天然物を探索するための評価系を構築し、次いで当該評価系にて自然免疫系細胞の強力な活性化物質であるToll様受容体(TLR)アゴニストの効果を検討した。評価の指標は細胞傷害活性とし、エフェクター細胞にはマウス脾臓細胞、ターゲット細胞にはNK細胞に感受性のあるマウスYAC-1細胞を用いた。免疫抑制因子にはTGF- β 、PGE2、及びIL-10を用いた。TLR3アゴニストであるポリ(I:C)は、脾臓細胞の細胞傷害活性を濃度に依存して亢進させた。TGF- β 、PGE2、及びIL-10は、いずれもポリ(I:C)の亢進作用を抑制したが、TGF- β の抑制作用が最も顕著であった。TGF- β により抑制された細胞傷害活性を回復させるため、各種TLRアゴニストの効果について検討した。その結果、ロキシリピンあるいはCpGにより、低下した細胞傷害活性を完全に回復させることができた。注目すべき点として、ロキシリピンの効果は、TGF- β 刺激前の処置だけでなく後処置でも有効であった。これらの結果から、本研究で構築した評価系は、TGF- β による抑制作用を解除できる天然物を探索する上で有用であると考えられた。また、ロキシリピンは、TGF- β などの免疫抑制因子による抗腫瘍免疫応答の抑制を解除する上で有用な化合物であることが示唆された。

Summary

Immunosuppressive factors such as TGF- β are shown to reduce the activity of antitumor immunity by inducing regulatory T cells and inhibiting effector T cell proliferation, Th1 cytokine production, and natural killer cell function. These observations suggest that blockade of the effects of immunosuppressive factors is one of promising approaches to restore the decreased responses of the antitumor immunity. In the present study, an evaluation system to search for natural products to be able to recover the suppression by immunosuppressive factors of the cytolytic activity of mouse splenocyte to mouse YAC-1 cells was constructed. Then, Toll-like receptor (TLR) agonists that strongly stimulated innate immunity were examined on the suppressive activity of the immunosuppressive factors of TGF- β , PGE2, and IL-10 in the established evaluation system. A TLR3 agonist, poly(I:C), potentiated the cytolytic activity of splenocyte. Among TGF- β , PGE2 and IL-10, TGF- β inhibited the poly(I:C)-stimulated splenic cytolysis with highest potency. To recover the cytolytic activity suppressed by TGF- β , the effects of several TLR agonists were examined. As a result, the decreased cytolytic activity was completely restored in the treatment with loxoribine or CpG. Interestingly, loxoribine, not CpG, was effective in the post-treatment of TGF- β as well as in the pre-treatment. These results suggest that the evaluation system that constructed in the present study was useful for the screening of natural compounds having the restorative activity against immunosuppression by TGF- β . Also, loxoribine was found to be a promising agent for recovering the reduced activity of antitumor immunity by immunosuppressive factors including TGF- β .

キーワード：TGF- β ；ナチュラルキラー細胞，免疫抑制

Keywords：TGF- β ；natural killer cell；immunosuppression

がんの免疫療法は、近年、精力的に研究が進められ臨床応用されつつあるが、これまでのところ多くの場合十分な治療成績は得られていない。この主な原因の一つとして、担がん状態で認められるT細胞やnatural killer (NK) 細胞の抗腫瘍活性の減弱が指摘されている^{1,2)}。より有効ながん免疫療法を確立するためには、これらの免疫抑制機構を解明し克服することが重要である³⁾。

これまでの多くの研究から、担がん状態で認められる免疫抑制に関与する因子としては、transforming growth factor (TGF)- β やprostaglandin E2 (PGE2), interleukin (IL)-10などが明らかにされている。これらのうち、TGF- β は、主ながん細胞から分泌され、Th1サイトカインの産生阻害やT細胞の増殖抑制、NK細胞の細胞傷害活性の阻害、さらに、制御性T細胞の誘導を介したT細胞およびNK細胞の活性抑制など、抗腫瘍免疫応答全般の抑制において最も重要な因子として機能している^{4,5)}。PGE2も主ながん細胞から分泌され、TGF- β と同様にNK細胞の細胞傷害活性の抑制に関与すると共に、Th1サイトカインの産生を阻害することで抗腫瘍免疫応答を負に制御している^{6,7)}。一方、IL-10は、がん細胞、樹状細胞、一部のT細胞などから分泌され、Th1サイトカインの産生阻害やT細胞の増殖抑制に関与している^{8,9)}。

これら免疫抑制因子を標的とした薬剤の開発が精力的に進められている。TGF- β については、抗TGF- β 中和抗体の開発¹⁰⁾、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドあるいはシグナル伝達系に対する阻害剤（多くはTGF- β タイプI受容体のセリン・スレオニンキナーゼに対する阻害剤）の開発が進められている¹¹⁾。これらのうち、中和抗体とアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発が最も進行しており第3相臨床試験中と報告されている¹¹⁾。PGE2については、シクロオキシゲナーゼ (COX)-2の阻害に基づくその産生抑制について多くの報告がなされており、多数のCOX-2阻害物質について特許の出願もなされている¹²⁾。IL-10については、IL-10のsiRNAとポリ (I:C) を併用した免疫細胞療法において、がん特異的なTh1応答を効果的に誘導できることが示されている¹³⁾。

本研究では、まず、これら免疫抑制因子の阻害作用を解除できる天然物を探索するための評価系を構築し、次いで当該評価系にて自然免疫系細胞の強力な活性化物質であるToll様受容体 (TLR) アゴニストの効果を検討した。

実験方法

1. 実験試薬

ポリイノシン-ポリシチジン酸 (ポリ (I:C)), 8-メルカプトグアノシン、及びSB431542はSigmaより購入した。

ロキソリビン及びCpGAは、Alexis Biochemicals及びHycult biotechnologyよりそれぞれ購入した。その他のTLRアゴニストはInvivoGenより購入した。

化合物はジメチルスルホキシド (DMSO)、またはリン酸緩衝生理食塩水に溶解して実験に用いた。

2. 細胞及び細胞培養

YAC-1細胞は、東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより入手した。10%の非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、0.1mg/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. 細胞傷害活性の評価

マウス (Balb/c, 7-8週令, 雌) より脾臓を採取し、脾臓細胞を調製してエフェクター細胞とした。ターゲット細胞にはcalcein-AMで標識したYAC-1細胞を用いた¹⁴⁾。これらを共培養し、4時間後の上清中の蛍光量を測定して細胞傷害活性を次式により算出した。
細胞傷害活性 (%) = (測定値 - 自然放出量) / (最大蛍光量 - 自然放出量) \times 100

4. サイトカイン濃度の測定

脾臓細胞にポリ (I:C) 及びTGF- β を添加して2時間培養後、ロキソリビンあるいはCpGAを添加して、さらに18時間培養した。培養上清を採取し、市販のELISAキット (フナコシ) によりIFN- α およびIL-12の濃度を測定した。対照群にはDMSOを同様に添加した。

結 果

免疫抑制因子による細胞傷害活性の抑制とTLRアゴニストの影響

まず、細胞傷害活性の評価系の構築を行った。エフェクター細胞には脾臓細胞、ターゲット細胞にはYAC-1細胞を用いて、ポリ (I:C) の効果を検討したところ、濃度に依存して細胞傷害活性を亢進させた (Fig. 1A)。次に、ポリ (I:C) の濃度を10 μ g/mlとして、TGF- β 、IL-10及びPGE2の影響を検討した (Figs. 1B-1D)。TGF- β 、PGE2、及びIL-10は、いずれもポリ (I:C) の亢進作用を抑制したが、TGF- β の抑制作用が最も顕著であった。

そこで、TGF- β の抑制作用に対する各種TLRリガンドの影響を検討した (Fig. 2)。いずれのTLRアゴニストも単独では細胞傷害活性を亢進させたが、ロキソリビン、CpG A及びCpG BにのみTGF- β の抑制作用に対する回復効果が認められた。

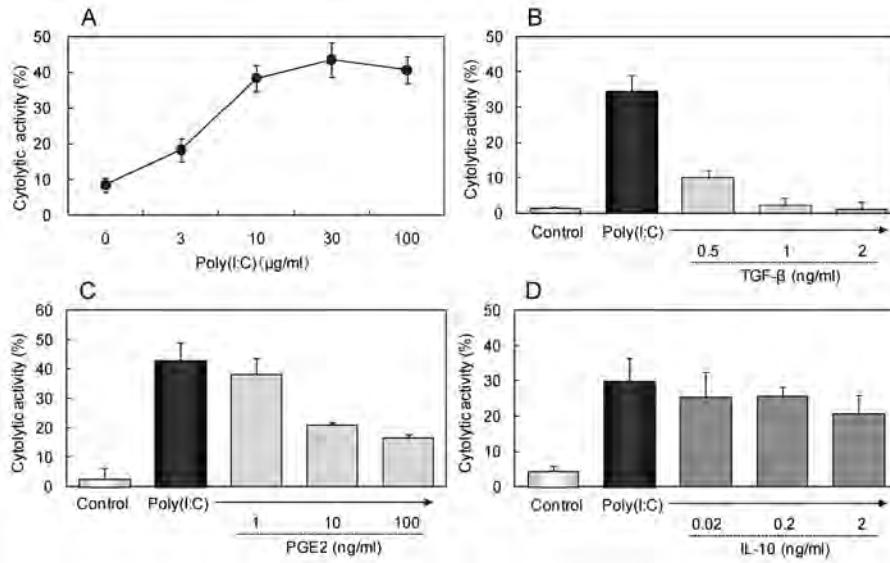


Fig. 1. Concentration-dependent enhancement of the cytolytic activity of splenocytes by poly(I:C) and effects of immunosuppressive factors on the poly(I:C)-induced splenic cytolysis.

Splenocytes were treated with poly(I:C) alone (A), or poly(I:C) (10 µg/ml) plus TGF-β (B), PGE2 (C), or IL-10 (D) for 20 h, then assessed their cytolytic activity against mouse YAC-1 cells.

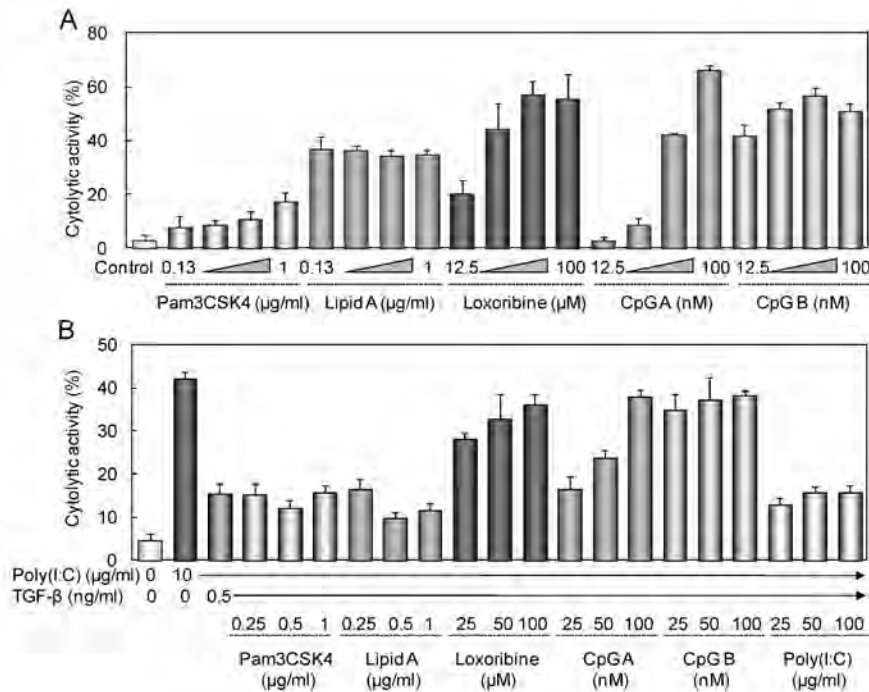


Fig. 2. Concentration-dependent enhancement of the cytolytic activity of splenocytes by various TLR agonists and effects of each TLR agonist on the TGF-β-induced suppression of the splenic cytolysis.

Splenocytes were treated with TLR agonist alone (A) or with each TLR agonist in the presence of TGF-β and poly(I:C) (B) for 20 h, then examined their cytolytic activity against mouse YAC-1 cells.

TGF- β による細胞傷害活性の抑制に対するTLR7及び9アゴニストの影響

ロキソリビン及びCpG Aの有効性について、TGF- β の前処置及び後処置での効果を比較検討した (Fig. 3). ロキソリビンはいずれの処置条件においてもTGF- β の抑制作用を回復させた. 一方、CpG Aは、TGF- β の前処置の場合においてのみ十分な有効性を示した. また、TGF- β 受

容体type I 阻害剤 (SB431542) の効果も、TGF- β の前処置の条件でのみ認められ、後処置では明らかに減弱した.

ロキソリビンはTLR7のアゴニストあることから、他のTLR7アゴニストについても同様に比較検討した (Fig. 4). 8-メルカプトグアノシン及びイミキモドは、いずれも単独ではロキソリビンと同程度に細胞傷害活性を亢進させたが、TGF- β に対する有効性はロキソリビンより弱かった.

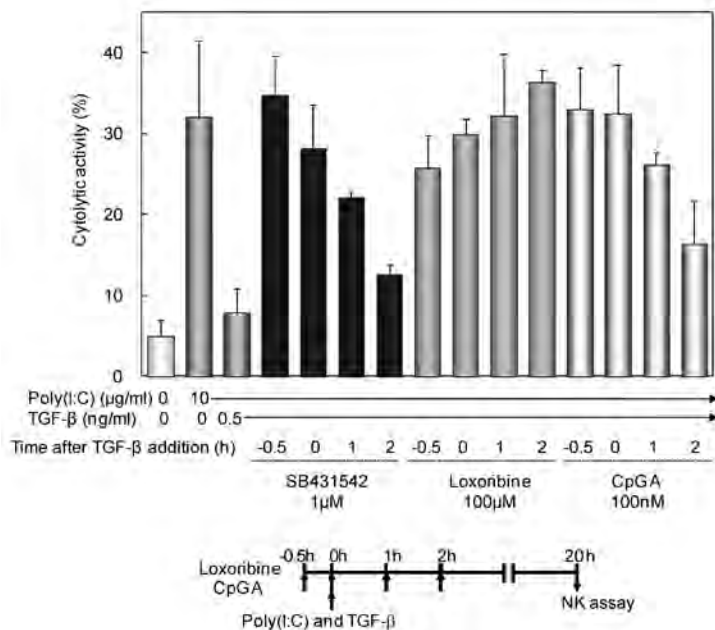


Fig. 3. Differential effects of loxoribine, CpG A, and TGF- β receptor kinase inhibitor at various time points of their addition on the TGF- β -induced suppression of the splenic cytotoxicity.

Loxoribine, CpG A, or TGF- β receptor kinase inhibitor (SB431542) were added to splenocytes before or after addition of TGF- β and poly(I:C) and the cells were incubated for an additional time. Twenty-hours later, cytolytic activity of the cells to YAC-1 cells was examined.

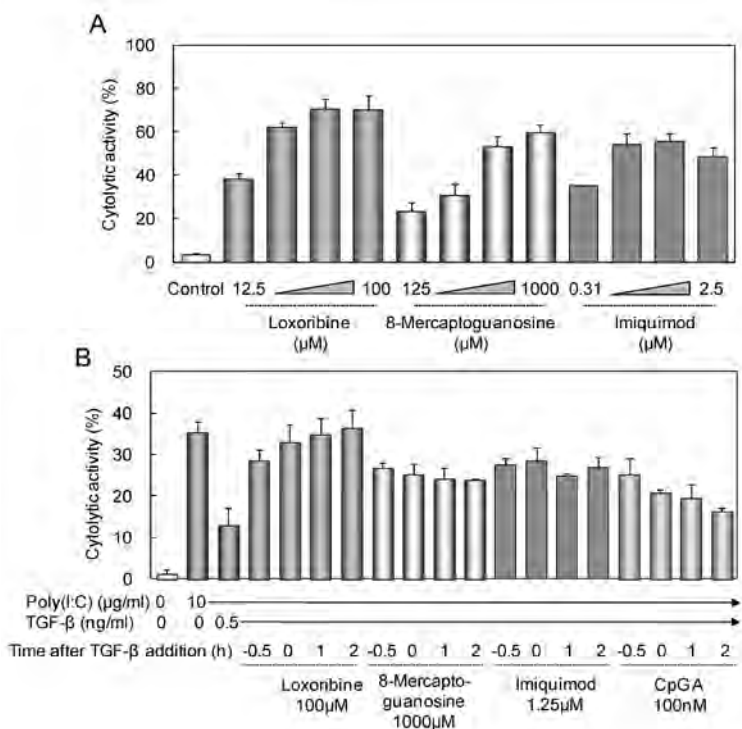


Fig. 4. Concentration-dependent enhancement by TLR7 agonists of the cytolytic activity of splenocytes and higher activity of loxoribine for recovering the TGF- β -induced suppression of the splenic cytotoxicity.

Splenocytes were treated with each TLR7 agonist in the presence of poly(I:C) and TGF- β (A) for 20 h or treated with each TLR7 agonist added at indicated time points after addition of TGF- β and poly(I:C). Then, cytolytic activity of the cells to YAC-1 cells was examined.

IFN- α 及びIL-12産生に及ぼすロキソリビンとCpG Aの比較検討

TGF- β による細胞傷害活性の抑制に対するロキソリビンの作用メカニズムを明らかにするため、Fig. 3においてロキソリビンとCpG Aの間で有効性に最も差が認められた条件にて、IFN- α 及びIL-12産生に与える影響を比較検討した。まず、IFN- α 及びIL-12産生に及ぼすポリ (I:C) 及びTGF- β 影響を検討したところ (Fig. 5)、ポリ (I:C) はIL-12の産生を誘導したが、IFN- α の産生にはほとんど影響を与えなかった。また、TGF- β は、ポリ (I:C) により誘導されたIL-12の産生を阻害しなかった。

次いで、ロキソリビンの効果をTGF- β の存在下において検討したところ、IFN- α 及びIL-12の産生をいずれもポリ (I:C) に比較して顕著に誘導したが、その効果はCpG Aより弱かった (Fig. 6)。

考 察

TGF- β 、PGE2、及びIL-10は、担がん状態で認められる主要な免疫抑制因子であるが、NK細胞の抗腫瘍活性の抑制に焦点を絞った場合、どの因子が最も重要であるのかという点については十分に検討されていなかった。そこで、本研究では、ポリ (I:C) により亢進した脾臓細胞の細胞傷害活性を指標として、TGF- β 、PGE2、及びIL-10の抑制作用を比較検討した。その結果、TGF- β が最も強い抑制作用を示すことを明らかにした。このことは、担がん状態で認められているこれら免疫抑制因子の抑制活性において、T細胞での場合と同様に、NK細胞においてもTGF- β が最も重要な因子として機能していることを示唆する。TGF- β によるNK細胞の細胞傷害活性の抑制メカニズムについては、これまで十分には明らかになされていない。本研究では、NK細胞を活性化させるために、ポリ (I:C)

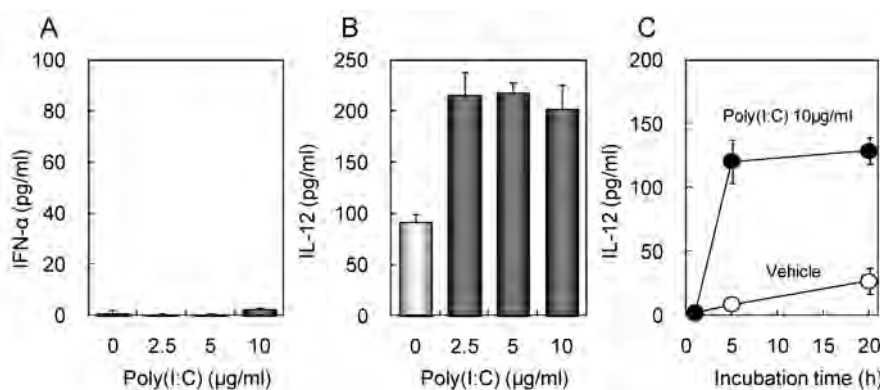


Fig. 5 Effects of poly(I:C) on the production of IFN- α and IL-12 by splenocytes.

Splenocytes were treated with poly(I:C) for 20 h. The supernatants were examined on the production of IFN- α (A) and IL-12 (B and C) by ELISA kits.

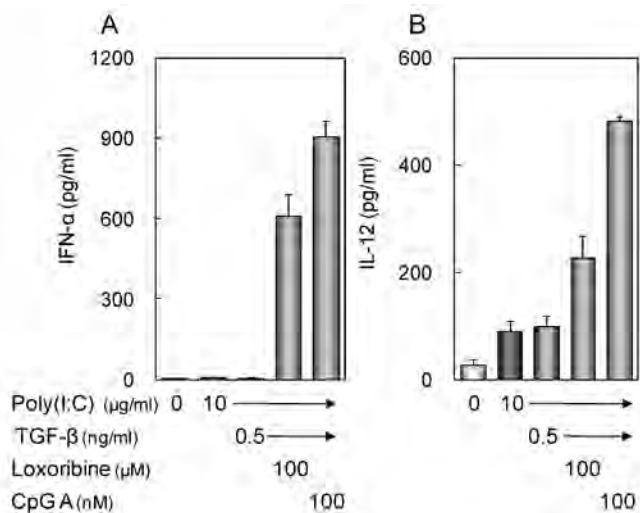


Fig. 6 Comparison of loxoribine and CpG A in the induction of interferon- α and interleukin-12.

Loxoribine and CpG A were added to splenocytes 2 h after addition of TGF- β and poly(I:C), and the cells were incubated for an additional 18 h. Then, the supernatant was collected and measured for IFN- α and IL-12 by ELISA kits.

