

研 究 業 績

がん移植マウスモデルにおけるベツリンの 抗腫瘍メカニズムの解析

小笠原 勝, 松永 孝之, 長井 良憲¹, 高津 聖志

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

Mechanism of action of the anti-tumor effects of betulin.

Masaru OGASAWARA, Takayuki MATSUNAGA, Yoshinori NAGAI¹, Kiyoshi TAKATSU

¹Department of Immunobiology and Pharmacological Genetics,

Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for Research, University of Toyama

要 約

前報において、植物成分ベツリンが、ポリ (IC) により亢進した脾臓細胞の細胞傷害活性に対する TGF- β あるいは PGE₂ の抑制作用をいずれも解除することを報告した。ベツリンは抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、その作用機序はがん細胞増殖に対する阻害作用であると考えられている。そこで本研究では、がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍効果に免疫抑制解除作用が関与しているのかを検討した。B16F10細胞を皮下移植したマウスモデルを用いて、ベツリンの抗腫瘍効果を検討したところ、有意な抑制効果が得られることを確認した。免疫系への影響を検討するため、腫瘍内に浸潤した白血球の数を調べたところ、ベツリンの投与により約3倍に増加することが分かった。さらに詳細な解析から、この増加した白血球は、主にNK細胞、T細胞、マクロファージ、及び、好中球であることを明らかにした。これらのことから、ベツリンの抗腫瘍効果には腫瘍内に集積したこれら免疫細胞も関与していることが示唆された。

Summary

We have previously reported that betulin, a plant constituent, restored the reduced cytotoxicity of splenocytes caused by TGF- β or PGE₂. Betulin has been reported to exhibit an antitumor effect, their mechanism of action is believed to be an inhibitory effect on cancer cell proliferation. In this study, we examined whether the restorative activity of betulin is involved in its anti-tumor effect in a tumor-burden mice model. It was confirmed that betulin exhibited the antitumor effect in a mouse model subcutaneously inoculated with B16F10 melanoma. To reveal the effects of betulin on the anti-tumor immune system, the number of leukocytes accumulated in tumor tissues was examined, and found to increase to approximately 3-fold by administering of betulin. The more detailed analysis clarified that this increased leukocytes were mainly NK cells, T cells, macrophages, and neutrophils. From these observations, the antitumor effect of betulin is suggested to include the killing activity to tumor cells of these immune cells accumulated into tumor tissues.

キーワード: ベツリン; 悪性黒色腫; TGF- β ; PGE₂; 免疫抑制

Key words: Betulin; melanoma; TGF- β ; PGE₂; immunosuppression

がんの三大療法に次ぐ新しい治療法として、がん免疫療法が積極的に臨床応用されている。しかし、多くの場合当初期待されたほどの高い治療効果が得られていない¹⁾。近年、その主な原因の一つは、がん細胞由来の免疫抑制因子 (TGF- β , PGE₂ 等) による免疫機能の低下であることがわかってきた。そのため、がん免疫療法の効果を増強するには、免疫抑制因子の作用を阻止する薬剤が必要と考えられている²⁾。本研究ではこれまで、先行している研究開発との差別化、より有効性の高い薬剤の開発を目指し、TGF- β に加えてPGE₂の抑制作用も解除できる化合物を約800種の天然物等からスクリーニングし植物成分のベツリンに有効性を見出した³⁾。

ベツリンは主に白樺の樹皮に含まれる成分であり、これ

まで抗ウイルス活性や抗炎症作用、最近では生活習慣病に対する有効性など様々な生物活性について報告がなされている⁴⁾。とりわけ、がん細胞の増殖能に対する阻害作用について多数の報告がなされており、増殖阻害活性に基づく抗がん剤としての開発が期待されている^{5, 6, 7, 8, 9)}。また、最近では、ベツリンを γ -シクロデキストリン誘導体と複合化してマウスに投与することで、がん皮下移植マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果が得られることも報告されている¹⁰⁾。しかし、ベツリンの免疫抑制解除作用が、がん移植マウスモデルにおいて認められるベツリンの抗腫瘍効果にどの程度寄与しているのかについては明らかにされていない。