で脾臓細胞を刺激した。このことを考慮すると、TGF- β の作用点は、これまでに報告されているNK細胞⁴⁾に加えて、ポリ (I:C) の添加によりNK細胞の活性化が誘導されるまでのいずれかの応答プロセスにあると考えられる。これまでの報告から、ポリ (I:C) の受容体 (TLR3) はマウス脾臓由来のNK細胞には発現していないこと¹⁵⁾、ポリ (I:C) は樹状細胞やマクロファージに作用しIL-12の産生を誘導すること¹⁶⁾、また、IL-12はNK細胞を強力に活性化することが示されている¹⁷⁾。確かに、本研究においても、ポリ (I:C) で脾臓細胞を刺激した際、IL-12の産生が誘導された。しかし、TGF- β はIL-12の産生を全く阻害しなかった。このことは、TGF- β による細胞傷害活性の抑制が、IL-12の産生阻害によるものではないことを示している。最近、ポリ (I:C) による新たなNK細胞活性化メカニズムとして、ポリ (I:C) 刺激により樹状細胞膜上に誘導される分子を介した樹状細胞とNK細胞との直接的な相互作用が重要であることが報告された¹⁸⁾。本研究においてもこのような活性化機構が関与しているかは現在のところ不明である。今後、TGF- β の抑制メカニズムを解明するには、IL-12によるNK細胞活性化機構への影響に加えて、樹状細胞などとNK細胞との細胞間接着を介した活性化機構への影響についても検討する必要がある。

TGF- β により抑制されたNK細胞の抗腫瘍活性を回復させる方法としては、TGF- β の作用に対する阻害剤を用いる他に、強力な免疫賦活物質によりNK細胞を再活性化させる方法が考えられる。TLRアゴニストは自然免疫系細胞を顕著に活性化させる物質であり、医薬品としての有用性が期待されている¹⁹⁾。そこで、本研究において構築した評価系を用いて、各種TLRアゴニストの効果を比較検討した。その結果、ロキソリビン、CpG A、及びCpG Bに、TGF- β により抑制された細胞傷害活性を回復させる効果を認めた。さらに、これらTLRアゴニストについて、TGF- β の前処置と後処置での有効性を検討したところ、ロキソリビンのみが、いずれの条件においても有効であった。TGF- β 受容体キナーゼ阻害剤 (SB431542) の効果が、TGF- β の後処置では明らかに減弱したことを考えると、ロキソリビンがTGF- β の後処置においても有効性を示したことは注目になる。ロキソリビンはTLR7のアゴニストであることから、他のTLR7アゴニストについても同様に検討したところ、ロキソリビンが最も高い有効性を示した。このことは、ロキソリビンがTGF- β により抑制されたNK細胞の抗腫瘍活性を回復させる薬剤として有用である可能性を示している。ロキソリビンの作用メカニズムを明らかにするために、NK細胞の活性化作用を有するIFN- α 及びIL-12の産生をCpG Aと比較検討したが、いずれの場合もCpG Aより産生誘導能が低く、これらサイトカインの産生増強作用

ではロキソリビンの作用メカニズムを説明できなかった。今後、ロキソリビンの標的細胞がNK細胞なのか、あるいはそれ以外の免疫細胞なのかを明らかにするとともに、細胞傷害活性に直接関与しているパーフォリン、TGF- β 受容体、TLR7などの発現量の変動、及びTGF- β のシグナル伝達系に与える影響についても検討を行う必要がある。

本研究では、脾臓細胞の細胞傷害活性を指標として、免疫抑制因子による阻害作用を解除できる天然物の探索に有用な評価系を構築した。また、この評価系を用いて、ロキソリビンが、担がん状態で認められる抗腫瘍免疫応答の抑制を解除する上で有用な化合物である可能性を示した。

謝 辞

本研究は、第Ⅱ期知的クラスター創成事業 (天然薬物の免疫制御を活用した医薬品シーズの探索; 代表者: 高津聖志 所長, 富山県薬事研究所) の一環として実施された。

文 献

- 1) Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.*, **10** (9), 909-915 (2004)
- 2) Teicher B.A.: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.*, **13** (21), 6247-6251 (2007)
- 3) 河上裕: ヒト腫瘍免疫学の進歩と癌免疫療法開発, *細胞工学*, **29** (3), 267-273 (2010)
- 4) Bierie B., Moses H.L.: Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **21** (1), 49-59 (2010)
- 5) Yang L., Pang Y., Moses H.L.: TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, **31** (6), 220-227 (2010)
- 6) Martinet L., Jean C., Dietrich G., Fournié J.J., Poupot R.: PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling. *Biochem. Pharmacol.*, **80** (6), 838-845 (2010)
- 7) Mitsuhashi M., Liu J., Cao S., Shi X., Ma X.: Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J. Leukoc. Biol.*, **76**(2), 322-332 (2004)
- 8) Chen Q., Daniel V., Maher D.W., Hersey P.: Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role

- in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer.*, **56** (5), 755-760 (1994)
- 9) Sharma S., Stolina M., Lin Y., Gardner B., Miller P.W., Kronenberg M., Dubinett S.M.: T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol.*, **163** (9), 5020-5028 (1999)
 - 10) Terabe M., Ambrosino E., Takaku S., O'Konek J.J., Venzon D., Lonning S., McPherson J.M., Berzofsky J.A.: Synergistic enhancement of CD8+ T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.*, **15** (21), 6560-6569 (2009)
 - 11) Nagaraj N.S., Datta P.K.: Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs.*, **19** (1), 77-91 (2010)
 - 12) Ramalho T.C., Rocha M.V., da Cunha E.F., Freitas M.P.: The search for new COX-2 inhibitors: a review of 2002 - 2008 patents. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **19** (9), 1193-1228 (2009)
 - 13) Akasaki Y., Kikuchi T., Irie M., Yamamoto Y., Arai T., Tanaka T., Joki T., Abe T.: Cotransfection of Poly (I : C) and siRNA of IL-10 into fusions of dendritic and glioma cells enhances antitumor T helper type 1 induction in patients with glioma. *J. Immunother.*, **34** (2), 121-128 (2011)
 - 14) Roden M.M., Lee K.H., Panelli M.C., Marincola F.M.: A novel cytolysis assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *J. Immunol. Methods.*, **226** (1-2), 29-41 (1999)
 - 15) Miyake T., Kumagai Y., Kato H., Guo Z., Matsushita K., Satoh T., Kawagoe T., Kumar H., Jang M.H., Kawai T., Tani T., Takeuchi O., Akira S.: Poly I:C-induced activation of NK cells by CD8 alpha+ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. *J. Immunol.*, **183** (4), 2522-2528 (2009)
 - 16) Matsumoto M., Seya T.: TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly (I : C). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60** (7), 805-812 (2008)
 - 17) Brunda M.J.: Interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.*, **55** (2), 280-288 (1994)
 - 18) Ebihara T., Azuma M., Oshiumi H., Kasamatsu J., Iwabuchi K., Matsumoto K., Saito H., Taniguchi T., Matsumoto M., Seya T.: Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.*, **207** (12), 2675-2687 (2010)
 - 19) Gnjatic S., Sawhney N.B., Bhardwaj N.: Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants? *Cancer J.*, **16** (4), 382-391 (2010)

赤むすび米ぬかの脂肪蓄積抑制作用の評価

永井 秀昌, 出町 幸男, 村田 和優¹⁾, 前田 寛明¹⁾, 鹿島 真樹²⁾

¹⁾ 農林水産総合技術センター 農業研究所, ²⁾ 農林水産総合技術センター 食品研究所

Evaluation of Inhibitory Effect for Lipid Accumulation of 'Akamusubi' Rice Bran

Hidemasa NAGAI, Yukio DEMACHI, Kazumasa MURATA¹⁾, Hiroaki MAEDA¹⁾, Masaki KASHIMA²⁾

¹⁾ Agricultural Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry & Fisheries Research Center

²⁾ Food Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry & Fisheries Research Center

要 約

富山県農林水産総合技術センター農業研究所が開発した赤色コシヒカリ品種「赤むすび」米ぬか「以下「赤むすび米ぬか」という。」の脂肪蓄積抑制作用を細胞、動物レベルで評価した。

3T3-L1脂肪細胞を用いて、脂肪滴蓄積をオイルレッド染色で評価した結果、赤むすび米ぬか抽出液は濃度依存的に脂肪滴蓄積を抑制し、その強さは既存の赤米品種米ぬか抽出液と同程度であった。また、2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスに赤むすび由来米ぬかを12週間投与した結果、血漿中トリグリセライド及び空腹時血糖の増加抑制作用並びに、内臓脂肪の蓄積抑制作用が確認された。一方、コレステロール値及び遊離脂肪酸量には差が認められなかった。また、赤むすび米ぬか投与群では血漿中アディポネクチン及びインスリンの増加が認められた。これらの結果より、赤むすび米ぬかには、アディポカインの分泌を促進することにより、内臓脂肪の蓄積を抑制する可能性が示唆された。

Summary

We aimed to investigate the effects of Akamusubi rice bran on 3T3-L1 adipogenesis and an animal model of diabetes. Inhibitory effect of lipid accumulation of Akamusubi rice bran in adipocytes was examined by oil Red O staining.

Akamusubi rice bran inhibited 3T3-L1 adipocyte differentiation in a dose-dependent manner, whereas there was no significant effect on Koshihikari rice bran. Plasma triglyceride and glucose levels were significantly lower in the Akamusubi-administrated group than those in the control or Koshihikari group, although plasma total cholesterol and NEFA levels did not differ between the groups. Also epididymal adipose tissue weights were significantly lower in db/db mice fed the 10% Akamusubi than control or Koshihikari group.

These results suggested that an inhibitory effect of Akamusubi rice bran on lipid accumulation may be associated with secretory stimulation of adiponectin and insulin.

キーワード：米ぬか, 赤むすび, 脂肪細胞, メタボリックシンドローム

Keywords：Rice bran, Akamusubi, Adipocyte, Metabolic syndrome

近年、若年層の生活習慣病は増加の一途を辿っており、内臓脂肪蓄積による肥満を基軸とし、高血糖、高脂血症及び、高血圧等が合併した状態であるメタボリックシンドロームが注目されるようになってきている。この対策には、現在500億円を超える国家予算を計上するなど、国を挙げた取り組みが実施されている。このような背景から、国民の食と健康に対する関心が高まっており、消費者ニーズに応える健康維持・増進型作物の開発が求められている。我々はこれらの現状を踏まえ、健康を維持・向上させ疾患を防ぐ豊かな食生活の構築に向けて、薬理効果に優れた新水稻品種の開発に取り組んでいる。

赤米とは、古代米と称される有色素米の一種であり、玄

米の外層部の種皮層にタンニン系の赤色色素が蓄積した品種のことである。赤色の色素成分としては、カテキンやカテコールタンニンが報告されている¹⁾。また、近年ではカテキン類を構成単位としたプロアントシアニジンの存在が証明され、赤米の生理機能との関係も報告されている²⁾。富山県農林水産総合技術センター農業研究所（以下「農業研究所」という。）では、これまでに数十品種の赤米の抗酸化活性を測定し、品種間で活性に差異があることを確認している。しかしながら既存の赤米品種は、栽培特性や食味の面での欠点が多く、一般に普及していない状況にある。

そこで、農業研究所では赤米の栽培上および食味上の問題を解決するため、インドの赤米在来品種「カサラス」に

「コシヒカリ」を5回交配し、選抜を重ねて、「コシヒカリ」と同じ栽培特性および食味をもちながら玄米のみが赤色を呈する新品種「赤むすび」を育成した(2007年育成, 2008年品種登録)。本研究では, この赤むすび米ぬかの機能性を評価するため, 特に赤米色素の持つ脂肪蓄積抑制作用に着目し, 細胞・動物レベルにおいて比較評価を行った。

実験材料及び実験方法

1. 細胞実験用米ぬか抽出液の調製

細胞実験にはコシヒカリ, 赤むすび, 紅衣, 紅更紗の4品種を用いた。紅衣, 紅更紗はともに国内で品種改良された赤米品種である。供試する米ぬか抽出液は, 以下の方法で農業研究所において調製した。

各品種の玄米100 gをトーヨーテスター精米機MC-90A(東洋精米機製作所)を用いてとう精し, 約5 gの米ぬかを精製した。精製した米ぬか1.5 gに5 mlのジメチルスルホキシド(DMSO)を加え, 室温暗所で一晚抽出した。この抽出液(300 mg/ml)を遠心分離(3000 rpm, 20 min)し, その上清を試料抽出液とした。得られた抽出液は培地調整時に遠心分離(3000 rpm, 10 min)し, 上清を希釈して0.1% DMSO溶液に調整し, 検体とした。

2. 脂肪細胞の培養および分化の評価

3T3-L1脂肪前駆細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。3T3-L1脂肪前駆細胞はDMEM培地(10% calf serum含有)を用いて96wellマイクロプレートに 4×10^4 個/wellで播種し, 飽和状態(コンフルエント)に達するまで培養した(37°C, 5%CO₂, 7日間)。次にDMEM培地(10% fetal bovine serum含有)に交換し, 3日間培養した後, 分化誘導剤である3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; シグマアルドリッチジャパン株式会社), dexamethazone (シグマアルドリッチジャパン株式会社), insulin (和光純薬株式会社)及び検体を含むDMEM培地で2日間培養した。その後, さらに検体のみを含むDMEM培地で8日間培養し, 培養中は2日毎に培地を交換した。検体添加後10日目にオイルレッド(Oil Red-O)染色液を含むリピットアッセイキット(和光純薬工業株式会社)を用いて脂肪滴を染色した。色素をイソプロパノールで抽出した後, 吸光度(OD: 550 nm)を測定し, コントロールの吸光度を100%として脂肪滴の蓄積率を算出した。

なお, ポジティブコントロールには細胞内での糖輸送を活性化し, 脂肪細胞の分化誘導を抑制することが報告されている³⁾タンニン酸(和光純薬工業株式会社)を使用した。

3. 動物実験用米ぬかの調製

動物実験用には農業研究所より供与されたコシヒカリ, 赤むすび及びカサラスの3品種の米ぬかを用いた。赤むすび育成の親品種であるカサラスは赤米のうるち品種である。1000 µmの網目で篩下した各種米ぬか50 gを粉末飼料(日本農産工業株式会社, ラボMRストック粉末)450 gとミキサー(マルチブレンダーミル, 株式会社日本精機製作所)で混和(3000 rpm, 5 min)させたものを動物実験用米ぬか配合飼料とした。

4. 実験動物

実験動物として, 2型糖尿病マウスであるC57BL/6J db/db(5週令, 雄性)を三協ラボサービス株式会社から購入し, 2週間予備飼育後実験に供した。実験には対照群および米ぬか投与群(コシヒカリ, 赤むすび, カサラス)を設け, それぞれ1群6匹として実験を行った。

5. 米ぬか配合飼料の摂食

米ぬか配合飼料はガラス製給餌器にに入れて水道水とともに自由摂取させた。また, 米ぬか配合飼料投与は7週齢から19週齢まで12週間行った。コントロール群については米ぬか投与群とエネルギー量をほぼ同一とするため, TestDiet No.58G8 (PMI Nutrition International)を米ぬかと同量添加した(100 g当たりのエネルギー量 Testdiet No.58G8: 470 kcal, コシヒカリ米ぬか: 417 kcal, 赤むすび米ぬか: 412 kcal)。

6. 摂餌量・飲水量及び体重測定

米ぬか投与期間中は週3回摂餌量, 飲水量および動物の体重を測定した。また, 投与後5, 7, 10, 12週後に眼窩静脈より採血した。得られた血液は遠心分離(3000 rpm, 10 min)後, 上清の血漿を採取し, 血液成分値の測定に用いた。

7. 血漿中成分値及び脂肪組織重量の測定

血漿トリグリセライド, 血漿総コレステロール及び血漿グルコース濃度は前項で採取した血液を用いて, 自動血液生化学分析装置(富士ドライケム3000; 富士写真フイルム株式会社)により測定した。また, 血漿遊離脂肪酸濃度はNEFA-Cテストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて, また, 血漿中アディポネクチン濃度(大塚製薬株式会社)及び血漿中インスリン濃度(森永乳業株式会社)はELISA法によりそれぞれ測定した。また, 実験終了後開腹し, 精巣周囲脂肪組織, 腸間膜脂肪組織を摘出し, 重量をそれぞれ測定した。

8. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で表し、有意差の検定には多重比較検定 (Bonferroni's test) もしくはstudent's *t*-testを用い、有意水準は5%とした。

結 果

1. 赤むすび米ぬか抽出液の脂肪滴蓄積抑制作用 (Fig. 1)

3T3-L1脂肪前駆細胞をコンフルエントになるまで培養した後、分化誘導剤を添加して脂肪細胞に分化させ、検体を含む培地で10日間培養を行い、脂肪滴の蓄積抑制作用を評価した (Fig. 1A)。その結果、赤むすび米ぬか抽出液 (100 μg/ml) を添加することによって、脂肪滴の蓄積が対照群やコシヒカリ由来米ぬか抽出液に比べて抑制されている様子が観察された (Fig. 1B)。また、オイルレッド染色により染色された脂肪滴を抽出し、吸光度を測定した結果、タンニン酸 (5-20 μg/ml) および赤むすび (100-300 μg/ml) 投与によって、濃度依存的に吸光度の低下が認められており、脂肪滴の蓄積抑制作用が確認された。また、赤むすび米ぬか (抽出液) の蓄積抑制作用は、既存の赤米品種である紅衣及び紅更紗の米ぬか抽出液と同程度であることも確認された。一方、コシヒカリ米ぬか抽出液 (30-300 μg/ml) では、蓄積抑制作用は認められなかった (Fig. 1C)。

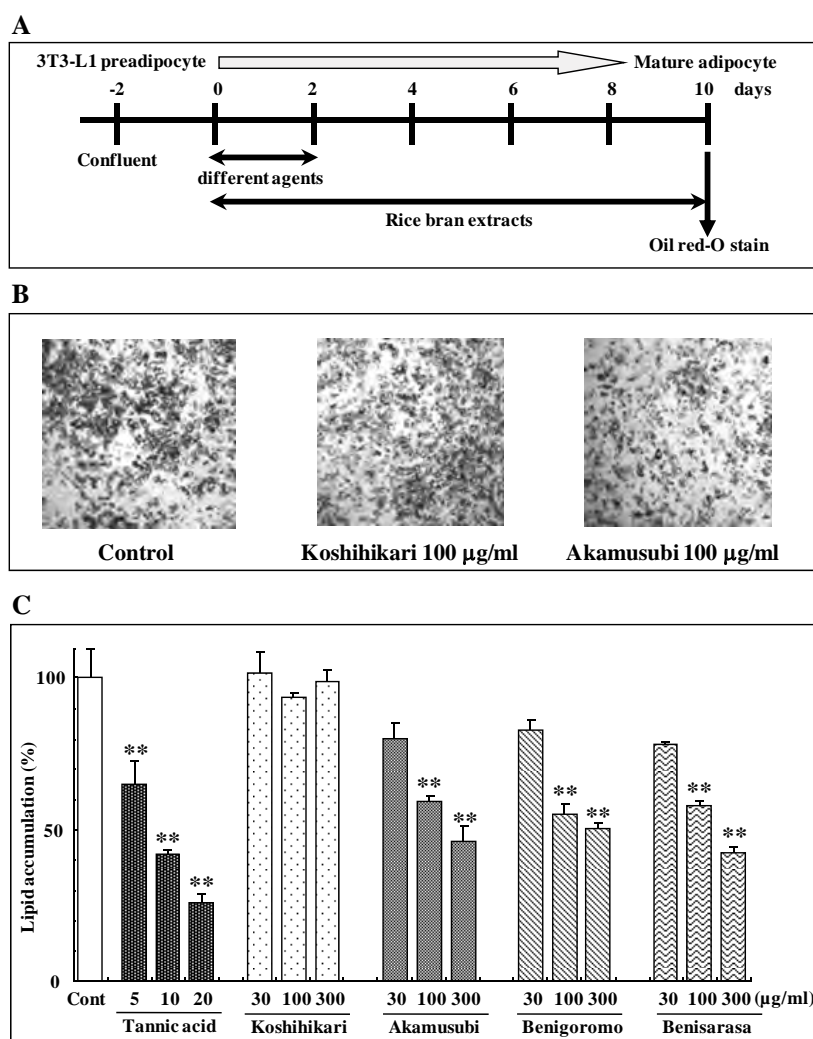


Fig. 1 Inhibitory effect of Akamusubi on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells

(A, B) To observe the effect of rice bran extracts (30-300 μg/ml) on 3T3-L1 adipocyte differentiation, the triglyceride content of adipocyte at day 10 was examined with Oil Red-O and photographed at magnification ×40.

(C) After staining, Oil Red-O was extracted from differentiated cells using isopropanol and quantified at 550 nm.

Values are means ± S.D. from 4 in each group. ** Significantly different from control group at *p* < 0.01 (Bonferroni's test).

Cont: control group (0.1% DMSO), Tannic acid 5-20 μg/ml, Koshihikari, Akamusubi, Benigoromo and Benisarasa 30-300 μg/ml. DMSO was present at same concentration of 0.1% in each well.

2. 2型糖尿病モデルマウスの体重に対する影響 (Fig. 2,3)

赤むすび等3種の米ぬか投与開始時から、10週目までのマウス体重の推移をFig. 2に示した。各種米ぬかの投与によって有意な体重の増減は認められなかった。また、Fig. 3に投与期間中の摂餌量と飲水量の推移を示した。コントロール群において摂餌量が他の群に比べて増加する傾向が認められたものの、他の群では有意な差は認められなかった。飲水量においては、コントロール群が他の群と比較して顕著に増加していた。また、コシヒカリ米ぬか投与群では赤むすび米ぬか及びカサラス米ぬか投与群と比較して、飲水量が増加する傾向が認められた。

3. 2型糖尿病モデルマウスの血液成分値に対する影響 (Fig. 4, 5)

赤むすび等3種の米ぬか投与期間中の血液成分値をFig. 4に示した。血漿中トリグリセライド量とグルコース量において、赤むすび米ぬか及びカサラス米ぬか投与群がコントロール群と比較して顕著な増加抑制作用が認められた。特に血漿中グルコース量では、赤むすび米ぬか投与群において、コシヒカリ米ぬか投与群と比較して有意な増加抑制作用が認められた (10週目)。一方、血漿中総コレステロール量、遊離脂肪酸量においては、差は認められなかった。

また、投与10週目の血漿中アディポネクチン含量とイ

ンスリン含量の値をFig. 5に示した。アディポネクチン含量では、赤むすび米ぬか投与群においてのみ有意な増加作用が認められ、インスリン含量では赤むすび米ぬか及びカサラス米ぬか投与群において有意な増加作用が認められた。特にカサラス米ぬか投与群では、コシヒカリ投与群と比較しても有意な増加作用が認められていた。

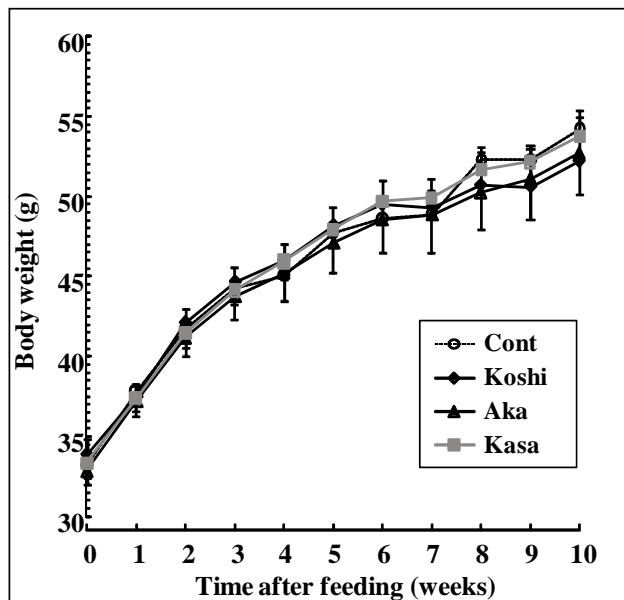
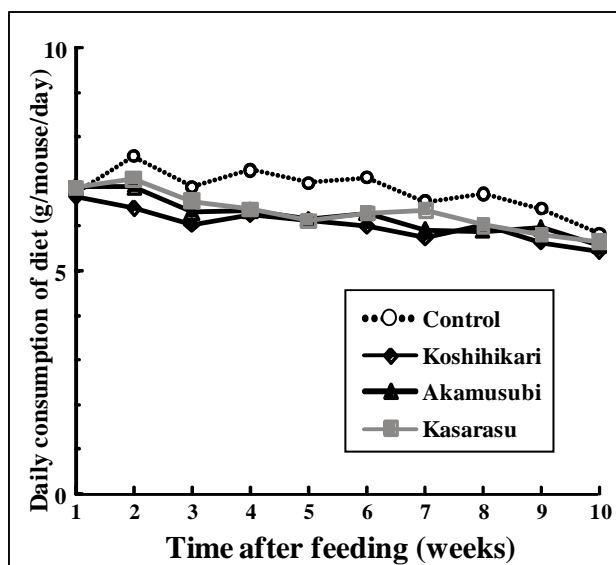


Fig. 2 Effects of feeding of rice bran on body weight in db/db mice

Each value represents the mean±S.E. (n = 5-6).

Cont(○); test diet 10%, Koshi(◆); Koshihikari rice bran 10%, Aka(▲); Akamusubi rice bran 10%, Kasa(■); Kasalath rice bran 10%

A



B

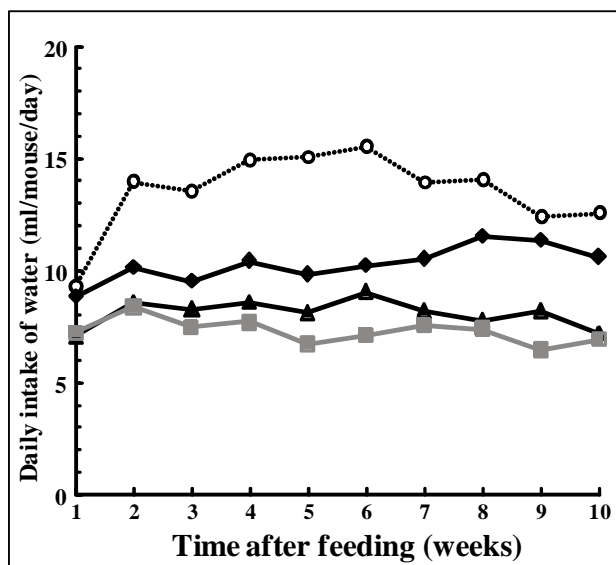


Fig. 3 Effects of rice bran on feed-consumption (A) and water-consumption (B) in db/db mice

Each value represents the mean±S.E. (n = 5-6).

Cont(○); test diet 10%, Koshi(◆); Koshihikari rice bran 10%, Aka(▲); Akamusubi rice bran 10%, Kasa(■); Kasalath rice bran 10%

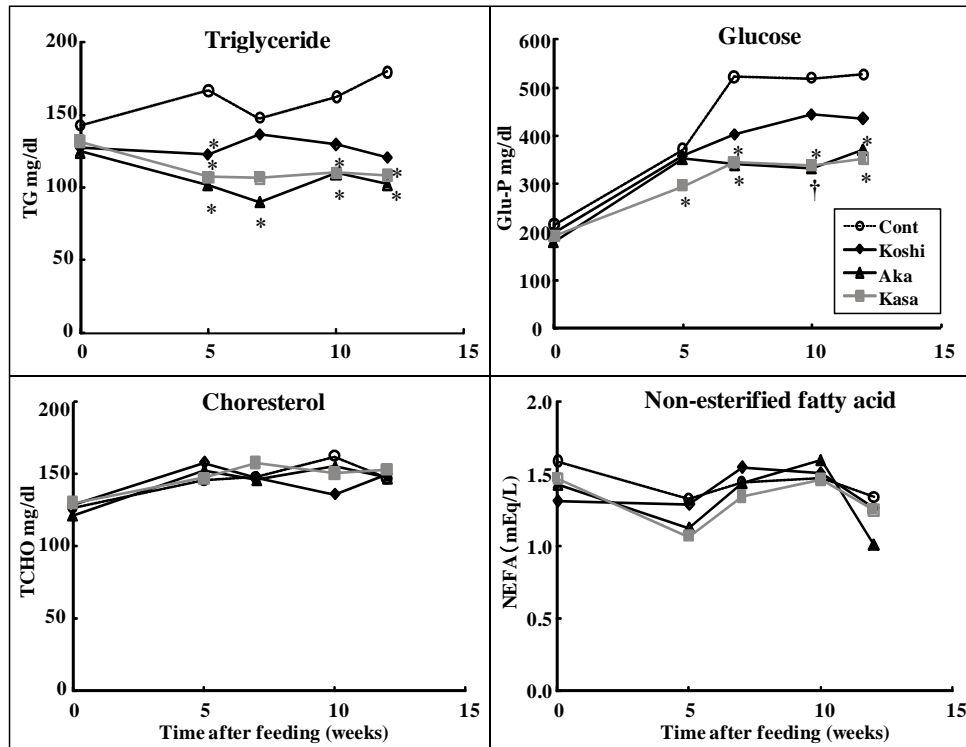


Fig. 4 Effects of feeding of rice bran on plasma components in db/db mice

Each value represents the mean±S.E. (n = 5-6) .

Cont(○); test diet 10%, Koshi(◆); Koshihikari rice bran 10%, Aka(▲); Akamusubi rice bran 10%, Kasa(■); Kasalath rice bran 10%

* Significantly different from control group at $p < 0.05$ (Student's t -test).

† Significantly different from Koshihikari group at $p < 0.05$ (Student's t -test).

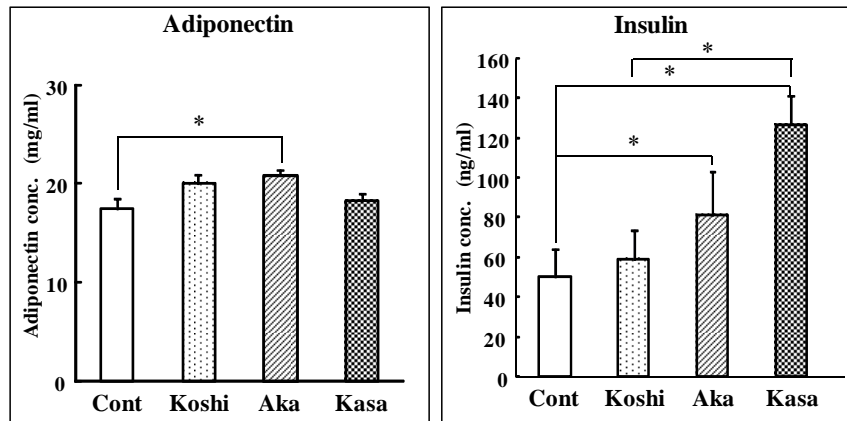


Fig. 5 Effects of feeding of rice bran on adiponectin and insulin concentration in db/db mice

Each value represents the mean±S.E. (n = 5-6) .

Cont; test diet 10%, Koshi; Koshihikari rice bran 10%, Aka; Akamusubi rice bran 10%, Kasa; Kasalath rice bran 10%

* Significantly different from control or Koshihikari group at $p < 0.05$ (student's t -test).

4. 2型糖尿病モデルマウスの内臓脂肪に対する影響 (Fig. 6)

赤むすび等3種の米ぬか投与13週間後に精巣周囲脂肪組織を摘出し、重量を測定した結果をFig. 6に示す。赤むすび米ぬか及びカサラス米ぬか投与群において有意な蓄積

抑制作用が認められた。特に赤むすび米ぬか投与群ではコシヒカリ米ぬか投与群と比較しても有意な蓄積抑制作用が認められた。一方、腸間膜脂肪組織量については有意な差は認められなかった (Data not shown)。

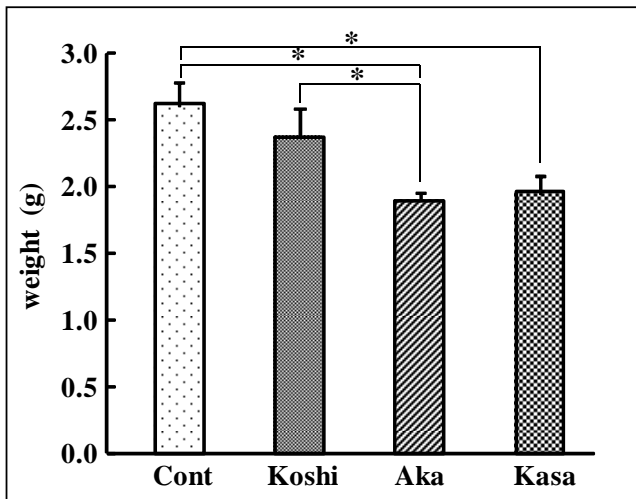


Fig. 6 Effects of feeding of rice bran on epididymal adipose tissue in db/db mice

Each value represents the mean±S.E. (n = 5-6).

Rice bran was administrated from 7 weeks-old for 12 weeks.

Cont; test diet 10%, Koshi; Koshihikari rice bran 10%, Aka; Akamushi rice bran 10%, Kasa; Kasalath rice bran 10%

* Significantly different from control group at $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

考 察

近年、脂肪細胞の肥大化によるアディポカインの代謝異常がメタボリックシンドロームの発症に関連していることが報告されており、脂肪細胞の肥大化を抑制する薬剤がメタボリックシンドローム治療のターゲットとして注目されている。このため、メタボリックシンドロームに有効な天然物の機能性評価を行うにあたっては、脂肪細胞への分化率やアディポカイン分泌量を指標としたスクリーニングが数多く行われている。今回、我々は抗酸化作用⁴⁾や抗動脈硬化作用⁵⁾等の機能性を有することが報告されている赤米に着目し、脂肪滴蓄積抑制作用を指標として農業研究所にて開発された赤むすび米ぬかの機能性を評価した。

その結果、脂肪細胞を用いた実験において、赤むすび米ぬか抽出液は濃度依存的に脂肪滴の蓄積を抑制し、その作用の強さは、既存の赤米品種（紅衣、紅更紗）と同程度であることが確認された。一方、コシヒカリ由来米ぬか抽出物に抑制作用は認められなかった。これらの結果より、色素成分含量が高い赤むすび米ぬかには既存の赤米品種と同様、機能性を有することが示唆されたため、動物実験による評価を実施した。

2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスを用いて、赤むすび等3種の米ぬかの摂食試験を行った結果、10週間の投与で体重増加に影響は認められなかったものの、飲水量では赤むすび米ぬか及びカサラス米ぬか投与群ではコ

ントロール群及びコシヒカリ米ぬか投与群と比較して低下する傾向が認められた。2型糖尿病モデルマウスでは、病態が伸展すると多飲・多尿になる特徴を持つことから、赤むすび米ぬか及びカサラス米ぬか投与群では糖尿病の進行が抑えられている可能性が示唆された。実際、血液成分値の推移結果によると、赤むすび米ぬか及びカサラス米ぬか投与群のトリグリセライド含量と血糖値の上昇が抑制され、内臓脂肪の蓄積も抑制されていた。この結果より、赤米米ぬかの糖尿病に対する病態改善作用が期待される。また、赤むすび米ぬか投与群の血糖上昇抑制作用、内臓脂肪蓄積抑制作用はカサラス米ぬか投与群とほぼ同程度であり、カサラスの持つ機能性を交配子孫である赤むすびも有していることを確認した。

また、血漿中アディポネクチン及びインスリン含量を測定した結果、赤むすび米ぬか投与群はコントロール群と比較していずれも有意に増加していることが明らかとなった。2型糖尿病モデルマウスではインスリン抵抗性を有するため、血糖降下作用を持つインスリン含量が高いにも関わらず、高血糖の病態が続くことが知られている。今回の結果から、赤米米ぬかの摂食により、インスリン抵抗性の改善作用は認められないものの、脂肪細胞からのアディポネクチン分泌と膵臓からのインスリン分泌を促進する可能性が示唆された。

以上の結果より、本研究において赤むすび米ぬかの機能性を細胞レベル、動物レベルにおいて確認した。今後は、機能性成分の特定を行うとともに、脂肪滴蓄積抑制作用を指標に活性の高い品種を育成することで、‘くすりの富山’にふさわしい新品種を開発し、これを活用した食モデルの構築につなげたい。

引用文献

- 1) Nagao S, M Takahashi and T Miyamoto. Genetical studies on rice plant 21. Biochemical studies on red rice pigmentation. Jap. J. Genet., 32, 124-128 (1957).
- 2) Oki T, Masuda M, Kobayashi M, Nishiba Y, Furuta S, Suda I, Sato T.: Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice, J Agric Food Chem. 50 (26), 7524-7529 (2002).
- 3) Liu X, Kim JK, Li Y, Li J, Liu F, Chen X. Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. J Nutr. 135 (2), 165-171 (2005).
- 4) Finocchiaro F., Ferrari B., Gianinetti A., Dall'asta C., Galaverna G, Scazzina F, Pellegrini N. Characterization of antioxidant compounds of red and white rice

and changes in total antioxidant capacity during processing. *Mol. Nutr. Food Res.* **51** (8), 1006–1019 (2007).

- 5) Ling W. H., Cheng Q. X., Ma J., Wang T. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. *J. Nutr.* **131** (5), 1421–1426 (2001)..

謝 辞

本研究は、平成21-22年度フロンティア研究推進事業（脂肪蓄積抑制作用に優れた米の開発と機能性評価；代表者：村田和優 農林水産総合技術センター 農業研究所）の一環として実施された。

医薬品成分及び指定薬物の迅速検出法の開発について（第1報）

横田 洋一, 高橋 敏, 寺崎 さち子, 田村 隆幸

On the development of rapid detection method of medicines and designated drugs

Yoichi YOKOTA, Satoshi TAKAHASHI, Sachiko TERASAKI and Takayuki TAMURA

要 約

インターネットサイトでは、健康食品、海外製医薬品、指定薬物など健康に影響を与える種々の製品が流通している。そこで、液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器 (LC/PDA) 及び液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) を用いて、これらの製品中の79成分の迅速な検出法を検討した。LC/PDAでは、検出波長に205nm、移動相に0.1%ギ酸溶液と0.1%ギ酸アセトニトリルのグラジエントを用いることで、25分以内で15の指定薬物を含む78成分についてピークの検出が可能であった。さらにLC/MSにおいて、同一のLC条件で、ESIのポジティブ及びネガティブモードでマススペクトル測定を行ったところ、73成分について、疑分子イオンピークを得ることができた。これらのことから、本法は、未知成分の検出確認にかなり役立つものと考えられた。

Summary

Various products such as dietary supplements, the medicines made in foreign countries, and the illegal drugs that may cause the health hazard are sold on Internet sites. Then, a rapid detection method of the 79 substances in these products was investigated by LC /PDA and LC/MS. As a result, 78 substances including 15 designated drugs were detected within 25 minutes by LC/PDA whose detection wavelength was 205nm, when 0.1% formic acid solution and acetonitrile that contains 0.1% formic acid were used as a solvent of the gradient elution. In addition, by using same LC conditions, pseudo molecular ion peaks of 73 substances were obtained by LC/MS with ESI source in positive or negative ionization mode. So, it was thought that present method was considerably useful for detection and identification of unknown substances.

キーワード： 指定薬物, 液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器, 液体クロマトグラフ/質量分析計

Keywords : designated drugs, liquid chromatography / photodiode array detector, liquid chromatography / mass spectrography

現在、インターネット上では、健康食品、指定薬物を含む違法ドラッグや医薬品等、保健衛生上問題となりうる様々な製品が流通している。いわゆる健康食品に含有される痩身効果や強壮効果を示す医薬品成分については、成分分析例がこれまでに種々報告されており^{1,2)}、特にED治療薬に類するものは、市販製剤成分のシルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル以外にその類縁物質の分析報告が毎年増え続けているのが現状である³⁾。また、中枢神経系に作用を有する可能性が高く、人の身体に使用された場合に幻覚異常行動などの保健衛生上の危害が発生するおそれがある物として、平成19年4月1日よりトリプタミン系化合物、フェネチルアミン系化合物、ピペラジン系化合物、植物由来製品、合成カンナビノイドなどが指定薬物として指定されたが、これらが含有されるとされる製品が発見された場合には、都道府県知事の指定する機関の検査を受けるよう命ずることができるとされている。厚生労働省ではこれまで買い上げ調査を実施するとともに、無承認無許

可医薬品や指定薬物の分析方法を通知し、研修会において試験法の周知に努めているが⁴⁾、指定薬物の数では、毎年のように増大しており、現在は60種あまりとなっている⁵⁾。又、種々の海外製医薬品がインターネット上で個人輸入を通じて容易に入手できる状況にあるが、その品質については明らかでなく、模造医薬品による危険性も指摘されている⁶⁾。このように医薬品成分や指定薬物の類縁物質が新たに出現し、さらには多くの海外製医薬品が流通する現状では、既知の目的成分に特化した個別の試験法では対応が困難となってきている。そこで、当所で、利用できる分析機器を使用し、痩身・強壮効果などを標榜する無承認無許可医薬品や指定薬物に加え、その他海外医薬品成分も含めた簡易で網羅的な迅速検出方法を開発することを目的とし、今回の基礎的検討を行った。

実験材料及び方法

1. 検体

いわゆる健康食品中の医薬品成分、指定薬物29成分 (Table 1) 及びあるインターネットサイトに載った海外製医薬品成分50成分 (Table 2) について検討を行った。なお、4MPP, 5-MeO-AMT, MIPT, 5-MeO-DET, 5-MeO-MIPT, 2C-C, 5-MeO-DALT, DPT, 2C-E, 5-MeO-DPT, サルビノリンA, バルデナフィル, ホンデナフィル, クエン酸シルデナフィル及びタダラフィルは国立医薬品食品衛生研究所生薬部より供与されたもの、脱N-ジメチル

シブトラミンは「貴宝美健」より抽出¹⁾したものを、これら以外は市販品を用いた。検体の「糖滋源」, 「貴宝美健」, 中国製ダイエット食品「天天素」は当所所有のものを用いた。

2. 分析条件及び試薬

(1) 液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器 (LC/PDA)

LCはWaters2695, PDA検出器はWaters2996, PDA測定波長は200~400nm, 検出波長は205nmとした。カラムはAgilent製ZORBAX Eclipse XDB-C18及び

Table 1 いわゆる健康食中の医薬品成分及び指定薬物

効 果	成 分	種 類	略 名	分 類
瘦 身	マジンドール	指定薬物	MIPT	トリプタミン系
	フェンフルラミン		DPT	トリプタミン系
	N-ニトロソフェンフルラミン		5-MeO-MIPT	トリプタミン系
	シブトラミン		5-MeO-DALT	トリプタミン系
	脱N-ジメチルシブトラミン		5-MeO-DET	トリプタミン系
	フェノールフタレイン		5-MeO-AMT	トリプタミン系
	チロキシシン		5-MeO-DPT	トリプタミン系
	3,3',5'-トリヨードチロニン		5-MeO-DMT	トリプタミン系
強 壯	シルデナフィルクエン酸塩		4FMP	フェネチルアミン系
	タダラフィル		2C-E	フェネチルアミン系
	バルデナフィル		2C-C	フェネチルアミン系
	ホンデナフィル		MBZP	ピペラジン系
	ヨヒンビン		MDBP	ピペラジン系
血糖降下	グリベンクラミド		4MPP	ピペラジン系
			サルビノリンA	植物由来

Table 2 インターネットサイトに載った海外製医薬品成分

分 類	成 分	分 類	成 分	
ステロイドホルモン	ベタメサゾン	解 熱 鎮 痛	アセトアミノフェン	
	デキサメタゾン		スルピリン水和物	
	デソキシメタゾン		カフェイン	
抗ヒスタミン	ベタメタゾン吉草酸エステル		アスピリン	
	カルビノキサミンマレイン酸塩		ジクロフェナクナトリウム	
	クロルフェニラミンマレイン酸塩		メフェナム酸	
女性ホルモン	ジフェンヒドラミン		抗 炎 症	ニメスリド
	ペントキシベリクエン酸塩		鎮 咳 去 痰	グアイフェネシン
	エチニルエストラジオール		気 管 支 拡 張	サルブタモール硫酸塩
	ノルエチステロン		血 管 収 縮	オキシメタゾリン塩酸塩
	ゲストデン	消 化 性 潰 瘍	フェレリフリン塩酸塩	
	ドロスピレノン		ラニチジン塩酸塩	
抗 真 菌	ノルゲストレル	止 瀉 , 整 腸	パントプラゾール	
	酢酸シプロテロン		ロペラミド	
	クロルマジノン酢酸エステル		鎮 け い	ブチルスコボラミン臭化物
	フルコナゾール		降 圧	カプトプリル
	ケトコナゾール		利 尿 , 降 圧	クロルタリドン
	チオコナゾール		血 糖 降 下	クロルプロパミド
抗 生 物 質	ニコナゾール		局 所 麻 酔	リドカイン
	トルナフタート		駆 虫	アルベンダゾール
	アモキシシリン水和物		甲 状 腺 ホ ル モ ン	レボチロキシナトリウム
	トリメトプリム		男 性 ホ ル モ ン 抑 制	フィナスチド
	テトラサイクリン塩酸塩	外 用 抗 菌	クリオキノール	
	アンピシリン	歯 科 用 鎮 痛	グアヤコール	
	スルファメトキサゾール			
	クロラムフェニコール			

Eclipse PlusC18 (2.1×100mm, 粒径3.5μm), カラム温度は40°C, 移動相は以下の直線グラジエントを用いた. A液: 0.1 v/v %ギ酸溶液, B液: 0.1 v/v %ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件: 0-2min (A/B: 95/5), 2-27min (A/B: 95/5-5/95), 27-30min (A/B: 5/95-95/5), 流速は0.2mL/minとした.