本研究では、TGF- β あるいはPGE₂による免疫抑制を

伴うことが報告されているマウス悪性黒色腫（B16F10細胞）の皮下移植モデルを用いて^{11, 12)}、ベツリンの抗腫瘍効果及びその作用機序を免疫系に着目して検討した。

実験方法

1. 実験試薬

ベツリンはExtrasyntheseより購入し、試験管内の実験ではジメチルスルホキシドに溶解して実験に供し、マウスに投与する場合は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。LY2157299（TGF- β 受容体タイプ I 阻害剤）あるいはNS-398（COX-2阻害剤）は、それぞれSellechem, 和光純薬から購入し、0.1% Tween 80を含むPBSに懸濁して実験に供した。

2. 細胞及び細胞培養

マウスB16F10悪性黒色腫細胞は、涌沢伸哉先生（北陸大学）より恵与された。細胞は、10%の非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、0.1 mg/mlのストレプトマイシン及び55 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

マウス悪性黒色腫細胞（B16F10）を 2×10^5 個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス（8週令、雌、8-10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）。腫瘍径は2日

あるいは3日ごとに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 \times 短径 \times 短径/2で算出した。

4. 細胞毒性の評価

10%FBSを含むDMEM培地（GIBCO）でB16F10細胞を 4×10^4 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 $^{\circ}$ 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。

5. がん組織に集積した免疫細胞の解析

マウス悪性黒色腫細胞（B16F10）を 2×10^5 個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス（8週令、雌、3~6匹/群）にマウス当たり0.05 mlずつ下腹部皮下に接種した。がん接種後2日目から9日目まで1日1回、ベツリンをマウス当たり150 nmolの用量で腫瘍内に投与した。対照群には溶媒（0.1% Tween 80を含むPBS）を同様に投与した。がん組織は、がん接種後3日目、実験によっては6日目、あるいは、10日目に採取した。採取したがん組織を1 mg/mlコラゲナーゼA（ロシュ）及び200 U/ml DNase I（Sigma）で処置（37 $^{\circ}$ C, 30分間）し、ハサミで細切後、ナイロンフィルター（70 μ mポアサイズ）（Falcon）を通してデブリスを除去した。遠心（1500 rpm, 10 min）後、上清を除去し、得られた細胞を 10^5 個/mlとなるように調製した。細胞を抗CD16/32抗体（2A2G2）で処置（1.5 μ g/ml, 4 $^{\circ}$ C, 15 min）しFc受容体をブロックした後、各

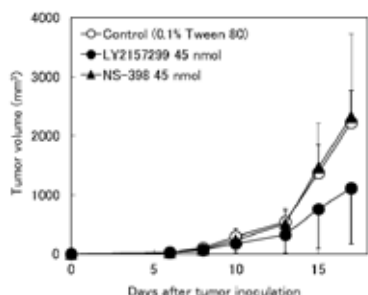


Fig. 1 Effects of LY2157299 or NS-398 on the growth of B16 melanoma in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. LY2157299 or NS-398 was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week. The data are expressed as mean \pm S.D. of 8 mice.

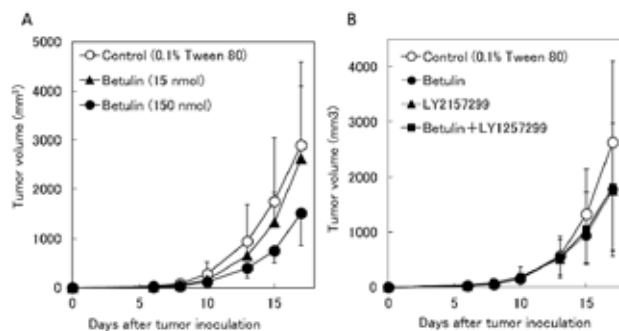


Fig. 2 Effects of betulin alone or the combination of betulin and LY2157299 on the growth of B16 melanoma in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. (A, B)betulin, LY2157299, or their mixture was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week. The data are expressed as mean \pm S.D. of 8-10 mice.