(2) 液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS)

LCはWaters 2695, MS検出器はQuattromicro API, カラムはEclipse XDB-C18を用いた. カラム温度, 移動相及び流速は (1) と同じ. MS条件は測定範囲 (m/Z): 100~1000, イオン化法:ESI (+) (positive) 及びESI (-) (negative), キャピラリー電圧: 3.5kV (positive) 及び2.5kV (negative), コーン電圧: 20V, ソース温度: 120°C, 脱溶媒温度: 350°C. なお, UV検出器 (Waters2487) にて205nmの吸収も測定した.

(3) 試薬

アセトニトリル: LC/MS用, ギ酸: 試薬特級及びLC/MS用 (和光純薬)

3. 試験法

医薬品成分及び指定薬物は, LC/PDA用にメタノールで

100μg/mLに溶解し, 注入量は1μL, LC/MS用にはメタノールで5μg/mLに溶解し, 注入量は2μLとした. 分析時間は25分とし, LC/PDAで各成分のピークの溶出時間及び吸収曲線を測定し, さらに同一のLC条件でピークのマススペクトルを測定した. 「天天素」については, 0.1gにメタノール2mLを加え10分間超音波抽出し, 遠心分離した後, メタノールで5倍希釈後メンブランフィルターでろ過し, 試料溶液とした.

4. 結果

Table3にいわゆる健康食品の医薬品成分及び指定薬物のEclipse PlusC18カラムによるLC/PDA (検出波長205nm) の保持時間, 紫外吸収スペクトルの極大波長及びLC/MSによるマススペクトル測定の結果を示す. また, Table4にあるインターネットサイトに載った海外製医薬品成分の結果を示す. 以上の結果よりLC/PDAでは, 25分以内で79成分中78成分のピーク検出が可能であり, LC/MSでは, 73成分について, 疑似分子イオンピークを得ることできた.

Fig.1にシルデナフィルの分析例及びFig.2に製剤の分析例として「天天素」にカラムEclipse XDB-C18を使用したクロマトグラム及び検出成分の紫外吸収スペクトルを示す.

Table 3 いわゆる健康食品の医薬品成分及び指定薬物のLC/PDA及びLC/MSデータ

分類	成分	RT(min)	UVmax(nm)	分子式	分子量 [#]	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	判定
痩身	マジンドール	13.0	269	C ₁₆ H ₁₃ CIN ₂ O	284.1	285.3	-	○
	フェンフルラミン	13.5	206, 263	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	231.1	232.4	-	○
	3,3',5-トリヨードチロニン(T3)	15.6	264, 298	C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄	650.8	651.7	649.6	○
	脱N-ジメチルシブトラミン	15.7	222, 267	C ₁₅ H ₂₂ CIN	251.1	251.9	-	○
	チロキシミン(T4)	16.7	224, 301	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄	776.7	777.7	775.8	○
	シブトラミン	16.8	223, 267	C ₁₇ H ₂₆ CIN	279.2	280.4	-	○
	フェノールフタレイン	17.0	230, 276	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318.1	318.9	316.8	○
強壯	N-ニトロソフェンフルラミン	22.4	233	C ₁₂ H ₁₅ F ₃ N ₂ O	260.1	260.9	-	○
	ヨヒンビン	12.2	221, 273	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.2	355.5	-	○
	バルデナフィル	13.5	213	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	488.6	-	486.9	○
	ホンデナフィル	14.0	235, 281	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	466.6	467.1	465.0	○
	シルデナフィルクエン酸塩	14.7	224, 294	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S • C ₆ H ₈ O ₇	474.2	475.0	473.0	○
血糖降下	タダラフィル	17.8	221, 285	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	389.4	389.9	387.8	○
指定薬物	グリベンクラミド	21.9	229, 301	C ₂₃ H ₂₈ CIN ₃ O ₅ S	493.1	494.3	492.3	○
	MDBP	2.2	240, 285	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂	220.1	221.0	-	○
	MBZP	2.7	262	C ₁₂ H ₁₈ N ₂	190.1	191.0	-	○
	4MPP	5.5*	236,288	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O	192.1	193.0	-	○
	4FMP	7.8*	264	C ₉ H ₁₂ FN	153.1	154.0	-	○
	5-MeO-DMT	9.0	221, 275	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	218.1	219.0	-	○
	5-MeO-AMT	9.9	222, 275	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	204.1	205.0	-	○
	MIPT	11.1	220, 280	C ₁₄ H ₂₀ ON ₂	216.2	217.0	-	○
	5-MeO-DET	11.2	221, 276	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	246.2	247.0	-	○
	5-MeO-MIPT	11.2	221, 275	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	246.2	247.0	-	○
	2C-C	11.7	294	C ₁₀ H ₁₄ CINO ₂	215.1	216.0	-	○
	5-MeO-DALT	12.6	221, 276	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O	270.2	271.0	-	○
	DPT	12.6	221, 280	C ₁₆ H ₂₄ N ₂	244.2	245.0	-	○
	2C-E	13.3	224, 289	C ₁₂ H ₁₉ NO ₂	209.1	210.0	-	○
	5-MeO-DPT	13.4	221, 276	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O	274.2	275.1	-	○
	サルビノリンA	20.6	-	C ₂₃ H ₂₈ O ₈	416.2	-	-	△

#: モノアイソトピック質量, *: ピーク形状悪い, -: 疑似分子イオンピーク無し, ○: 疑似分子イオンピークを確認, △: 疑似分子イオンピークを確認しないが, マススペクトルで確認可能

Table 4 海外製医薬品成分のLC/PDA及びLC/MSデータ

分類	成分	RT(min)	UVmax(nm)	分子式	MS	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	判定
ステロイドホルモン	ベタメサゾン	16.3	240	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392.2	393.3	391.4	○
	デキサメタゾン	16.5	240	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392.2	393.4	391.3	○
	デソキシメタゾン	18.2	240	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄	376.2	377.4	-	○
	ベタメタゾン吉草酸エステル	21.7	239	C ₂₇ H ₃₇ FO ₆	476.3	477.5	475.3	○
抗ヒスタミン	カルビノキサミンマレイン酸塩	12.5	223, 262	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂ O・C ₄ H ₄ O ₄	290.1	291.3	-	○
	クロルフェニラミンマレイン酸塩	12.8	223, 263	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂ ・C ₄ H ₄ O ₄	274.1	275.3	-	○
	ジフェンヒドラミン	14.4	258	C ₁₇ H ₂₁ NO	255.2	256.3	-	○
	ペントキシベリンクエン酸塩	16.2	258	C ₂₀ H ₃₁ NO ₃ ・C ₆ H ₈ O ₇	333.2	334.5	-	○
女性ホルモン	エチニルエストラジオール	19.4	280	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.2	-	-	△
	ノルエチステロン	19.4	243	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	298.2	299.5	-	○
	ゲストデン	20.0	242	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310.2	311.5	-	○
	ドロスピレノン	20.5	268	C ₂₄ H ₃₀ O ₃	366.2	367.5	-	○
	ノルゲストレル	20.8	243	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312.2	313.5	-	○
	酢酸シプロテロン	22.9	282	C ₂₄ H ₂₉ ClO ₄	416.2	417.4	-	○
	クロルマジノン酢酸エステル	23.4	285	C ₂₃ H ₂₉ ClO ₄	404.2	405.4	-	○
抗真菌	フルコナゾール	11.8	261	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	306.1	307.3	305.3	○
	ケトコナゾール	15.8	-	C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₄	530.1	531.4	-	○
	チオコナゾール	17.8	-	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₃ N ₂ OS	386.0	387.2	-	○
	ミコナゾール	19.6	264	C ₁₈ H ₁₄ Cl ₄ N ₂ O	414.0	415.2	-	○
	トルナフタート	26.9	223, 257	C ₁₉ H ₁₇ NOS	307.1	308.4	-	○
抗生物質	アモキシシリン水和物	2.9	230, 272	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ ・3H ₂ O	365.1	365.9	364.3	○
	トリメトプリム	9.4	270	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290.1	291.3	-	○
	テトラサイクリン塩酸塩	10.6	270, 358	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ ・HCl	444.2	445.3	443.2	○
	アンピシリン	11.1	257	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	349.1	349.2	-	○
	スルファメトキサゾール	12.7	269	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.1	253.8	251.7	○
	クロラムフェニコール	13.9	278	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	322.0	-	321.1	○
解熱鎮痛	アセトアミノフェン	3.5	243	C ₈ H ₉ NO ₂	151.1	152.3	150.3	○
	スルピリン水和物	3.9	258.2	C ₁₃ H ₁₆ N ₃ NaO ₄ ・S・H ₂ O	333.1	-	-	△
	カフェイン	8.6	272	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.1	195.3	-	○
	アスピリン	12.7	228, 276	C ₉ H ₈ O ₄	180.0	-	-	△
	ジクロフェナクナトリウム	21.5	276	C ₁₄ H ₁₀ C ₁₂ NNaO ₂	295.0	296.2	294.1	○
	メフェナム酸	23.5	220, 280, 352	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	241.1	242.3	240.2	○
抗炎症	ニメスリド	1.8	300.9	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	308.0	309.2	307.2	○
鎮咳去痰	グアイフェネシン	11.5	224, 274	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	198.1	199.3	-	○
気管支拡張	サルブタモール硫酸塩	2.8	222, 276	(C ₁₃ H ₂₁ NO ₃) ₂ ・H ₂ SO ₄	239.2	240.4	238.3	○
血管収縮	オキシメタゾリン塩酸塩	14.1	281	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O・HCl	260.2	261.4	259.3	○
	フェニレフリン塩酸塩	-	-	C ₉ H ₁₃ NO ₂ ・HCl	167.1	-	-	×
消化性潰瘍	ラニジン塩酸塩	3.2	228, 314	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₃ ・HCl	314.1	315.4	313.3	○
	パントプラゾール	14.3	288	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₄ S	383.1	384.2	382.3	○
止瀉, 整腸	ロペラミド	17.8	258	C ₂₉ H ₃₃ ClN ₂ O ₂ ・HCl	476.2	477.5	-	○
鎮けい	ブチルスコポラミン臭化物	13.0	-	C ₂₁ H ₃₀ BrNO ₄	359.2	360.4	-	○
降圧	カプトプリル	11.2	-	C ₉ H ₁₅ NO ₃ S	217.1	218.3	216.2	○
利尿, 降圧	クロルタリドン	12.9	-	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ O ₄ S	338.0	-	337.2	○
血糖降下	クロルプロパミド	17.2	232	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	276.0	277.3	275.2	○
局所麻酔	リドカイン	9.9	263	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	234.2	235.4	-	○
駆虫	アルベンダゾール	15.7	228, 299	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	265.1	266.3	264.1	○
甲状腺ホルモン	レボチロキシシンナトリウム	16.9	224, 301	C ₁₅ H ₁₀ I ₄ NNaO ₄ ・xH ₂ O	776.7	777.8	776.0	○
男性ホルモン抑制	フィナステリド	19.8	203	C ₂₃ H ₃₆ N ₂ O ₂	372.3	373.5	-	○
外用抗菌	クリオキノール	23.9	254, 318	C ₉ H ₅ ClINO	304.9	306.0	-	○
歯科用鎮痛	グアヤコール	12.8	218, 275	C ₇ H ₈ O ₂	124.1	-	-	×

: モノアイソトピック質量, - : 疑似分子イオンピーク無し, ○ : 疑似分子イオンピークを確認, △ : 疑似分子イオンピークを確認しないが, マススペクトルで確認可能

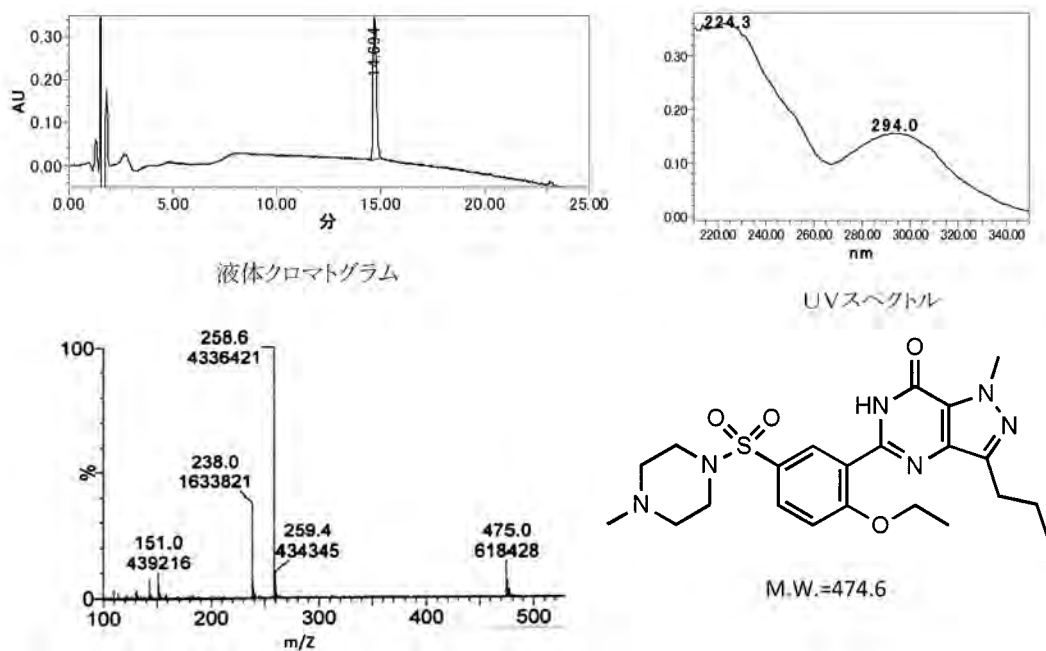


Fig.1 シルденаフィルの LC/PDA 及び LC/MS による分析

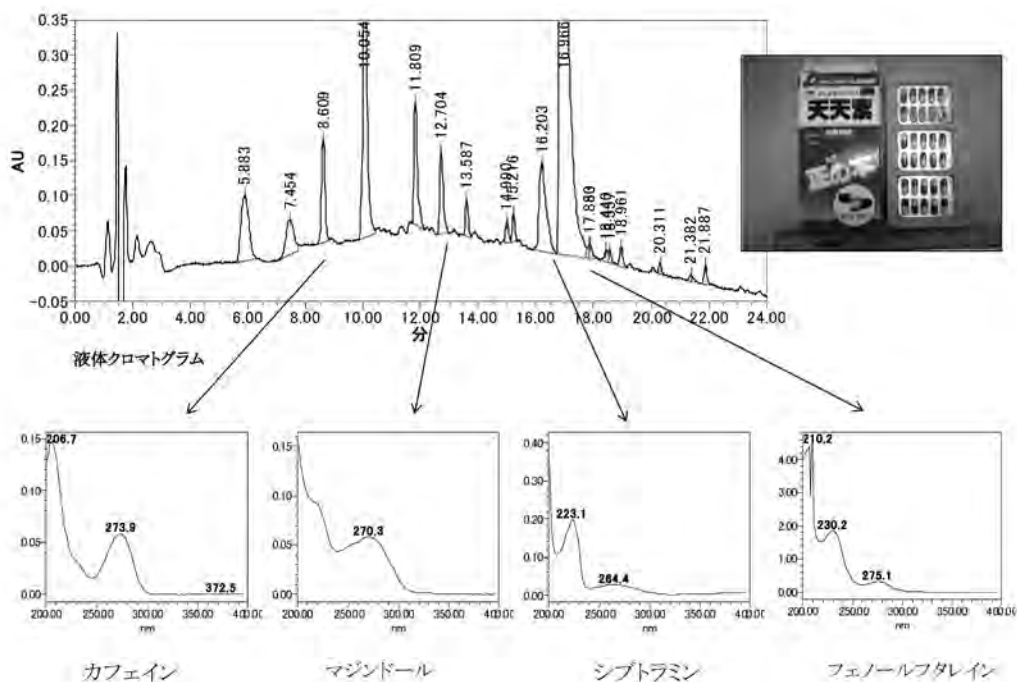


Fig. 2 天天素の LC/PDA による分析例

5. 考察

今回、LC/PDA及びLC/MSによる医薬品成分等の迅速検出システムを構築することを目的に、分析条件を作成し、種々の成分に応用しその有用性を検証した。本システムで成分が検出されれば、その紫外吸収スペクトル及びマススペクトルはその物質を推定する手掛かりになると考えられ

るが、未知物質であれば更なる検討が必要となる。

今回、LC条件として、紫外吸収スペクトルを得るため検出器にPDAを使用し、検出波長は検出能が高いと考えられる205nmとした。また短時間で極性及び非極性物質の同時分析を行え、さらにLC/MS分析も同時に可能とするため、カラムは内径2.1mm、長さ100mm、粒径3 μ m程度の

ODS充填剤，流速は毎分0.2mL，分析時間は30分以内とした。移動相は検出波長205nmでのグラジエント溶出のベースラインの安定性を図るため，0.1%ギ酸溶液及び0.1%ギ酸を含有するアセトニトリルを用いた。

Table1に「いわゆる健康食品」に含有される可能性のある医薬品成分14種（痩身効果8種，強壮効果5種及び血糖降下1種）及び指定薬物15種（トリプタミン系8種，フェネチルアミン系3種，ピペラジン系3種，植物系1種）を，Table3にEclipse PlusC18カラムによる保持時間，紫外吸収スペクトルの極大波長，LC/MSによるマススペクトル測定の結果を示す。すべての成分についてLC/PDAで検出可能であった。またLC/MSではサルビノリンAを除いては，疑似分子イオンピークを検出することができた。しかし，指定薬物の5-MeO-DETと5-MeO-MIPTは構造が類似しており，分子量も同じであるため，今回の条件では区別は困難であった。測定例としてFig.1にシルデナフィルを示す。なお，カラムにEclipse PlusC18及びEclipse XDB-C18を用いても保持時間に大きな違いは認められなかった。

我々はこれまで，平成14年に「茶素減肥」のフェンフルラミン及び甲状腺末，平成15年に「糖滋源」などのグリベンクラミド，「貴宝美健」などのシブトラミン及び脱N-ジメチルシブトラミン，平成17年には「天天素」のマジンドール，シブトラミン，フェノールフタレインなど，いわゆる健康食品中に含有された医薬品成分を分析してきた。そこでこれらの一部に本システムを応用した。

「天天素」をEclipse XDB-C18カラムで分析したところ，LC/PDAにおいて，カフェイン，マジンドール，シブトラミン，フェノールフタレインが同時に検出された。Fig.2に「天天素」のクロマトグラム及び各ピークのUVスペクトルを示す。また，「糖滋源」のグリベンクラミド，「貴宝美健」のシブトラミン及び脱N-ジメチルシブトラミンも検出可能であった。（データ示さず。）

次に，あるインターネットサイトに載った海外製医薬品の50成分（Table 2）についても，LC/PDAによる保持時間及びUVスペクトル測定を行ったところ，フェニレフリン以外は検出可能であった。また，LC/MSではグアヤコールを除いてマススペクトル測定が可能であり，45成分で疑似分子イオンピークを検出した（Table 4）。なお，ベタメタゾンとデキサメタゾンは立体異性体のため，保持時間が近似しており，またUVスペクトル及びマススペクトルも類似しているため，今回の条件では区別は困難であった。

以上の結果より，今回検討した指定薬物及び医薬品成分については大部分が検出できることが分かった。なお，検出不可能なものやピーク形状の不良なものもあることから，今後はLC条件について更なる検討を行い，また今回は検討しなかった他の痩身・強壮成分や医薬品成分等につ

いても今後検討する予定である。さらに，より迅速化を図るため，UPLCへの移管を進める予定である。

謝 辞

標品を供与された，国立医薬品食品衛生研究所生薬部に深謝いたします。

参考文献

- 1) ・横田洋一，津野敏紀，寺崎さち子，鈴木英世，いわゆる健康食品中の脱N-ジメチルシブトラミンの検出について，平成15年度富山県薬事研究所年報，**31**，33-37（2004）
- 2) ・伊達英代，豊田安基江，寺内正裕，杉村光永，松尾健，鶴池千恵子（広島県保健環境センター），ダイエットを目的とした健康食品中に含まれる医薬品成分の同時分析方法について，第42回全国衛生化学技術協議会年会要旨集，p.212-213（2005）
- ・守安貴子，袁輪佳子，岸本清子，重岡捨身，門井秀郎，安田一郎，ダイエット健康食品中に含有される医薬品の検索法と健康被害を起こした「天天素清脂胶囊」への適用，東京健安研年報，**56**，81-86（2005）
- ・三橋隆夫，祭原ゆかり，秋山由美，市橋啓子，インターネット販売の強壮用健康食品における医薬品成分の調査結果，兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要 第2号，67-71（2005）
- ・栗田浩幸，水野くみ子，黒見公一，上野千恵，藤原厚子，小和田和宏，山本政利，いわゆる健康食品中の医薬品成分のLC/MSによる迅速分析，静岡県環境衛生科学研究所報告，No.49，31-35（2006）
- ・西條雅明，石井俊靖，長谷川貴志，高橋市長，永田知子，「いわゆる健康食品」から検出された医薬品成分について（平成16年度から平成20年度），千葉県衛研年報 第57号，44-47（2008）
- ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 第0619001号，脱N-メチルシブトラミンの分析方法について，（平成19年6月19日）
- 3) ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 第1012006号，ホンデナフィルの分析方法について（平成16年10月12日）
- ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 第0825001号，アミノタダラフィルの分析方法について（平成17年8月25日）
- ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 第0825002号，シルデナフィル，バルデナフィル，