種の蛍光色素で標識された抗CD19抗体 (1D3), 抗CD3e抗体 (145-2C11), 抗NK1.1抗体 (PK136), 抗CD11b抗体 (M1/70), 抗Gr-1抗体 (RB6-8C5), 抗CD11c抗体 (HL3), 抗CD45抗体 (30-F11), 抗siglec-F抗体 (E50-2440) で処置 (0.25-1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 0.5時間) 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.

結 果

がん皮下移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍効果

ベツリンの抗腫瘍効果を評価するに当たり, まず, 用いるがん移植モデル系にTGF- β あるいはPGE₂が関与することを確認するため, LY2157299 (TGF- β 受容体タイプ I 阻害剤) あるいはNS-398 (COX-2阻害剤) の影響を検討した (Fig. 1). その結果, LY2157299の投与によりがん移植17日目において約50%の抑制効果が認められた. このことから, 本研究で用いるがん移植モデル系にはTGF- β が腫瘍増殖に対して促進的に関与していることが確認された. 一方, NS-398は腫瘍増殖に影響を与えなかったことから, PGE₂の関与は少ないと考えられた.

当該皮下移植モデルを用いて, ベツリンの抗腫瘍効果を検討した (Fig. 2A). 腫瘍移植後2日目より16日目まで連日腫瘍内に投与したところ, 投与量に依存した抑制効果が認められ, 150 nmolの投与量では, がん移植17日目において約45%の抑制効果が認められた. また, ベツリンの抗腫瘍効果にTGF- β の作用に対する抑制効果が寄与しているかを推察するため, LY2157299とベツリンの併用効果について検討した (Fig. 2B). その結果, ベツリン, LY2157299ともに, いずれも単独では抑制作用を示した

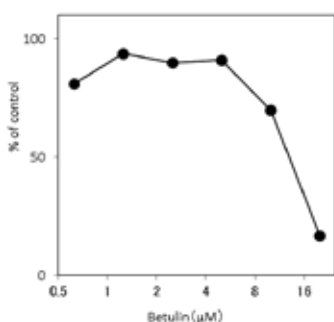


Fig. 3 Effects of betulin on the in vitro proliferation of B16 melanoma cells.

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

が, 両者を併用しても抑制効果は全く増強されなかった. このことから, ベツリンの抗腫瘍効果にはTGF- β の抑制作用に対する解除効果が関与している可能性が示唆された.

がん細胞の増殖能に対するベツリンの抑制作用

Fig. 2Bの結果から, ベツリンの抗腫瘍効果にTGF- β の抑制作用に対する解除効果の関与が示唆されたが, その一方で, ベツリンは様々ながん細胞に対して細胞増殖阻害作用を示すことが報告されている. このことから, Fig. 2Aで認められたベツリンの抗腫瘍効果に, がん細胞増殖に対する阻害作用が寄与している可能性もある. そこで, 試験管内でのB16F10細胞の増殖能に与えるベツリンの影響を検討した. その結果, ベツリンは濃度に依存した阻害作用を示し, 50%阻害濃度は13.0 μM であった. このことから, ベツリンの抗腫瘍効果には, TGF- β の抑制作用に対する解除効果に加えて, これまでに報告されているように, がん細胞の増殖能に対する阻害作用も寄与していると考えられた.