- タグラフィルの迅速分析方法について、(平成17年8月25日)
- ・梶村計志, 田上貴臣, 梶月由香, 沢辺善之, 山本丈雄, 岩上正蔵, 起橋雅浩, 高取 聡, 吉井公彦, 福居敏夫, ヒドロキシホモシルデナフィルが検出された健康食品について, 大阪府立公衛研所報第43号, 117-121 (2005)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0308001号, プソイドバルデナフィルの分析方法について, (平成18年3月8日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0706011号, キサントアントラフィルの分析方法について, (平成18年7月6日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0706011号, ホンデナフィル類の定性及び定量法について, (平成18年7月26日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0801001号, ノルネオシルデナフィルの分析方法について, (平成18年8月1日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0201056号, イミダゾサガトリアジノンの分析方法について, (平成19年2月1日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0323001号, クロロプレタグラフィルの分析方法について, (平成19年3月23日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第04266002号, カルボデナフィルの分析方法について, (平成19年4月26日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0822011号, ニトロデナフィルの分析方法について, (平成19年8月22日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0822010号, ウデナフィルの分析方法について, (平成19年8月22日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第1212004号, チオアイルデナフィルの分析方法について, (平成20年12月12日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0319004号, シクロペンチナフィル及びN-オクチルタグラフィルの分析方法について, (平成21年3月31日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知0301第8号, ヒドロキシチオホモシルデナフィルの分析方法について, (平成22年3月1日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知0816第2号, アセチルアシッドの分析方法について, (平成22年8月16日)
- 4) ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0521002号, 指定薬物の分析法について, (平成19年5月21日)
- ・花尻 (木倉) 瑠璃, 川村麻衣子, 内山奈穂子, 緒方潤, 鎌倉浩之, 最所和宏, 合田幸広, 指定薬物の分析Part I :GC-MS及LC-MS, YAKUGAKU ZASSHI, 128 (6), 971-979 (2008)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知第0218003号, 指定薬物の分析法について, (平成20年2月18日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課, 平成20年度指定薬物分析・鑑定に関する研修資料 (平成21年1月26日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課, 平成21年度指定薬物分析研修会議資料 (平成22年1月22日)
 - ・厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課, 平成22年度指定薬物分析研修会議資料 (平成23年2月25日)
- 5) ・ <http://www.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/yakubuturanyou/scheduled-drug/list.html>
- 6) ・ <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001dl4u.html>
- ・ <http://www.ed-info.net/caution/index.html>
 - ・ <http://www.ed-care-support.jp/fake/>

V 資 料

スギ花粉を用いたマウス花粉アレルギーモデルの検討

宮本（山口）朋美

Japanese cedar pollen-induced experimental pollen allergy in mice

Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO

要 約

日本特有のスギ花粉症の研究に活用するため、花粉症の症状のうち痒みに対する評価も可能なマウスのスギ花粉アレルギーモデルを確立することを目指し検討を行った。その結果、ICR系マウスにおいてスギ花粉粗抗原で感作し、スギ花粉の点眼で目の痒みに関連した行動（顔面への掻き動作）を有する花粉アレルギーモデルが得られた。このモデルは実験期間を3週間以内と大幅に短縮でき、痒みに関連した症状も観察できるスギ花粉アレルギーモデルとして発症機序の解明や治療法の研究に役立つかもしれない。

Summary

Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen is the most common allergen causing pollinosis in Japan. The aim of this study was to develop a murine model of experimental allergy to cedar pollen which caused the itch, one of common allergy symptoms. ICR mice were sensitized by intraperitoneal injection of Japanese cedar pollen antigen in the presence of alum as adjuvant. The itch associated response (facial scratching by the hind paw) was induced by the challenge with eye drops containing pollen. It is surprising that the experiment period was greatly shortened within three weeks. We present a novel murine model of Japanese cedar pollen-allergic disease. This model could be useful tool in the study of underlying mechanisms and in exploring the therapeutic approaches to pollinosis.

キーワード：花粉アレルギー，スギ，マウス，痒み

Keywords：Pollen allergy; Japanese cedar; Mice; Itch

花粉症についての公式全国統計はないが、全国推計受療患者数は約800万人、全国推計有病者数は約2,200万人とも言われている。厚生労働省HP（花粉症特集）によると、2001年に奥田氏が行なった住民台帳を基準にした疫学調査において有病率の全国平均は15.6%、地域別の有病率で北陸は17.4%だった¹⁾。2007年の東京都の報告²⁾では東京都の推定有病率は28.2%と3.5人に1人がスギ花粉症であり年々増加している。また、近年では花粉症発症年齢の低下も叫ばれている。厚生労働省研究班の調査³⁾によると山梨県で花粉症を含むアレルギー性鼻炎の患者に対し、民間療法（代替医療）の受療率を調査したところ、2000年19%、2007年28.5%と増加しており、2007年は全国でも20-30%だった。花粉症の症状で日常生活に支障をきたすと感じている患者は70-80%に及び、医薬品のみならず発症の抑制や症状の緩和に有用なサプリメント等に対する社会的ニーズは大きいと考えられる。一方、民間医療について患者自身の効果に対する評価は漢方やスチーム療法などでは40%以上の有効率が示されたが、大半は20-30%以下だった。

民間療法の科学的評価はほとんど行われておらず、漢方やサプリメント等の花粉症における科学的な有効性を明ら

かにするためには、花粉症の動物モデルが重要である。日本では花粉症を引き起こす植物は60種類以上報告されているが⁴⁾、花粉症全体の約70%はスギ花粉によるものと推察されている。スギの少ない欧米等ではスギによる花粉症は稀で、スギ花粉症は日本などアジアの一部に特有の花粉症である。このような状況から、アレルギーの動物モデルとしてスギ花粉を抗原とした報告は、モルモットのアレルギー性鼻炎モデル⁵⁾やマウスのアレルギー性結膜炎モデル⁶⁾など限られている。また、生化学的検討（IgE値など）は行われていても症状（くしゃみ、鼻水、鼻づまり、目の痒み）に対する検討はほとんどなされていない。そこで、本研究では富山県農林水産総合技術センター森林研究所より供与されたスギ花粉を活用して、花粉症の症状のうち痒みに対する評価も可能なマウスの花粉アレルギーモデルを確立することを目指し検討を行った。

実験方法

1. 実験動物

BALB/cマウス（5週齢，♀）又はICRマウス（6週齢，♀）は、三協ラボサービスより購入しおよそ1週間の予備飼育

の後、実験に供した。「実験動物の管理と使用に関するガイドライン」(社団法人日本実験動物学会)及び富山県薬事研究所動物実験指針にしたがって実験を行った。

2. スギ花粉抗原Cry j1の測定

富山県農林水産総合技術センター森林研究所より供与されたスギ花粉20検体についてスギ花粉抗原ELISA Kit「Cry j1」(生化学バイオビジネス)を用いて、スギ花粉抗原Cry j1量を測定した。花粉1 mg当たり0.125 M炭酸水素ナトリウム100 μ Lを加え4°Cで2時間振とう後、4°C、2,000 xgで10分遠心した上清を用い、Kitのプロトコールに従い測定した。

3. スギ花粉からの粗抗原の抽出

測定したスギ花粉抗原Cry j1の含有量が多く、花粉量も多い久慈15号と23号各0.5 gに0.125 M炭酸水素ナトリウム8.75 mLをそれぞれ加え、4°Cで3時間振とうした。室温で3,000 rpm、15分遠心し上清を1つにまとめ使用するまで-80°Cに保存した。

4. 抗原による感作及び反応惹起

スギ花粉あるいはスギ花粉抗原であるCry j1 (*Cryptomeria japonica* 1)を用いた既報^{5,6)}を参考に抗原投与量、投与回数、投与経路の検討を行った。BALB/cマウスを用いた実験では、腹腔内投与用の抗原はスギ花粉(那珂4号)40 mgを4 mLの生理食塩水に懸濁し、等量のImject® Alum (PIERCE Biotechnology)を少しずつ加え1時間以上攪拌したものをを用いた。Day 0, 5にマウス当たり0.2 mL(スギ花粉1 mg)を腹腔内投与した。スギ花粉(那珂4号)40 mgを人工涙液1 mLに懸濁し、day 10-14までの5日間、1日1回5 μ Lずつ左右に点眼あるいは5 μ Lを鼻中隔に点鼻した(5 μ L中に含まれるスギ花粉は0.2 mg)。ICR系マウスを用いたスギ花粉による感作は、BALB/c系マウスの実験に腹腔内に投与する抗原量を2倍にした群、腹腔内に投与する抗原量は同じで抗原点鼻の回数を1日2回行った群を加え、感作抗原量や点鼻回数の違いを検討した。スギ花粉は久慈15号を使用し、Day 0, 5にマウス当たり0.2 mL(スギ花粉1 mg又は2 mg)を腹腔内投与した。反応の誘発はday 10-14までの5日間、抗原を1 mg投与したマウスは1日1回又は2回、抗原を2 mg投与したマウスは1日1回、5 μ Lを鼻中隔に点鼻した(5 μ L中に含まれるスギ花粉は0.2 mg)。ICR系マウスを用いたスギ花粉粗抗原による感作は、スギ花粉粗抗原1 mL(約40 μ gのCry j1が含まれていると推定)をリン酸緩衝液で4倍希釈し、等量のImject® Alumを少しずつ加え30分以上攪拌し、非感作の対照群用に4 mLのリン酸緩衝液に等量のImject® Alumを少しずつ

加え30分以上攪拌した。これらはday 0, 5にマウス当たり0.2 mL腹腔内投与した。点鼻用抗原は久慈15号と23号を混ぜ、40 mg/mLになるように人工涙液で懸濁し、1日1回、5 μ Lを鼻中隔に点鼻した。

5. 行動の観察

無人環境下にマウスの行動をビデオカメラで記録し、ビデオの再生により、後肢による顔面や体幹に対する掻き動作及び前肢による顔面への擦り動作を測定した。

6. 免疫グロブリンの測定

マウスの尾部よりヘパリン処理済み毛細管で血液を採取し、4°C、8000 rpmで10分遠心し、血漿を得た。測定まで血漿は-80°Cで保存した。血漿中のIgEは、Bethyl社のマウス免疫グロブリン定量用ELISAキットを用いて測定した。

7. データの解析

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。有意差の検定は、2群間の比較にStudent's *t*-testを用い、それ以外はOne-way-ANOVAとDannett's testによる多重比較を用い、有意水準は5%とした。

実験結果

1. BALB/c系マウスにおけるスギ花粉による感作の検討

5週齢の雌性BALB/c系マウスを用いた。Day 10, 12, 14の点眼あるいは点鼻後10分間において、後肢による顔面に対する掻き動作の回数及び前肢による顔面への擦り動作の時間は、抗原のかわりに生理食塩水を腹腔内投与して感作をせず、人工涙液を点眼あるいは点鼻した対照群と比較して違いがなく、点眼や点鼻の回数で増加しなかった(Table 1)。また、day 17でスギ花粉を点眼あるいは点鼻後、1時間行動を観察した場合も対照群と比較して顔面への搔

Table 1 The number of scratching and the time of Rubbing for 10 min after challenge (Control: artificial tears, Sensitize: pollen) in BALB/c mice

Challenge			1 st	3 rd	5 th
Eye	Scratch Bouts	Control	3.0 \pm 3.0	8.0 \pm 2.0	8.5 \pm 2.5
		Sensitize	6.2 \pm 1.1	4.0 \pm 2.0	4.7 \pm 1.2
	Rubbing (sec)	Control	26.5 \pm 5.0	52.5 \pm 6.0	49.0 \pm 5.0
		Sensitize	33.8 \pm 4.3	42.6 \pm 2.9	48.2 \pm 9.3
Nasal	Scratch Bouts	Control	0	0	2.0 \pm 2.0
		Sensitize	1.5 \pm 0.8	4.0 \pm 1.0	3.2 \pm 1.8
	Rubbing (sec)	Control	14.5 \pm 3.5	33.0 \pm 11.0	35.5 \pm 11.5
		Sensitize	24.1 \pm 4.4	27.5 \pm 3.2	36.7 \pm 1.6

Mean \pm SEM (Control group: *n* = 2, Sensitize group: *n* = 6).

き動作数、顔面への擦り動作時間に違いはなかった（データ省略）。一方、感作前（day 0）と感作・最後の反応惹起から3日後（day 20）における血中IgE値は、対照群では有意な変化は見られなかったが、感作した群では点眼・点鼻にかかわらずIgEが増加し、点鼻では感作前の3.36倍に点眼では2.35倍になっていた（データ省略）。

IgE値が増加し、花粉により感作されたにもかかわらず痒みに関連した行動が発現しなかったのは、BALB/c系マウスがヒスタミンで掻き動作を惹起されにくい⁷⁾ ことが一因であると推測されたので、以降の実験ではヒスタミンで掻き動作が惹起されるICR系マウス^{7,8)} を用いて検討を行った。

2. ICR系マウスにおけるスギ花粉による感作の検討

6週齢の雌性ICR系マウスを用い、点鼻により反応を誘発した。Day10, 14の点鼻後30分間、day20の点鼻後1時間行動を観察し、後肢による掻き動作全て（顔面、体幹）と前肢による顔面への擦り動作時間を調べた（Table 2）。30分間の掻き動作は非感作で人工涙液を点鼻した対照群において平均25-35回で、最も掻き動作が発現したのは感作花粉量1 mg、点鼻1日1回の群だった。1 mgで感作した群ではday10で掻き動作は約60回となり、day14まで点鼻を繰り返したところ1日1回の点鼻では74回とday10よりわずかに増加したものの、1日2回の点鼻では48回と減少し点鼻回数を増やしても反応が強くなることはなかった。6日間間隔をあけたday20でも対照群に比べ掻き動作数は多かった。腹腔内への感作花粉量を1 mgから2 mgと2倍に増やした群では、day10の1回目の点鼻では顕著な掻き動作は見られず、点鼻回数により徐々に掻き動作と擦り動作時間は増加したが、掻き動作数はday10, 14, 20いずれにおいても感作花粉量1 mgの群より少なかった。Day 20において1時間行動を観察したが、掻き動作の大半は点鼻後30分以内に発現した（データ省略）。一方、

Table 2 The number of scratching and the time of Rubbing for 30 min after challenge

	Sensitize	Challenge	day 10	day 14	day 20
Scratch Bouts	Saline	Artificial tears	35.0±10.5	29.6±5.5	25.6±7.0
	1 mg	Pollen	58.5±14.2	74.3±19.4	68.1±14.2
	1 mg	Pollen x 2	59.9±21.2	52.8±16.7	48.5±15.4
	2 mg	Pollen	35.5±12.2	48.5±16.8	50.1±9.9
Rubbing(sec)	Saline	Artificial tears	83.3±7.8	75.9±5.3	72.9±7.3
	1 mg	Pollen	97.9±10.2	87.1±7.2	90.6±6.3
	1 mg	Pollen x 2	99.9±6.6	89.3±9.2	85.2±8.9
	2 mg	Pollen	92.4±8.7	97.1±7.1	103.8±11.0*

Mean±SEM (n = 8). *P < 0.05 vs. Saline-Artificial tears group (Dannett's test).

顔面への擦り動作時間は感作した群全てで対照群より約10-30秒増加し、day20において2 mg感作群で統計的に有意だった。しかし、マウスは通常でも毛づくろいを頻繁にするため対照群の擦り動作時間も30分間で平均73-83秒と長いことから、スギ花粉点鼻による反応惹起との差を捉えることは難しいと考えられた。したがって、以後の実験では後肢による掻き動作数を花粉アレルギーによる痒みに関連した行動として計測した。

血漿中のIgE値は、day 0の感作前、day 5の2回目の感作の24時間後、day 20の点鼻による反応惹起の24時間後に採血して測定した（Fig.1）。腹腔内への2回目の感作後では、感作前と比較してIgE値は変化しなかったが、day 20の反応惹起後は感作群で感作前と比較してIgE値が有意に上昇した。感作抗原の量（1 mgと2 mg）や点鼻回数（1日1回と2回）によりIgE値の上昇に大きな違いはなかった。ただし、感作抗原の量を10分の1の0.1mgにした場合、反応惹起後のIgE値は1 mgのおよそ3分の1になった（データ省略）。

ICR系マウスでスギ花粉により、痒みに関連した症状も発現する花粉アレルギーモデルを作製できた。しかしながら、スギにより含まれる抗原Cry j1の量は異なるため、Cry j1を定量しモデルの改善を試みた。

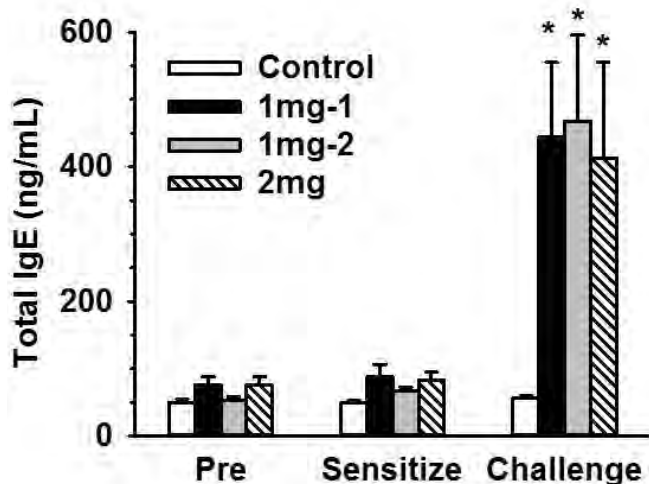


Fig. 1 Changes in total IgE plasma concentration in sensitized ICR mice

ICR mice were sensitized and challenged with Japanese cedar pollen (1 mg-1: sensitize 1 mg-challenge once/day, 1 mg-2: sensitize 1 mg-challenge twice/day, 2 mg: sensitize 2 mg-challenge once/day). As a control, mice were treated with saline and artificial tears instead of pollen. Plasma samples were obtained before sensitization (Pre), 24h after the second peritoneal sensitization (Sensitize) and 24h after the final challenge on day 20 (Challenge). Total IgE levels were determined by ELISA. Values represent the mean ± SEM from 8 mice. *P < 0.05 when compared with Pre (Student's t-test).

3. スギ花粉中のCry j1量の定量

富山県農林水産総合技術センター森林研究所より供与されたスギ花粉20検体についてスギ花粉抗原Cry j1量を測定した。花粉1 g中Cry j1量が最も多かったのはF1山田1-1の886.9 μg で、最も少なかったのは飽海3号の118.0 μg だった (Fig. 2)。また、20検体の平均は花粉1 g中569.2 μg だった。以降の実験ではCry j1含有量が705.1, 682.0 μg と高く、花粉量も豊富な久慈15号と23号から抽出した花粉粗抗原を感作に用いて検討した。

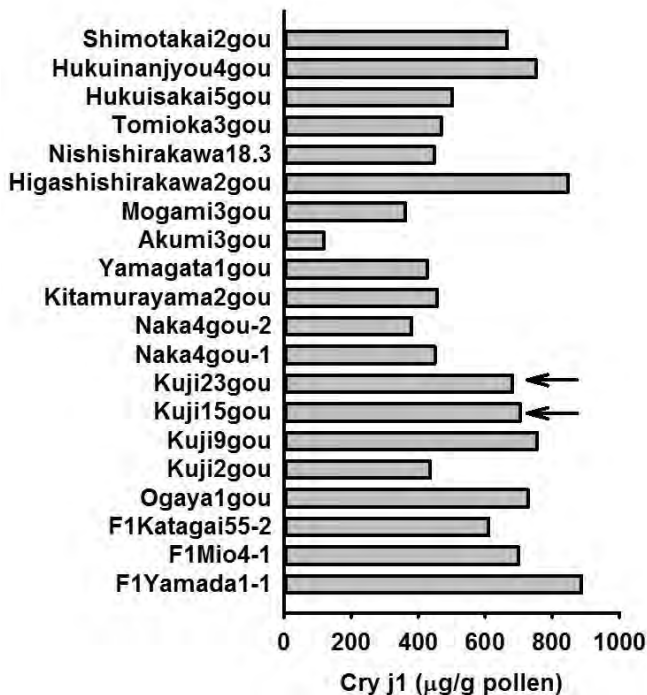


Fig. 2 Cry j1 contents in Japanese cedar pollen

20 Japanese cedar pollen were donated by Toyama Prefectural Agricultural, Forestry & Fisheries Research Center, Forestry Research Institute. The pollen were extracted with 0.125 M NaHCO_3 . The contents of Cry j1 in each extract were determined by ELISA. Arrow:Used for next experiments.