ベツリンの投与部位への白血球の集積

TGF- β は腫瘍局所において抗腫瘍免疫応答を負に制御していることが報告されている²⁾. したがって, Fig. 2Bの結果から推察されたように, ベツリンの抗腫瘍効果にTGF- β の抑制作用に対する解除効果が寄与しているならば, 腫瘍局所での免疫応答にベツリンが何らかの影響を与えている可能性がある. そこで, 腫瘍局所での白血球

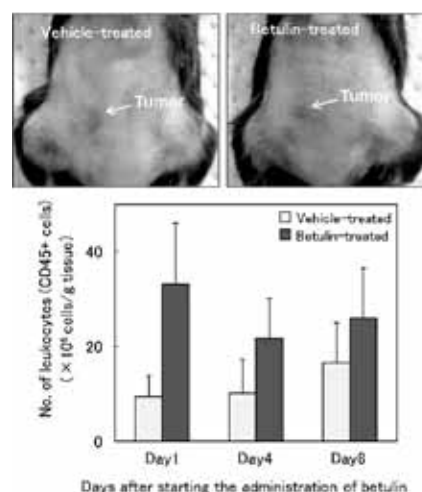


Fig. 4 Accumulation of leukocytes to the site of administration of betulin in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice. Betulin was intratumorally administered for 1 to 8 consecutive days starting 2 days after tumor inoculation. On day 1, 4, or 8 of post of the initial injection of betulin, leukocytes accumulated in tumor sites were analyzed as CD45 positive cells in a flow cytometer. The data are expressed as mean \pm S.D. of 3-9 mice.

数に及ぼすベツリンの影響を検討した (Fig. 4). ベツリンを腫瘍内に投与したところ, 肉眼的には明らかな影響は認められなかったが, 腫瘍局所での白血球数はベツリンの投与により増加することが分かった. とりわけ, ベツリンの投与の翌日 (day 1) において, 腫瘍内に浸潤した白血球の数は対照群に比較して約3倍に増加した. そこで, この増加した白血球が何であるのかを明らかにするため, フローサイトメトリーを用いて各種免疫細胞について解析した (Figs. 5及び6). Fig. 5に示すように, NK細胞について解析したところ, ベツリンの投与により腫瘍内に浸潤した全白血球の数に占める割合及び絶対数が増加するとともに, CD69陽性の活性化NK細胞の数も増加した. また, ベツリンの投与の翌日 (day 1) において, 腫瘍内に浸潤したT細胞あるいはマクロファージの数は対照群に比較して約2倍に増加し, 好中球数は約3倍に増加することが分かった (Fig. 6). 一方, 好酸球の数には明らかな影響は認められなかった. これらのことから, ベツリンの抗腫瘍効果には, これら腫瘍内に集積したNK細胞, T細胞, マクロファージ, 好中球も関与していることが示唆された.

考 察

我々はこれまでに, 脾臓細胞のNK活性を指標としてTGF- β あるいはPGE₂の抑制作用を解除する天然化合物

を探索し, 白樺樹皮成分のベツリンに有効性を見出している³⁾. 本研究では, ベツリンの免疫抑制解除作用が担がんマウスモデルにおいて認められるベツリンの抗腫瘍効果に関与しているのかについて検討した. 研究を遂行するに当たり, 担がんマウスモデルとしてどのモデルを用いるかが重要であったが, ベツリンの抗腫瘍効果がメラノーマの皮下移植モデルにおいて報告されていること¹⁰⁾, ベツリンがB16F10細胞を皮下移植したマウスモデルにおいて免疫賦活剤と抗癌剤との併用効果を増強すること¹³⁾, 及び, 同細胞の皮下移植モデルにTGF- β あるいはPGE₂の関与が報告されていることから^{11, 12)}, 本研究ではB16F10細胞の皮下移植モデルを用いることとした. まず, 当該細胞の皮下移植モデルにおけるTGF- β あるいはPGE₂の関与を確認するため, TGF- β 受容体タイプI阻害剤あるいはCOX-2阻害剤の影響を検討した. その結果, TGF- β 受容体タイプI阻害剤では有意な抑制効果が認められた. また, 試験管内でのB16F10細胞の増殖はTGF- β 受容体タイプI阻害剤 (SB431542) では阻害されなかったことから (データ省略), B16F10細胞を移植した局所ではTGF- β が免疫抑制的に関与していると考えられた. そこで, このモデルを用いて, ベツリンを腫瘍局所に投与した際の抗腫瘍効果について検討したところ, 腫瘍増殖は有意に抑制されることが分かった. さらに, ベツリンとTGF- β 受容体タイプI阻害剤の併用効果を検討したところ, 併用による抗腫瘍効果の増強は全く認められなかった. もし

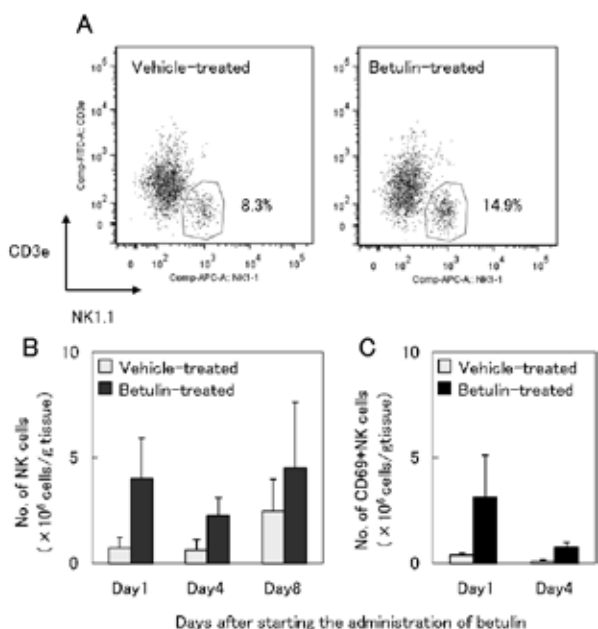


Fig. 5 Increase of NK cells in the accumulated leukocytes to the site of administration of betulin in mice.

Population of NK cells in the leukocytes accumulated in tumor sites as shown in fig. 4 were evaluated in their ratio to total leukocyte (A), the absolute cell number (B), and the absolute number of CD69+ NK cells (C) by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm S.D. of 3-9 mice.

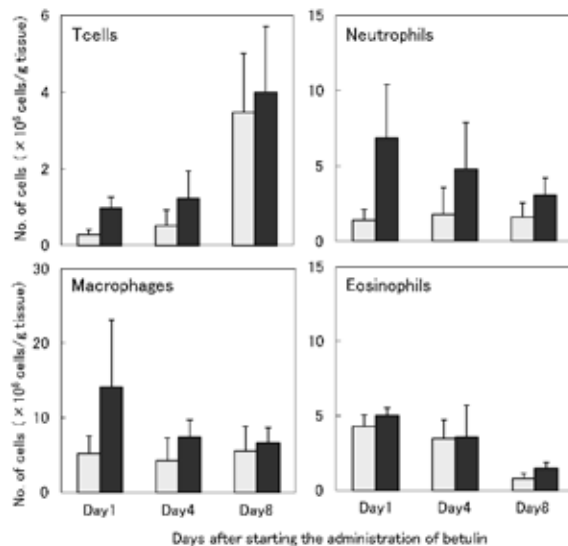


Fig. 6 Comparison of the cell number of each immune cell accumulated to the site of administration of betulin in mice.

The absolute cell number of each immune cell in the leukocytes accumulated in tumor sites as shown in fig. 4 were evaluated by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm S.D. of 3-9 mice.