4. ICR系マウスにおけるスギ花粉粗抗原による感作の検討

非感作で人工涙液を点鼻した群 (A-T: Alum-Tears), 非感作で花粉を点鼻した群 (A-P: Alum-Pollen), スギ花粉粗抗原で感作し人工涙液を点鼻した群 (P-T: Pollen-Tears), スギ花粉粗抗原で感作し花粉を点鼻した群 (P-P: Pollen-Pollen) の4群で検討した。本実験では後肢による顔面や体幹への掻き動作を全て数えた。

5日間連続点鼻開始のday10, 終了のday14において, 点鼻後30分間の掻き動作はP-P群で最も観察された。しかしながら, 統計的にA-T群と比較して有意な差はなく, 連続点鼻から4日間あけたday18では4群で掻き動作数に違

いはなかった (Fig. 3A)。この時のday 0の感作前及びday 18で反応惹起の24時間後の血漿中IgE値は, 花粉点鼻に関係なく花粉粗抗原で感作を行ったP-T群とP-P群で同程度上昇していた (Fig. 3B)。

Fig. 1で花粉による感作24時間後ではIgE値は上がらず, 花粉による反応惹起24時間後にIgE値が上昇していたことから, IgE値の上昇には抗原の点鼻が重要だと考えられた。しかし, 点鼻に関係なく抗原感作によりIgE値が上昇した Fig. 3Bの結果から, IgEの上昇には抗原感作から適切な日数が必要だと推測された。また, 点鼻回数を増やしても痒みに関連した症状である掻き動作数に関係なく, 感作されていれば反応が惹起されることから, 連続点鼻をやめ感作の間隔を1週間に変更したFig. 4Aのスケジュールで検討を行った。感作抗原の作製には, リン酸緩衝液の代わりに生理食塩水を用いた。また, チャレンジ用の花粉も生理食塩水に懸濁した。腹腔内投与はこれまでと同じく0.2 mL, 点鼻は5 μL を鼻中隔に, 点眼は5 μL ずつ両眼に行った。

点鼻あるいは点眼後1時間の顔面又は頭部への掻き動作について10分毎の時間経過 (Fig. 4B) と1時間の合計 (Fig. 4C) を示した。生理食塩水を腹腔内に投与した群では生理食塩水の点鼻, 花粉の点鼻・点眼において1時間に平均で25-33回の掻き動作しか惹起されなかった。一方, 感作にアジュバントとして用いたImject® Alum溶液の腹腔内投与群では, 1時間に平均で51-59回と2倍近く掻き動作数が増加していたが, 点鼻において生理食塩水と花粉で掻き動作数に違いはなかった。花粉粗抗原で感作した群では, 生理食塩水点鼻で1時間に54回だった掻き動作が花粉点

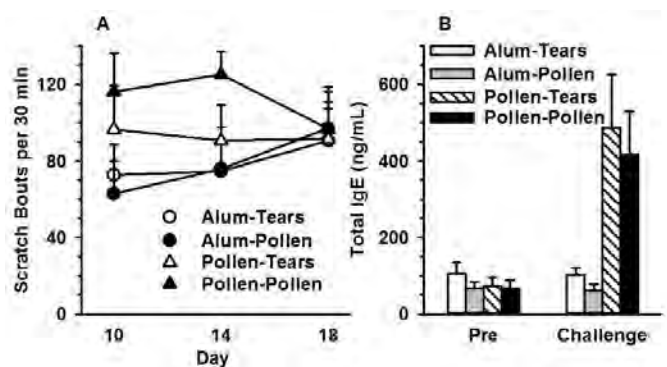


Fig. 3 The number of scratching for 30 min after nasal challenge (A) and total IgE plasma concentration (B) in ICR mice

ICR mice were sensitized by intraperitoneal administration of crude Japanese cedar pollen extract adsorbed on pollen (Pollen) or alum (Alum), then challenged by nasal drop application of pollen (Pollen) or artificial tears (Tears). Scratching bouts were counted for 30 min after challenge. Plasma samples were obtained before sensitization (Pre) and 24h after the final challenge on day 18 (Challenge). Total IgE levels were determined by ELISA. Values represent the mean \pm SEM from 8 mice.

鼻で64回に増加し、花粉の点眼では91回と生理食塩水群の2.7倍と有意に増加、Imject® Alum投与群の1.5倍になったが統計的に有意ではなかった。1回目の腹腔内投与前、2回目の腹腔内投与前では血漿中IgE値に変動はなかったが、花粉点鼻24時間後では花粉粗抗原感作群のみ顕著に

IgEが増加していた (Table 3)。

考 察

花粉症は花粉が原因 (アレルゲン) となるI型アレルギー疾患と定義され、鼻症状 (くしゃみ、水様性鼻汁、鼻閉など) と眼症状 (掻痒感、流涙など) が主な症状である。花粉症の予防や治療に有効な薬剤やサプリメントの評価やアレルギーの発症、緩解・治癒等の機序の解明には、スギ花粉により免疫応答が惹起され、ヒトに類似したアレルギー症状を備えた動物モデルが必要不可欠である。しかしながら、スギ花粉を抗原とした報告は、モルモットアレルギー性鼻炎モデル⁵⁾ やマウスアレルギー性結膜炎モデル⁶⁾ など限られている。そこで、本研究では富山県農林水産総合技術センター森林研究所より供与されたスギ花粉を活用し、アレルギー症状のうち特に痒み症状を有するマウスの花粉アレルギーモデルを確立することを目指し検討を行った。

初めに炎症や免疫・アレルギー疾患の研究に広く用いられているBALB/c系マウスを用いてスギ花粉による感作を行った。スギ花粉の腹腔内への感作、点鼻あるいは点眼によるスギ花粉の反応誘発により血漿中のIgE値は増加したが、観察した症状 (痒みに関連した後肢による掻き動作、前肢による擦り動作) は発現しなかった。花粉症の症状には肥満細胞から放出されるヒスタミンやロイコトリエンなどの化学物質が関与している。Fukushimaらのスギ花粉抗原Cry j1によるアレルギー性結膜炎モデル⁶⁾ では、day 0, 5にBALB/c系マウスへCry j1とalumの乳剤を腹腔内投与し、day 11に1.2 mg/2 μ LのCry j1を右目に点眼した時、エバンスブルーの色素漏出 (血管透過性の亢進) と好酸球浸潤、血清IgE値の上昇がみられ、血管透過性の亢進は抗ヒスタミン薬で抑制された。肥満細胞を脱顆粒するcompound 48/80はBALB/c系マウスに痒みに関連した掻き動作を惹起するが、抗ヒスタミン薬で抑制されず、compound 48/80による血管透過性の亢進は抗ヒスタミン薬で抑制される⁹⁾。HistamineはBALB/c系マウス、ddY系マウス及びICR系マウスの血管透過性を亢進するが、掻き動作を惹起するのはICR系マウスのみである⁷⁾。これらの報告を勘案すると、IgE値が増加したことからスギ花粉により感作され肥満細胞の脱顆粒でhistamineは放出されているが、BALB/c系マウスではhistamineにより痒み反応が起こらないため、症状が観察されなかったと推測された。そこで、histamineにより掻き動作が誘発されるICR系マウス^{7,8)} を用いて検討を行った。

ICR系マウスを用い、腹腔内投与する花粉の量や花粉を点鼻する回数を変化させた。花粉症の鼻のむずむず感や目の痒みの症状について、マウスでは痒みに関連した行動と

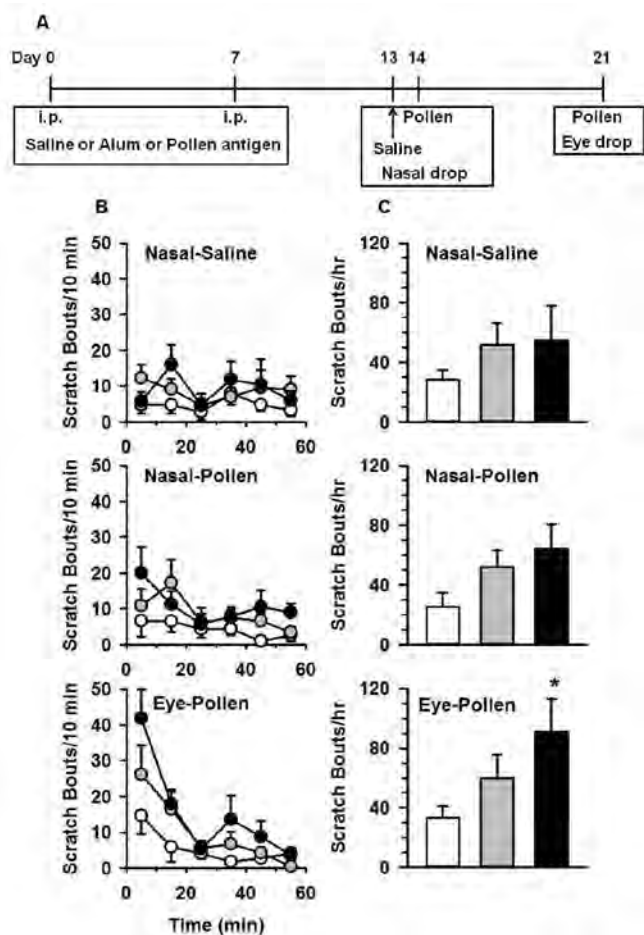


Fig. 4 The scratch bouts caused by pollen challenge under the experimental protocol (A) in ICR mice

ICR mice were sensitized by intraperitoneal administration of crude Japanese cedar pollen extract adsorbed on alum (closed circle and column). Non-sensitized groups were treated with saline (open circle and column) or alum (gray circle and column) instead of the pollen injection. Mice were challenged with intranasally saline on day 13 or pollen on day 14 and then instillation of pollen on day 21. Scratch bouts were counted for 1 h after challenge. Data from 10-min (B) or 60-min (C) periods are presented as mean \pm SEM from 8 mice. * $P < 0.05$ when compared with open column (Dannett's test).

Table 3 Changes in total plasma IgE concentration in sensitized ICR mice

	Pre sensitize	Before 2nd sensitize	After nasal challenge
Sensitize	day 0	day 7	day 15
Saline	108.6 \pm 14.7	108.3 \pm 16.4	112.9 \pm 10.3
Alum	103.5 \pm 12.9	103.3 \pm 8.2	119.3 \pm 9.6
Pollen	81.0 \pm 15.0	78.3 \pm 7.6	439.5 \pm 96.1

Mean \pm SEM ($n = 8$).

して後肢による掻き動作と前肢による顔面への擦り動作時間を観察した。BALB/c系マウスと異なり、花粉で感作も反応誘発も行わなかった群と比較して掻き動作数と顔面への擦り動作時間は増加した。掻き動作が対照群の2倍以上になったのに対し、マウスは通常でも毛づくろいを頻繁にするため、感作した群全てで対照群より約10-30秒増加しても最大で1.4倍程度にしかならなかった。したがって、症状の観察は後肢による掻き動作が適していると判断した。最も症状がみられたのは感作花粉量1 mg、点鼻1日1回の群であった。また、感作した3群でIgE値は同程度上昇し、感作花粉量を0.1 mgにするとIgE値は1 mgの3分の1になることから、感作時の花粉量は1 mgで十分であり、点鼻も1日1回で、ICR系マウスにおいてスギ花粉による痒みに関連した症状も発現する花粉アレルギーモデルを作製できた。しかし、スギ花粉の主要抗原であるCry j1とCry j2の量はスギの個体により異なる^{10,11)}。花粉1 mgで感作しても、抗原量の違いにより反応がきちんと惹起されない可能性もあることからCry j1を定量しモデルの改善を試みた。

富山県農林水産総合技術センター森林研究所より供与されたスギ花粉20検体について花粉1 gに含まれるCry j1の平均は569.2 μ gで花粉100 g中35 mg前後という報告¹⁰⁾ やスギ140個体における花粉1 g中の平均435 μ g¹¹⁾ より少し多かった。最も多い検体と少ない検体では7.5倍も異なり、既報¹¹⁾でもCry j1で約14倍、Cry j2で約19倍の差があることや市販のスギ花粉アレルゲンでもCry j1が著しく少ない場合もある¹²⁾ ことから、スギ花粉を用いる場合には抗原量を定量するか数種類の花粉を混ぜて用いた方がよいと思われる。精製したCry j1で感作している報告^{13,14)}もあるが、スギ花粉症にはアレルゲンとしてCry j2もCry j1と同程度重要であり¹⁰⁾、これら以外にもアレルゲンとなる可能性のある遺伝子が多数見いだされている¹⁵⁾ ことから、本研究ではCry j1含有量が高い久慈15号と23号から抽出した花粉粗抗原を感作に用いて検討した。

スギ花粉を用いた感作時はマウス当たり1 mg投与していたので、那珂4号のCry j含有量(約400 μ g/1 g花粉)から、0.4 μ g程度のCry j1を含んでいた計算になる。花粉粗抗原で感作時は、花粉粗抗原抽出後にCry j1の定量を行っていないため推定でマウス当たり約1 μ gと2倍以上のCry j1を含んでいる計算になる。花粉1 mgや2 mg感作時に比べ、掻き動作は、5日間連続点鼻開始のday10、終了のday14において、116回、125回とおよそ2倍で検討した4群の中で最も掻き動作数が多かった。しかしながら、alumを腹腔内投与した非感作のマウスに人工涙液を点鼻したA-T群や花粉粗抗原で感作して人工涙液を点鼻したP-T群と比較して統計的に有意な差はなく、連続点鼻か

ら4日間あけたday 18では全ての群で掻き動作数に違いはなかった。ただし、生理食塩水を腹腔内投与した非感作群の平均掻き動作数25-35回に対し、alumを腹腔内投与した非感作群では72-90回と明らかに増加し、このalumによる反応は人工涙液点鼻でも花粉点鼻でも大きな違いがなかったことから、alumにより点鼻という刺激に対する反応性が高まっている可能性がある。この時の血漿中IgE値は、花粉粗抗原で感作した群は花粉の点鼻の有無に関係なく増加していた。花粉で感作した実験で、2回目の腹腔内投与24時間後ではIgE値は変化なく、連続点鼻後にIgE値が増加していたため、当初はIgE値の増加に連続点鼻が必要だと考えていた。しかし、今回感作後に人工涙液を連続点鼻した群でもIgE値は上昇したことから、連続点鼻は必須でなくIgEの上昇には抗原感作から適切な日数が必要だと推測された。また、点鼻回数を増やしても痒みに関連した症状である掻き動作数は変化せず感作されていれば反応が惹起された。そこで、連続点鼻をやめ感作の間隔を1週間に変更し、同じマウスで生理食塩水点鼻と花粉点鼻を行い花粉に対する反応性を調べ、非感作群において生理食塩水の腹腔内投与とalumの腹腔内投与の比較も行った。

血漿中IgE値を感作前、2回目の感作前、花粉点鼻の24時間後に採血し測定したところ、花粉粗抗原で感作したマウスのみ点鼻後に増加し、その値も439 ng/mLで連続点鼻した前回416 ng/mLと同程度だったことから、IgE値の上昇に連続点鼻は必須でないことが再確認できた。生理食塩水点鼻後1時間の顔面及び頭部への掻き動作は、alum投与群で51回と生理食塩水投与群の1.8倍で花粉粗抗原投与群の54回と同程度だった。花粉点鼻時はalum投与群で52回と生理食塩水点鼻時と違いなく、生理食塩水投与群の2倍で、花粉粗抗原感作群では64回とわずかに増加した。これらの結果から、alumの腹腔内投与により点鼻刺激に対する反応性が高まり、花粉抗原感作により惹起される掻き動作の反応が見えにくくなっていると考えられる。花粉点鼻の1週間後に花粉を点眼したところ、顔面及び頭部への掻き動作はalum群で生理食塩水群の約1.8倍だったが、花粉感作群はalum群の1.5倍と点鼻よりは反応が見やすくなった。

Alumのようなアジュバントは抗原と一緒に投与され抗原性を高める役割があるが、その作用機序は不明な点が多い。Alumは樹状細胞への抗原の取り込みを高めるアジュバントと言われているが、最近の研究で樹状細胞の膜リン脂質と結合し、シグナル分子の相互作用が促進されアジュバント活性を示すこと¹⁶⁾ やマウスにおいて強力な内因性の免疫賦活作用を有すること¹⁷⁾ が明らかになっている。これまで症状を観察した報告では、B10.S系マウスにおいて1日2回1週間alumと花粉抽出液あるいはCry j1を鼻腔

に感作し、その後花粉またはCry jIを1週間毎に鼻腔にチャレンジした時、1週間後では1時間に1回程度のくしゃみで、8回目（最初の感作から9週間後）でようやく1時間に10-15回になり、この報告では対照の非感作群はリン酸緩衝液を用いてalumのみを用いた群は検討していない¹⁸⁾。

1週間毎に3回Cry jI 10 μ gをalumと一緒にB10.S系マウスに皮下注射し、最後の感作から5週間後に5日間連続Cry jIを鼻腔にチャレンジした時の5分間のくしゃみは13回で最初のチャレンジ終了後からさらに12週間後に再度5日間連続Cry jIを鼻腔にチャレンジすると5分間のくしゃみは50回になったが、非感作群のデータは示されていない¹³⁾。BALB/cマウスを用いた報告ではCry jI 5 μ gをアジュバントなしにday 1,8,15で鼻腔に感作し、day 22から7日間連続1 μ gのCry jIをチャレンジし、day 28において10分間で15回のくしゃみと37回の鼻擦りが観察され、この時の非感作の対照群の鼻擦りは11回だった¹⁴⁾。鼻擦りは痒みに関連した行動として起こってくると考えられるが、BALB/c系マウスの顔面への擦り時間は生理食塩水を腹腔内投与した非感作群と違いがなかった今回の結果と異なった。擦り時間を擦り回数に変えても今回の実験では顕著な違いはみられず、鼻擦りにヒスタミンが関与していないなら、非感作の対照群の例数が2匹と少ないことも結果が異なった一因かもしれない。その他の痒みに関連した行動を観察した報告はモルモットの報告で、day 0,7に10 μ gの花粉抽出物をalumと一緒に腹腔内へ投与し、day 21から1週間毎に2 mg/10 μ Lの花粉を両目にチャレンジしたアレルギー性結膜炎モデルにおいて点眼後30分間の眼への掻き動作はday 58が最も多く35回程度で、陰性対照はほとんど掻き動作を惹起しないが感作もチャレンジも行わない無処置のモルモットを用いていた¹⁹⁾。このようにこれまでのモデルでは、症状の観察に感作とチャレンジで長期間を有し、alumを用いた場合でもalum単独で処置した非感作群は検討されていない。今回の研究では、alumを処置した非感作群と有意な差はみられないものの、生理食塩水を処置した非感作群に対し、これまでの報告と比べ非常に短期間の処置で花粉点眼後1時間に91回と有意な掻き動作を観察することができた。これまでにマウスを用いたスギ花粉アレルギーのモデルで痒みに関連した症状の報告はほとんどないが、今回、薬剤による抑制などが検討可能な痒み関連行動(掻き動作)を惹起するスギ花粉アレルギーモデルの大筋ができた。また、alumによる感受性の増大機構はalumの作用メカニズムの解明につながるかもしれない。

今後、改良を加える余地があり、抗ヒスタミン薬の効果などモデルの有用性を確認する必要も残っているが、花粉粗抗原で腹腔内に感作し、花粉の点眼で反応を惹起する本

モデルは実験期間を3週間以内と大幅に短縮でき、痒みに関連した症状も観察できる花粉アレルギーモデルとして期待できる。

謝 辞

スギ花粉を提供して下さった富山県農林水産総合技術センター森林研究所 齊藤真巳主任研究員に感謝いたします。また、本研究はMRCポリサッカライド株式会社との共同研究の一環として実施されたものである。

文 献

- 1) Okuda M., Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, **91**, 288-296 (2003)
- 2) 花粉症患者実態調査報告書, 東京都福祉保健局, 2007年
- 3) 岡本美孝: 花粉症の民間医療について. 厚生労働省HP, 2005年 <http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/kenkou/ryumachi/okamoto.html>
- 4) 花粉症環境保健マニュアル2009, 環境省, 2009年
- 5) Nabe T., Shimizu K., Mizutani N., Saeki Y., Yamamura H., Takenaka H., Kohno S., A new model of experimental allergic rhinitis using Japanese cedar pollen in guinea pigs. *Jpn. J. Pharmacol.*, **75** (3), 243-251 (1997)
- 6) Fukushima A., Shii D., Sumi T., Kageyama T., Ueno H., *Cryptomeria japonica*-Induced allergic conjunctivitis in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(9), 1745-1747 (2007)
- 7) Inagaki N., Nagao M., Nakamura N., Kawasaki H., Igeta K., Musoh K., Nagai H., Evaluation of anti-scratch properties of oxatomide and epinastine in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **400**, 73-79 (2000)
- 8) Maekawa T., Nojima H., Kuraishi Y., Itch-associated responses of afferent nerve innervating the murine skin: Different effects of histamine and serotonin in ICR and ddY mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **84**, 462-466 (2000)
- 9) Inagaki N., Igeta K., Kim J. F., Nagao M., Shiraishi N., Nakamura N., Nagai H., Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80. *Eur. J. Pharmacol.* **448**, 175-183 (2002)
- 10) 澤谷真奈美, 安枝浩, 秋山一男, 信太隆夫, 谷口美文, 白井美津子, 安藤駿作, 栗本雅司, 松橋直: スギ花粉アレルギーCry jIIの免疫学的, 物理化学的性質, アレルギー, **42** (6), 738-747 (1993)

- 11) 福田陽子, 安枝浩, 齊藤明美, 近藤禎二: 花粉中の Cry j2抽出法の改良及びCry j2含量におけるスギ個体間変異の検討, *アレルギー*, **56** (10), 1262-1269 (2007)
- 12) 澤谷真奈美, 小野昭子, 河野恵三, 河島トモ子, 谷口美文, 池上伯郎, 白井美津子, 栗本雅司: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay によるCry jI, Cry jII定量法の開発, *アレルギー*, **43** (3), 467-473 (1994)
- 13) Tsunematsu M., Yamaji T., Kozutsumi D., Murakami R., Nagai H., Kino K., A new murine model of allergic rhinitis by repeated intranasal Cry j 1 challenge. *Biomed. Res.*, **29** (3), 119-123 (2008)
- 14) Nomiya R., Okano M., Fujiwara T., Maeda M., Kimura Y., Kino K., Yokoyama M., Hirai H., Nagata K., Hara T., Nishizaki K., Nakamura M., CRTH2 plays an essential role in the pathophysiology of Cry j 1-induced pollinosis in mice. *J. Immunol.*, **180** (8), 5680-5688 (2008)
- 15) Futamura N., Ujino-Ihara T., Nishiguchi M., Kanamori H., Yoshimura K., Sakaguchi M., Sshinohara K., Analysis of expressed sequence tags from *Cryptomeria japonica* pollen reveals novel pollen-specific transcripts. *Tree Physiol.*, **26**, 1517-1528 (2006)
- 16) Flach T.L., Ng G., Hari A., Desrosiers M.D., Zhang P., Ward S.M., Seamone M.E., Vilaysane A., Mucsi A.D., Fong Y., Prenner E., Ling C.C., Tschopp J., Muruve D.A., Amrein M.W., Shi Y., Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med.*, **17** (4), 479-87 (2011)
- 17) Marichal T., Ohata K., Bedoret D., Mesnil C., Sabatel C., Kobiyama K., Lekeux P., Coban C., Akira S., Ishii K.J., Bureau F., Desmet C.J., DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.*, Published online **17** July (2011)
- 18) Ogita-Nakanishi H., Nabe T., Mizutani N., Fujii M., Kohno S., Absence of Nasal Blockage in a Japanese Cedar Pollen-Induced Allergic Rhinitis Model Mouse. *Allergol. Int.*, **58**, 171-178 (2009)
- 19) Yasuda M., Kato M., Nabe T., Nakata K., Kohno S., An experimental allergic conjunctivitis induced by topical and repetitive applications of Japanese cedar pollens in guinea pigs. *Inflamm. Res.* **48**, 325-336 (1999)