文 献

ベツリンの作用機序が同阻害剤と異なれば、両者の併用により抗腫瘍効果は各々単独よりも強くなると予想されたが、併用しても増強効果は認められなかったことから、ベツリンの作用にはマウス個体レベルにおいてもTGF- β の抑制作用に対する解除効果が寄与している可能性が考えられた。このことを別の視点から検証するため、ベツリンを腫瘍内に投与した際の投与部位における免疫細胞の動態について検討した。ベツリンはNK活性を指標とした評価系から見出された化合物であることから、まず、NK細胞について解析を進めた。その結果、ベツリン投与群では腫瘍内におけるNK細胞の割合及び絶対数が増加し、さらに、CD69陽性の活性化NK細胞の数も明らかに増加することが分かった。TGF- β がNK細胞の活性化や遊走を制御することを考えると^{14, 15)}、ベツリンの投与により活性化NK細胞が増加したことは、ベツリンがTGF- β の抑制作用を解除していることを示唆する。また、ベツリンの投与によりT細胞の集積も亢進した。TGF- β はT細胞の遊走に関与するケモカインの産生を阻害することから¹⁶⁾、このことから、ベツリンの免疫抑制解除作用の寄与が示唆される。既報のとおり¹⁷⁾、TGF- β により抑制されたNK活性を指標とした試験管内での解析では、ベツリンの作用にはNK細胞に加えて、樹状細胞、T細胞、及びB細胞が重要であることが分かっているが、その作用機序の詳細は不明である。しかし、本研究で示したように、ベツリンの投与部位にNK細胞やT細胞などが集積することを考えると、その部位ではCCL4やCCL5などのケモカインの産生が誘導されていると予想される。特にCCL5はTGF- β により産生が抑制されることから¹⁶⁾、その関与が推察される。一方、免疫系に及ぼすベツリンの影響として、最近、ベツリンが、①骨髄由来樹状細胞からのトル様受容体4刺激によるIL-12産生を増強すること、また、②OT-1マウス由来の脾臓細胞をトル様受容体4刺激下でOVA抗原を加えた際に誘導されるIL-2及びIFN- γ の産生を増強することが報告された¹⁸⁾。IL-12はNK細胞を強力に活性化すること、また、IL-2及びIFN- γ は抗原抗体反応により活性化したCD8陽性T細胞から分泌されることを考えると、ベツリンの抗腫瘍効果にこれらサイトカインの産生増強作用が関与している可能性も考えられる。今後、これらのケモカインやサイトカインの産生についても解析を進め、ベツリンの抗腫瘍メカニズムの詳細を明らかにしていく予定である。

謝 辞

本研究はJSPS科研費24590109の助成を受けて実施された。

- 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) 小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (2), 富山県薬事研究所年報, **39**, 21-25 (2012)
- 4) Tang J.J., Li J.G., Qi W., Qiu W.W., Li P.S., Li B.L., Song B.L.: Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.*, **13** (1), 44-56 (2011)
- 5) Jonnalagadda S.C., Corsello M.A., Sleet C.E.: Betulin-betulinic acid natural product based analogs as anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **13** (10), 1477-1499 (2013)
- 6) 国際公開第02-009719号
- 7) 特開2005-330261号公報
- 8) 特開平1-14832号公報
- 9) Xu W., Zhu C., Cheng W., Fan X., Chen X., Yang S., Guo Y., Ye F., Shi J.: Chemical Constituents of the Roots of *Euphorbia micractina*. *J. Nat. Prod.*, **72** (9), 1620-1626 (2009)
- 10) Soica C., Dehelean C., Danciu C., Wang H.M., Wenz G., Ambrus R., Bojin F., Anghel M.: Betulin complex in γ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in in vitro and in vivo tumor models. *Int. J. Mol. Sci.*, **13** (11), 14992-15011 (2012)
- 11) Penafuerte C., Galipeau J.: TGF beta secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol. Immunother.*, **57** (8), 1197-1206 (2008)
- 12) Parhar R.S., Lala P.K.: Amelioration of B16F10 melanoma lung metastasis in mice by a combination therapy with indomethacin and interleukin 2. *J. Exp. Med.*, **165** (1), 14-28 (1987)
- 13) 小笠原勝, 宮本 (山口) 朋美, 松永孝之, 長井良憲, 高津聖志: がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍効果に関する検討, 富山県薬事研究所年報, **41**, 17-20 (2014)
- 14) 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)