平成 22 年度 製剤技術実習報告

－混合工程の製剤管理とバリデーションの実施方法について－

永井 秀昌, 明 長良, 朝日 正三¹⁾

¹⁾ 株式会社 徳寿工作所

Mixing process manufacturing and validation

Hidemasa NAGAI, Nagayoshi MYO, Shozo ASAHI¹⁾ Akio TANAKA*

¹⁾ TOKUJU Co., Ltd

本県の医薬品製造に従事する技術者の製剤製造技術力の向上を図ることを目的として、今年度から（社）富山県薬業連合会が県の補助事業として製剤技術実習を実施することになった。今年度は、混合工程と造粒工程に関する実習が行われた。そのうち、本年の9月に薬事研究所において実施された混合技術実習についてその概要を報告する。

混合工程は固形製剤の製造において、含量均一性を担保する上で重要な工程である。また、混合が適切でないと、錠剤の内部構造が不均一となり、崩壊性、硬度などにバラツキを生じるおそれがある。そこで、製剤機械メーカーの（株）徳寿工作所の協力を得て「混合工程の製剤管理（単位操作技術）とバリデーションの実施方法」をテーマに下記のとおり実習を行った。

テーマ：混合工程の製剤管理（単位操作技術）とバリデーションの実施方法

月 日：平成22年9月9日、10日

場 所：富山県薬事研究所

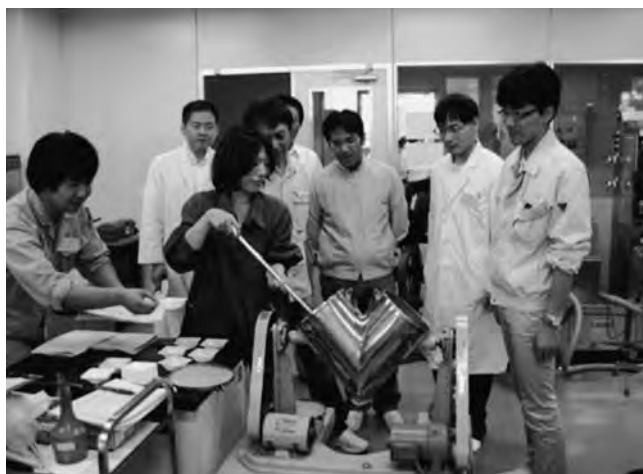
講 師：株式会社 徳寿工作所 朝日 正三 氏、
中村 俊郎 氏、
勝又 正樹 氏

富山県製剤技術研修会アドバイザー 大久保 比呂司 氏

富山県薬事研究所 永井 秀昌 研究員

明 長良 嘱託研究員

受講者：富山県内の製薬企業に勤務する実務経験が5年以上の技術者 20名



実習内容

1. 混合材料

混合材料として、下記により製造したガラスビーズ、顆粒及び顆粒粉碎品並びに市販のベンガラ及び炭酸カルシウム（以下「炭カル」という。）を使用した。

(1) ガラスビーズ

無色のガラスビーズは、東京硝子器械(株)製の径0.35~0.5 mmのものを、また、赤色のガラスビーズは、同社製の径0.18~0.25 mmの無色ガラスビーズを食用色素（赤色106号）で流動層造粒装置（FL-LABO，フロイント産業(株)）を用いて着色した。

(2) 顆粒

白色の顆粒は、乳糖2 kgに精製水350 mLを加えて練合機（PNV-5型，(株)入江商会）で練合した後、押出造粒機（HU-G, 0.5 mmφ，(株)畑鉄工所）により造粒した。また、赤色の顆粒は、練合時に食用色素（赤色106号）6 mgを添加して上記と同様に製造した。

(3) 顆粒粉碎品

上記顆粒を解砕整粒機（TC-Lab, 1.0 mmφ，深江パウテック(株)）で整粒後、355μm（42メッシュ）の篩をかけ、篩を通過したものを粉碎顆粒品とした。

各混合材料の物性は、表1のとおりである。

表1. 各混合材料の物性値

混合材料	かさ密度	安息角	平均粒子径
ガラスビーズ（赤色）	1.45 g/cm ³	22.3°	214 μm
ガラスビーズ（無色）	1.45 g/cm ³	22.3°	425 μm
顆粒（赤色，白色）	0.56 g/cm ³	34.3°	675 μm
顆粒粉碎品（赤色，白色）	0.59 g/cm ³	45.4°	113 μm
ベンガラ	0.63 g/cm ³	47.3°	0.21 μm
炭カル	0.58 g/cm ³	47.5°	2.38 μm

2. 混合機

次の5種類の混合機を使用した。

- ・マイクロ型（1L）V型混合機（S-3型，筒井理化学器械(株)）（以下「V型（1L）」という。）
- ・5L型V型混合機（V-5型，(株)徳寿工作所）（以下「V型（5L）」という。）
- ・40L型V型混合機（(株)岩黒製作所）（以下「V型（40L）」という。）
- ・50L型リボン型混合機（R-70型，(株)徳寿工作所）（以下「リボン型」という。）
- ・2L型ハイスピードミキサー（FS-GS-5型，深江パウテック(株)）（以下「ハイスピードミキサー」という。）

3. 混合材料の投入方法および評価方法

混合工程における重要なパラメータや混合特性について、受講者の理解を深めるため、1)投入方法、2)混合材料及び3)混合機種の違いが均一性に与える影響についてモデル実験を行った（表2参照）。

表2. 混合材料の投入方法および評価方法

混合機	全容積 L (仕込量)	回転速度 (rpm)	混合材料	投入方法	仕込量	仕込率 (%)	評価方法	実験番号	
V型 (1L)	2 (1)	40	顆粒	二層・完全別々・ランダム	赤色：白色＝ 350g：350g	40%	混合開始後、15秒、30秒、1分、3分、5分経過後の混合状況を目視で観察	1)ーア	
					赤色：白色＝ 200g：200g	70%		1)ーア	
V型 (5L)	10 (5)	31	ガラスビーズ	二層・完全別々・ランダム	赤色：無色＝2kg ：4kg	40%	混合開始後、1、2、5、10、20分経過後に5箇所から約10gをサンプリングする。250μmの篩を用い、2種類のビーズを分け、赤色ビーズの重量(%)で評価	1)ーイ 2)	
			顆粒	二層	赤色：白色＝ 750g：1500g			混合開始後、1、2、5、10、20分経過後に5箇所から約1gをサンプリングする。サンプリング試料1gあたり30mlの蒸留水に溶解し、吸光度（OD:508nm）で評価（吸光度法）	2)
			顆粒粉碎品	二層	赤色：白色＝ 800g：1600g				
V型 (40L)	80 (40)	20	ベンガラ、炭カル	二層・上下反転・ランダム	ベンガラ：炭カル＝ 1kg：19kg	40%	混合開始後、5、10、20、30、40分経過後に6箇所から約20gをサンプリングする。フォトメーターを用いて明度を測定し、評価（明度測定法）	1)ーウ 3)	
リボン型	70 (50)	70	ベンガラ、炭カル	二層・上下反転・ランダム	ベンガラ：炭カル＝ 1.2kg：23.8kg	40%	明度測定法	1)ーウ 3)	
ハイスピードミキサー	5 (2)	200	ベンガラ、炭カル	二層・上下反転・ランダム	ベンガラ：炭カル＝ 50g：950g	40%	明度測定法	1)ーウ	

1) 混合材料の投入方法の違いが混合の均一性に与える影響の検討

ア) 顆粒の混合実験 (V型 (1L))

赤色及び白色の顆粒を、図1の3パターンの投入方法でV型 (1L) に表2に示す量を仕込み、混合を開始してから15秒、30秒、1分、3分及び5分経過後の混合状況を目視で観察した。

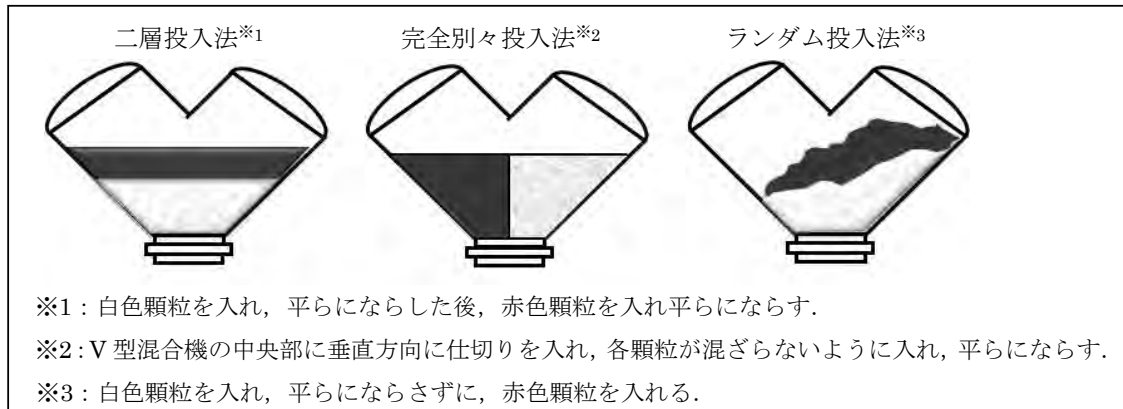


図1. 混合材料の投入方法

イ) ガラスビーズの混合実験 (V型 (5L))

V型 (5L) に赤色ガラスビーズ及び無色ガラスビーズを図1の方法で表2に示す量を投入 (二層投入法及びランダム投入法では、無色ガラスビーズを下に赤色ガラスビーズを上とした。) し、混合実験を行った。混合を開始してから1分、2分、5分、10分及び20分経過後に、図2で示す5箇所のポイントからペンシル型サンプラー (筒井理化学器械㈱) を用いて、各ポイントから約10gのサンプリングを行った。サンプリング試料は250 μ m (60メッシュ) の篩により2色のガラスビーズを分け、各ガラスビーズの重量を測定し、赤色ガラスビーズの含有率で評価した。

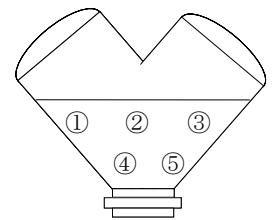


図2. サンプリングポイント

ウ) ベンガラ及び炭カルの混合実験 (V型 (40L), リボン型, ハイスピードミキサー)

V型 (40L), リボン型, ハイスピードミキサーの各混合機に、ベンガラ及び炭カルを図1の二層投入法 (炭カルを下にベンガラを上にしたもの及び投入順を逆にしたもの) 及びランダム投入法 (炭カルを下にベンガラを上とした。) で表2に示す量を仕込み、混合実験を行った。

V型 (40L) 及びリボン型については、混合を開始してから5分、10分、20分、30分及び40分経過後に、また、ハイスピードミキサーについては、混合を開始してから1分、2分、5分、10分及び20分経過後に、図3で示すサンプリング箇所から約20gのサンプリングを行った。

フォトメーターを用いて1サンプルあたり5回明度値を測定し、その測定値の最大と最小を切り捨て、残りの3つの値を平均し、測定値とした。そして、全てのサンプリングポイントの測定値を平均しその時間の明度値として表し、混合到達度を算出した。

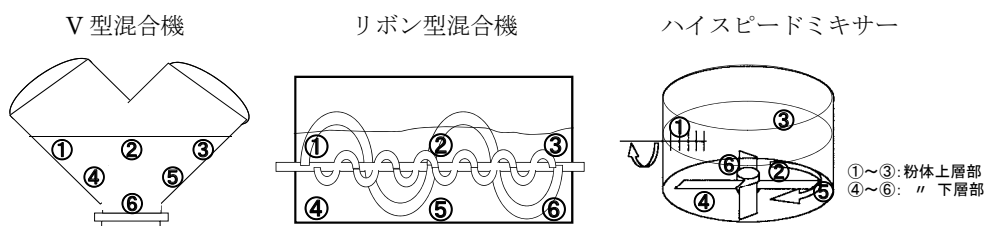


図3. 各混合機のサンプリングポイント

2) 混合材料の違いが混合の均一性に与える影響の検討 (顆粒, 粉碎顆粒品)

1) -イのガラスビーズの混合実験の結果と比較するため, V型 (5L) に顆粒又は粉碎顆粒品を図1の二層投入方法で表2に示す量を投入し, 仕込率を40%に統一した条件で混合実験を行った。そして, 1) -イと同様のサンプリング場所, 時間でサンプリングし, サンプリング試料1gあたり30 mlの蒸留水に溶解し, 分光光度計で吸光度 (OD:508 nm) を測定した。

3) 混合機種の違いが混合の均一性に与える影響の検討

1) -ウの実験のうち, V型 (40L) 及びリボン型の混合到達度を比較した。

考 察

1) 投入方法の違いが均一性に与える影響

ア) 顆粒の混合実験 (V型 (1L))

V型 (1L) を用いた顆粒の混合実験の結果を, 図4に示す。仕込率が70%では, 粒子径が同一の2種類の顆粒を二層投入法により投入した場合, 混合開始1分までに2種類の顆粒が均一に混合されたことが目視で確認されたのに対し, 完全別々投入法により投入した場合では, 混合を開始してから5分経過後においても, 混合が不完全あることが観察された (図4A)。また, ランダム投入法では, 混合を開始してから30秒経過後では二層投入法と比べ混合状態が悪いものの, 1分経過後には二層投入法と大差が見られなかった。V型混合機の左右の円筒間の混合速度は上下方向の1/10以下であると報告されており¹⁾, 左右の円筒に別々に原料を入れた場合では均一に達するまでの時間が長くなることが予想された。今回行った実験から, 均一に達するまでの時間は完全別々投入法が最も長く, V型混合機では回転軸に対して水平方向に混合が進行しにくいことが確認できた。

一方, 仕込率を40%とした場合, いずれの投入方法においても, 均一になるまでに要する時間が短縮され, 完全別々投入方法でも混合を開始してから5分経過後には均一に混合されていた (図4B)。V型混合機のような容器回転式混合機の場合, 最適仕込率は30~50%と言われているが²⁾, 今回行ったV型 (1L) においても同様であることが確認された。

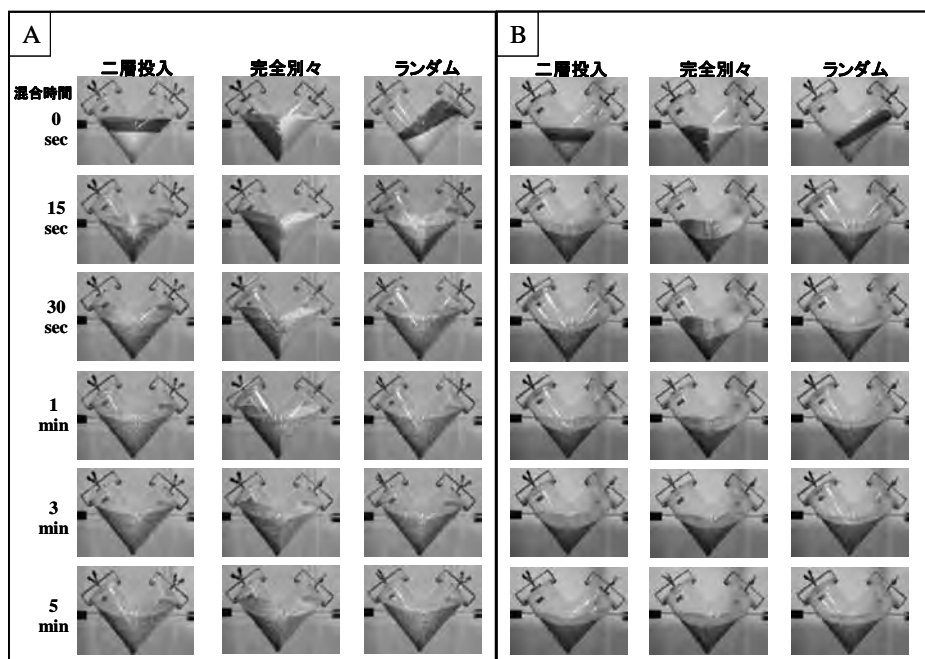


図4. 投入方法の違いによる経時的混合状況 (V型 (1L), 材料: 顆粒, A. 仕込率 70% B. 仕込率 40%)

イ) ガラスビーズの混合実験 (V型 (5L))

図5ではガラスビーズを用いて行った投入方法の違いによる標準偏差と混合到達率を経時的に表している。均一に混合された状態 (赤色ビーズ含有率:0.333) を1とした時の各サンプリング時における赤色ビーズの含有率の比率を、混合到達率とした (次式)。

$$(\text{混合到達率}=1 - (|0.333 - \text{サンプリング時の赤色ビーズ含有率}| / 0.333))$$

完全別々投入法では初期の標準偏差が大きく、バラツキが大きいのに対し、二層・ランダムではバラツキが小さい結果となり、顆粒で行った図4の結果と一致していた (図5A)。一方、混合到達率のグラフでは、二層投入では混合2分後に到達度が上昇した後に低下し、再び100%近くまで上昇していた。一方のランダム、完全別々では5分後に到達率のピークがあり、その後低下する傾向が認められた (図5B)。

また、サンプリング箇所別の含有率を比較した結果、各サンプリング箇所でも含有率に差が認められ、いずれの投入法においても混合20分後までにすべてのサンプリング箇所でも含有率が100%にならなかった (図6)。完全別々投入法では、無色のビーズを投入した容器右側 (③, ⑤) の含有率が20分後でも低く、左右の混合が進んでいない様子が確認されたが、二層投入法及びランダム投入法においても同様の傾向が認められ、左右での混合状態に違いが認められた。二層投入法でも左右の含有率にバラツキが認められた理由として、サンプリングの位置を厳密に設定していなかったことや、サンプリング者を毎回固定してなかった人為的な問題が原因と推測される。

このガラスビーズの混合実験において、一旦到達率が上昇した後での低下現象やサンプリング箇所ごとの含有率に大きなバラツキが認められた原因として、偏折の発生が考えられた。混合物の粒子径比が0.8以下になると、振動や重力の作用でパーコレーション (浸透効果) による偏析が起りやすくなることが知られている³⁾。今回用いたガラスビーズは赤色と無色のビーズで粒子径が異なる (粒子径比=約0.5) ために、流動性が良く、粒子同士の相対速度の大きなガラスビーズは偏析が発生しやすかったと考えられ、この実験からは投入方法の違いによる比較はできなかった。

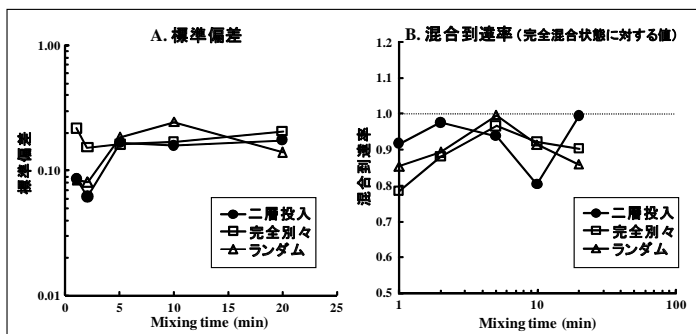


図5. 投入方法の違いによる標準偏差と混合到達率 (V型 (5L), 材料: ガラスビーズ)

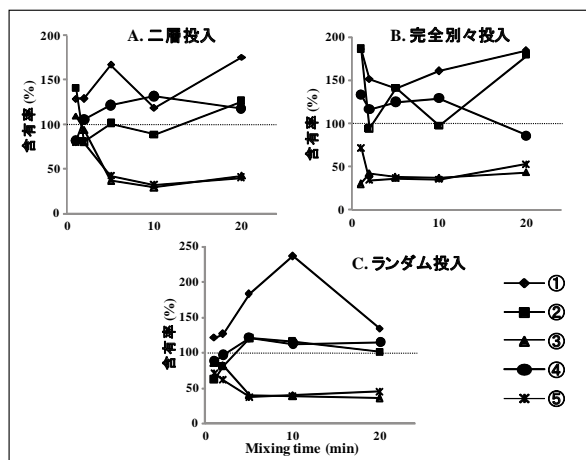


図6. 投入方法の違いによる各サンプリング箇所の含有率 (V型 (5L), 材料: ガラスビーズ)

ウ) ベンガラと炭カルによる混合実験 (V型 (40L), リボン型, ハイスピードミキサー)

図7では3種のタイプの異なる混合機を用いて行った投入方法の違いによる混合到達度を示している。材料にはベンガラと炭カルを用い、フォトメーターを用いて測定した値から混合到達度を算出した (次式)。

$$\text{混合到達度} = (\text{初期の白色電圧値} - \text{測定電圧の平均値}) / (\text{初期の白色電圧値} - \text{混合最終時の電圧値})$$

この結果、V型 (40L) においてランダム投入は二層投入と比較して、混合到達度が低い傾向が認められた (図7A)。これは、結果 (ア) で認められたようにランダム投入では二層投入と比較して、初期の混合状態が悪いという現象が、40Lのスケールで顕著に認められたためと考えられる。このように、V型混合機のような容器回転式混合機では、回転軸に対して水平方向への材料の移動に時間がかかることから、材料を平らにならさずに投入するランダム投入法よりも、平らにならしてから投入する二層投入法が早く均一に達することが確認できた。

また、二層投入法において、ベンガラを上、炭カルを下にした投入法と上下を反転させた投入法を比較した場合、到達度に大きな差は認められなかった。一般的に、混合する材料間に密度差がある場合、密度の大きい材料を上にして投入する方が混合度は高くなることが知られている。今回の実験で用いたベンガラと炭カルは、かさ密度に顕著な違いがなかったため（表1）、上下を反転させた場合でも到達度に差が認められなかった。

一方、リボン型及びハイスピードミキサーではいずれの投入法においても高い混合到達度を示し、投入方法の違いによる到達度の差は認められなかった（図7B, C）。

なお、図8では、V型（40L）でのサンプリング箇所別の到達度を比較しているが、各サンプリング箇所での到達度に大きな差は認められなかった。また、図には示していないが、リボン型、ハイスピードの場合でも同様に差は認められず、ガラスビーズ混合時に見られたような偏析は発生していないと考えられる。

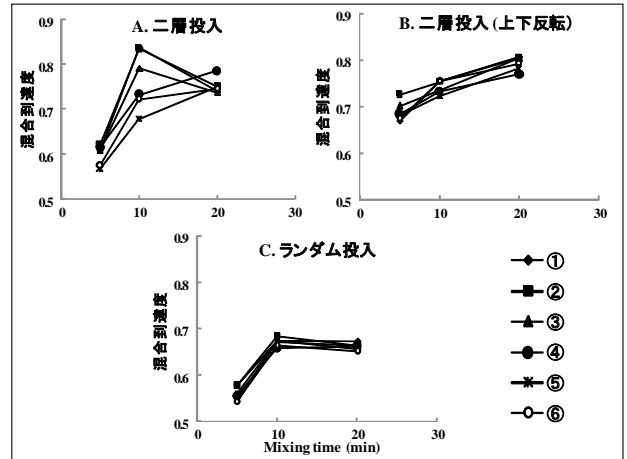
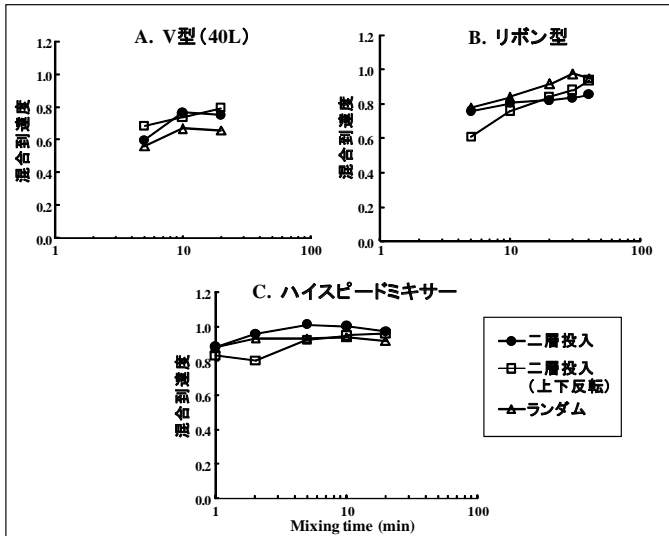


図8. 投入方法の違いによる各サンプリング箇所の混合到達度（V型（40L），材料：ベンガラと炭酸カルシウム）

図7. 投入方法の違いによる混合到達度（V型（40L），リボン型，ハイスピードミキサー 材料：ベンガラと炭酸カルシウム）

2) 材料の違いが均一性に与える影響（試料:ガラスビーズ，顆粒，顆粒粉砕品）

図9では、V型（5L）を用いた材料の違いによる標準偏差と混合到達率を示している（二層投入法）。混合到達率のグラフ（図9B）から、到達率が最も早く1に達するのは顆粒粉砕品（粒状粒子）であり、次いで顆粒（円柱状粒子）、ガラスビーズ（球状粒子）の順であった。また、サンプリング箇所別の含有率においても、同様の傾向が認められ、最もバラツキが少ないのは顆粒粉砕品であり、次いで顆粒、ガラスビーズの順であった（図10C）。

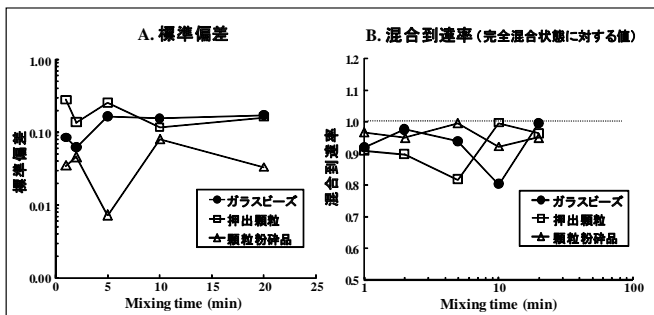


図9. 材料の違いによる標準偏差と混合到達率（V型（5L），投入方法：二層投入）

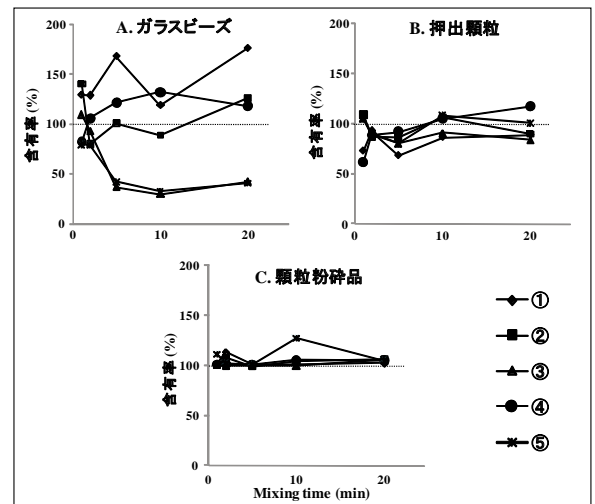


図10. 材料の違いによる各サンプリング箇所の含有率（V型（5L），投入方法：二層投入）

粒状、円柱状及び球状粒子それぞれについて、粒子同士を混合した場合、パーコレーションが起りやすい球状粒子に比べ、流動性の低い粒状や円柱状粒子の方が混合度は高くなることが報告されており⁴⁾、今回の実験でも同様の結果が確認された。特に、今回用いた顆粒粉碎品の粒子径 (D_{50} : 113 μm) はガラスビーズ (D_{50} : 214 μm) や顆粒 (D_{50} : 675 μm) と比較して小さかったため、混合中の偏析はもとより、サンプリング時の偏析も起こりにくかったと考えられる。

今回の実験で確認されたように、流動性の良い球形粒子は偏析が発生しやすいため、偏析の防止には粒子の球形度を低くするなど、流動性を低下させる方法が有効であると考えられる。

3) 混合機種の違いが均一性に与える影響

ベンガラと炭酸カルを用いて、V型 (40L) とリボン型による到達度の比較を行った結果、リボン型の混合到達度がV型 (40L) よりも短時間で高くなることが確認された (図11)。一般的に、容器回転式であるV型混合機に比べ、リボン型のような攪拌式混合機では、容器内部の攪拌羽根による剪断混合によって、材料の位置移動がスムーズに行われることが知られている。今回の実験において、このような混合機種の違いによる到達度の差を確認することができた。

また、図12では、二層投入法でのV型 (40L) とリボン型のサンプリング箇所別の到達度を比較しているが、各サンプリング箇所での到達度に大きな差は認められなかった。また、図には示していないが、二層投入法 (上下反転)、ランダム投入法の場合でも同様に差は認められず、偏析の発生は認められなかった。一般的に、リボン型ではシャフト周りで攪拌が弱いという現象も報告されているが、今回用いた混合材料 (ベンガラと炭酸カル) では均一に混合していたことが確認された。

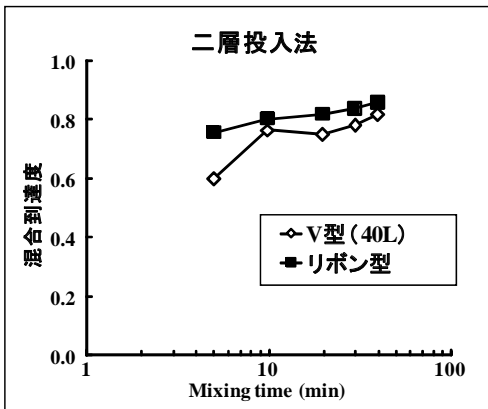


図11. 混合機種の違いによる混合到達度 (V型 (40L), リボン型 材料: ベンガラと炭酸カルシウム, 投入方法: 二層投入)

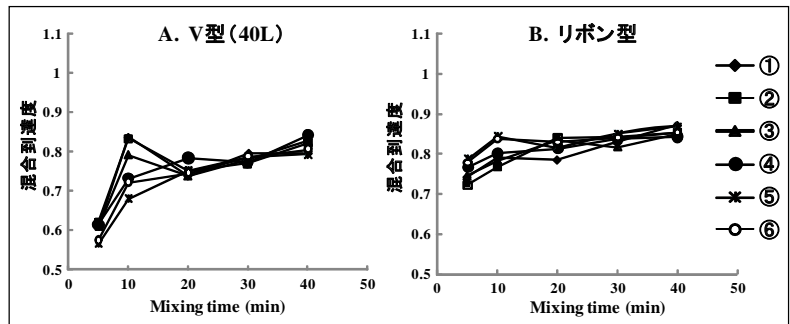


図12. 混合機種の違いによる各サンプリング箇所の混合到達度 (V型 (40L), リボン型 材料: ベンガラと炭酸カルシウム, 投入方法: 二層投入)

まとめ

今回の混合技術実習では、混合工程における重要なパラメータや混合特性についての理解を深めるため、投入方法や混合材料、及び混合機種の違いが均一性に与える影響についての検討を行った。その結果、以下の3点が実習で確認された。

- 1) V型混合機では、回転軸に対して水平方向の移動に時間がかかることから、投入方法を二層投入法とする方法が最も早く均一な状態に達する。
- 2) 混合する材料粒子の球形度が高く、粒子径や密度に差がある場合は偏析を起こす可能性が高い。
- 3) リボン型混合機は容器内部の攪拌羽根によって材料の位置移動がスムーズに行われるため、V型混合機よりも均一に達するまでの時間が早くなる。

また、今回の実習ではサンプリング位置を厳密に設定していなかったことや、サンプリング者を毎回固定してなかったことから、これが原因と思われるバラツキが一部のデータに認められた。次回の実習では、サンプリング位置を正確

にするため、サンプラーに目印を付けることや、サンプリング者を固定することにより、より正確な実験データを取れるように改善していきたい。

実習後に受講者に対し、実習内容の理解度や自社で取り入れたい技術についてアンケート調査を実施した。その結果によると、実習内容を「よく理解できた」と「大体理解できた」の合計が9割以上を占めており（図13）、ほぼすべての受講者に内容が理解できたものと考えている。また、自社で取り入れたい技術についての質問では、「V型混合機による二層投入法による仕込み」や「サンプリング時の量と箇所および数の考え方」を記載している受講者が多く、実習で得られた混合の知識を自社での製剤管理やバリデーションに活用してもらえると期待している。

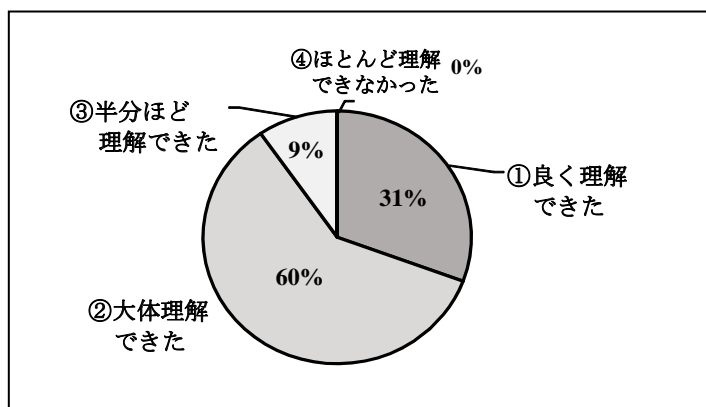


図13. 実習内容のアンケート調査結果

謝 辞

本実習は平成23年度富山県製造管理技術力向上支援事業（事業主体:社団法人富山県薬業連合会）の一環として実施した。また、本実習を実施するために講師の派遣及び装置の貸与をいただきました株式会社徳寿工作所様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 津田恭介ら，製剤工学，2, 80, 1976
- 2) 津田恭介ら，製剤工学，2, 189, 1976
- 3) 朝日正三ら，造粒事例と頻出Q&A集，10, 451, 2009
- 4) 津田恭介ら，製剤工学，2, 90-94, 1976

VI 誌上・学会発表など

1. 原著の抄録

家庭薬研究30, 31-43 (2011)

HPLC法の分析時間短縮化に関する検討 (第3報) — 生薬成分について —

富山県薬事研究会分析部会 — 生薬成分分科会 —

堀井周文, 安藤英広, 宇於崎智佳, 市井満美子, 金本美幸, 小此木明,
佐賀早苗, 崎久保由正, 士林智美, 永井喜美, 中林佐知栄, 中村直子,
宮田尚美, 横田洋一

高速液体クロマトグラフィーに使用するODSカラムを, 粒径 $5\mu\text{m}$ (径 4.6mm, 長さ 150mm) から粒径 $3\mu\text{m}$ (径4.6mm, 長さ 75mm) のものに変更することによる分析時間の短縮化について, 種々の粒径 $3\mu\text{m}$ カラムを用いて検討を行った. その結果, 定量値, 分離度及び再現性に問題なく日局使用のカラムと比べて分析時間が, マオウの総アルカロイド定量試験では, Unison UK-C18カラムを用いることにより1/2に, また, カンゾウ末のグリチルリチン酸の定量試験では, L-column ODSカラムを用いることにより約2/3に短縮されることがわかった.

家庭薬研究30, 44-51 (2011)

HPLCの移動相の代替溶媒に関する基礎的検討 — かぜ薬成分について —

富山県薬事研究会分析部会 — かぜ薬分科会 —

西川直志, 高嶋真由美, 堀田大介, 佐藤仁, 出口真裕, 沢西恵理, 有川千佳子,
石黒理恵子, 横田洋一

HPLCの移動相として汎用されているアセトニトリルの代替溶媒としてメタノールを用い, 粒径 $3\mu\text{m}$ (径4.6mm, 長さ 75mm) のODSカラムを用いてアセトアミノフェン等のかぜ薬成分の分析条件の検討を行った. その結果, アセトアミノフェン, カフェインおよびエテンザミドの分析においては, ODSカラムとしてHydrosphere C18及びInertsil ODS-SPを用い, 薄めたリン酸 (1→1000)/メタノール混液 (75:25) を移動相とした場合に比較的良好な結果が得られた. また, クロルフェニラミンマレイン酸塩, デキストロメトルファン臭化水素酸塩およびノスカピンの分析においては, ODSカラムとしてHydrosphere C18を用い, 移動層としてラウリル硫酸ナトリウムを薄めたリン酸 (1→1000) 溶液 (1→2000) /メタノール混液に2-プロパノールおよびテトラヒドロフランを添加したものを使用したところ, 分析時間が短縮の短縮が可能となりその分離も良好であった.

錠剤物性に影響を及ぼす滑沢剤混合と打錠操作の影響

富山県薬事研究会製剤部会

熊田俊吾, 成瀬真弓, 斉藤充弘, 松平直久, 山口裕隆, 福田大輔, 吉田健人,
坂木智昭, 成田梓, 岩田皓生, 横山慎一, 霧島武司, 利波真未子, 小泉晴佳,
長谷川雄一, 大谷桂, 永井秀昌, 明長良

製錠の良否を左右する工程として、打錠工程の他に造粒工程及び滑沢剤の混合工程が挙げられる。そこで、造粒方法の違いおよび滑沢剤の混合操作が錠剤物性に及ぼす影響について基礎的な検討を行った。その結果、攪拌造粒法による滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム1%添加）の混合時間が長くなると錠剤硬度は低下し、崩壊時間が延長した。とくに、混合開始後5分間が顕著であった。また、ステアリン酸マグネシウムの添加量が多くなるほど錠剤硬度は低下し、崩壊時間が延長した。攪拌造粒法と流動層造粒法とで錠剤物性に与える影響の差異を検討したところ、流動層造粒法によるものが、硬度が高く、崩壊時間も長くなった。

カンゾウの自然免疫抑制機構の解析

本田裕恵, 長井良憲, 高津聖志

免疫系と関連の深いと思われる漢方処方によく配合される13種の生薬について、in vitroにおける炎症性サイトカインTNF- α の産生量に与える影響を検討したところ、カンゾウエキスが優位にその産生を抑制した。また、カンゾウエキスの主成分であるグリチルリチン (GL) およびイソリクイリチゲニン (ILG) も同様に用量依存的に抑制した。また、in vivoにおいても、GLおよびILGはTLR4シグナルによって誘導されるTNF- α の産生を抑制した。さらに、TLR4のシグナル伝達に対する影響について検討を行ったところ、GLおよびILGはNF- κ Bの活性化を抑制することが明らかになった。

2. 講演・学会発表

「Molecular basis of regulatory effect of medicinal plant components on the innate immune response through TLR4 signaling」

本田裕恵, 高津聖志 他

「Molecular mechanisms of Th1-mediated antigen cross-presentation: roles of Iigp1 and ingenol」

高津聖志 他

22.5.7-11 The 97th Annual Meeting of the American Association of Immunologists (Baltimore, Maryland)

「シャクヤクの栽培研究」

村上守一

22.5.21 全国薬務主管課長協議会薬用植物調査部会 (上市町)

「西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (8) イチョウ葉製品の崩壊性について」

高橋敏, 寺崎さち子, 横田洋一 他

22.6.9-10 日本食品化学学会第16回総会・学術大会 (大阪市)

「天然薬物の免疫制御を活用した医薬品シーズの開発 -TGF- β の活性制御物質の探索」

高津聖志

22.7.1 第9回国際バイオEXPO (東京)

「お茶の効用について」

小笠原勝

2010.7.5 平成22年度富山市民大学「食と健康」(富山市)

「Restorative effects of poly (I:C) plus loxoribine against TGF-beta-induced suppression of cytolytic activity of splenocytes」

小笠原勝, 松永孝之, 高津聖志

「IFN- γ -inducible GTPase regulates T-cell-mediated antigen cross-presentation by antigen-presenting cells」

「B-1 cell lineage specification occurs between hematopoietic stem cell and prolymphocyte stages by differentiation environments」

「Analysis of mouse strain-dependent contact hypersensitivity: production of antigen-specific IgM antibodies by B-1 cells」

「Lnk/SH2B3, a gene associated with risk of several autoimmune diseases regulates proliferation and retinoic acid production of dendritic cells」

「Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4+ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection」

「The maintenance of gut-associated lymphoid tissues regulated by Lnk/Sh2B3 adaptor, a shared risk factor gene associated with type 1 diabetes and celiac disease」

「Participation of Bruton's tyrosine kinase in immune response to nasal influenza vaccination」

高津聖志 他

22.8.22-27 The 14th International Congress of Immunology (神戸市)

「天然薬物の免疫制御を活用した医薬品シーズの開発」

高津聖志

22.9.3 ほくりく健康創造クラスター成果発表会 (金沢市)

「免疫アジュバントと抗腫瘍免疫」

高津聖志

22.9.10 宮城県立がんセンター研究所特別セミナー（名取市）

『シャクヤク栽培研究を基にした栽培普及と「富山シャクヤク」ブランド化への取り組み』

田村隆幸

22.10.20 富山県試験機関長会研究員交流集会（富山市）

「HPLCの移動相の代替溶媒に関する基礎的検討 ―かぜ薬成分について―」

横田洋一 他

22.10.23 第12回富山県薬学会年会（富山市）

「県内製薬企業を対象とした分析データ信頼性確保事業」

寺崎さち子, 田村隆幸, 高橋敏, 横田洋一, 出町幸男

22.11.11-12 第47回全国衛生化学技術協議会年会（神戸市）

「和漢薬など天然資源に関する研究と実用化への展開」

小笠原勝

2010.12.17 農林水産・食品産業分野コーディネーター人材育成研修プログラム（仙台市）

「これからの薬用植物栽培」

村上守一

22.12.18 富山漢方会講演会（富山市）

「HPLC法の分析時間短縮化に関する検討（第3報） ―生薬成分について―」

「HPLCの移動相の代替溶媒に関する基礎的検討 ―かぜ薬成分について―」

横田洋一 他

「錠剤物性に及ぼす滑沢剤混合と打錠操作の影響」

永井秀昌, 明長良 他

「カンゾウの自然免疫抑制機構の解析」

本田裕恵, 高津聖志 他

23.2.10 第30回家庭薬開発研究シンポジウム（富山市）

「糖質吸収に対するラッカーゼ処理緑茶エキスの効果」

松永孝之, 小笠原勝, 高津聖志 他

23.3.28-31 日本薬学会第131年会（静岡市）

3. 共同研究論文リスト

- Yahagi A., Umemura M., Tamura T., Kariyone A., Begum M.D., Kawakami K., Okamoto Y., Hamada S., Oshiro K., Kohama H., Arakawa T., Ohara N., **Takatsu K.**, and Matsuzaki G.: Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4+ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. *Int. Immunol.*, **22**: 307-318, 2010.
- Shafiani S., Tucker-Heard G., Kariyone A., ***Takatsu K.**, and *Urdahl K.B.: Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J. Exp. Med.*, **207**: 1409-1420, 2010.
(*Corresponding authors)
- Ramachandra L., Qu Y., Wang Y., Lewis C.J., Cobb B.A., **Takatsu K.**, Boom W.H., Dubyak G.R., and Harding C.V.: Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing MHC-II molecules capable of antigen presentation. *Infect. Immun.*, **78**:5116-5125, 2010.
- Ahmed K., Wei Z., Zhao Q., Nakajima N., **Matsunaga T.**, **Ogasawara M.**, and Kondo T.: Role of fatty acid chain length on the induction of apoptosis by newly synthesized catechin derivatives. *Chemico-Biological Interactions.*, **185**:182-188 2010
- Murakami M., Okuyama Y., Ogura H., Asano S., Arima Y., Tsuruoka M., Harada M., Kanamoto M., Sawa Y., Iwakura Y., **Takatsu K.**, Kamimura D., and Hirano T.: Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J. Exp. Med.*, **208**: 103-114, 2011.
- Fujisaka S., I. Usui I., Kanatani Y., Ikutani M., Takasaki I., Tsuneyama K., Tabuchi Y., Bukhari A., Yamazaki Y., Suzuki H., Senda S., Aminuddin A., Nagai Y., **Takatsu K.**, Kobayashi M., and Tobe K.: Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high fat-fed mice. *Endocrinology*, **152**(5): 1789-1799, 2011.
- Otsubo, K., Kanegane H., Kamachi Y., Kobayashi I., Tsuge I., Imaizumi M., Sasahara Y., Hayakawa A., Nozu K., Iijima K., Ito S., Horikawa R., Nagai Y., **Takatsu K.**, Mori H., Ochs H. D., and Miyawaki T.: Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD4+CD25+CD127low) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Clin. Immunol.* In press, 2011.