- 15) Castriconi R., Dondero A., Bellora F., Moretta L., Castellano A., Locatelli F., Corrias M.V., Moretta A., Bottino C.: Neuroblastoma-derived TGF- β 1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. J. Immunol., **190** (10) , 5321-5328 (2013)
- 16) Hu S., Chao C.C., Ehrlich L.C., Sheng W.S., Sutton R.L., Rockswold G.L., Peterson P.K. Inhibition of microglial cell RANTES production by IL-10 and TGF-beta. J. Leukoc. Biol., **65** (6) , 815-21 (1999)
- 17) 小笠原勝, 山崎 (屋敷) 思乃, 宮本 (山口) 朋美, 生谷尚士, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (3), 富山県薬事研究所年報, **40**, 22-26 (2013)
- 18) Pfarr K., Danciu C., Arlt O., Neske C., Dehelean C., Pfeilschifter J.M., Radeke H.H.: Simultaneous and dose dependent melanoma cytotoxic and immune stimulatory activity of betulin. PLoS One., **10** (3) , e0118802 (2015)

酸化ストレス誘発マウスの脂質過酸化に対する シャクヤク成分の効力比較

松永 孝之, 田村 隆幸, 横田 洋一, 川筋 透

Comparative Potency of peony components on the lipid peroxidation in oxidative stress-induced mouse

Takayuki MATSUNAGA, Takayuki TAMURA, Yoichi YOKOTA and Toru KAWASUJI

要 約

鉄キレート化合物を投与した酸化ストレスモデルの脂質過酸化を指標に、4種シャクヤク成分の改善効果を比較検討した。その結果、ペンタガロイルグルコースは、100mg/kgの高用量の投与でも過酸化脂質の生成に変化はなかったが、没食子酸では高用量で血中及び腎臓中の過酸化脂質生成が有意に抑制された。また、没食子酸誘導体である没食子酸メチルでは、腎臓中の過酸化脂質生成が抑制されたが、カテキンでは有意な変化は認められなかった。さらに、シャクヤクエキス1g/kg投与時にも血中及び腎臓中の過酸化脂質の生成を抑制する傾向が認められた。

以上の結果から、シャクヤクエキスに含まれる成分に酸化ストレスの動物モデルに対する有用性が示されたが、エキス中の成分含有率から考慮すると単一成分による効果では説明出来ないと思われる。

Summary

Antioxidative potency of 4 components contained in peony root was compared with the degree of lipid peroxidation in mice treated with iron chelating agent as oxidative stress model. Pentagalloylglucose had no effect on the formation of lipid peroxide in this model even when administered with high dosing of 100mg/kg, but, high dose of gallic acid significantly inhibited the formation of them in blood and kidney. And, methyl gallate inhibited the lipid peroxidation only in kidney, but catechin had no effect. Furthermore, peony root extract had the tendency to inhibit the lipid peroxidation in this model.

These results suggest that some components in peony root exert the improvement in oxidative stress model, but this effect appear to be due to the blend effect of some components.

キーワード: ペンタガロイルグルコース, 没食子酸, 没食子酸メチル, カテキン, 酸化ストレスモデル
Keywords: Pentagalloylglucose, Gallic acid, Methyl gallate, Catechin, Oxidative stress model

活性酸素は、正常な生体反応に際しても発生するが、反応性が高いため厳密に制御されている。しかし、老化や種々の要因により活性酸素の発生制御が不十分になると酸化ストレスとなって生体成分に障害を与え、種々病気の発症原因になるとされている¹⁾。そのため、抗酸化成分を摂取することにより酸化ストレスを抑制し、病気の発症を予防することが期待される。天然物に含まれるポリフェノールなどの天然成分には、抗酸化作用のあることが報告されており、これらの摂取による病気予防との関連性が指摘されている^{1, 2)}。

先に、我々は安定ラジカル還元能を指標にした評価系において、シャクヤクエキス及びそれらに含まれる数種成分に抗酸化作用のあることを報告した³⁾。また、鉄キレート剤投与による酸化ストレスの動物モデルを作成し、過酸化脂質生成を指標に抗酸化能を有する天然物の有効性を評価することが出来ることを示した⁴⁾。今回、シャクヤクエキスに含まれる数種成分について、酸化ストレス病態モデルを用いて有効性を評価した。

実験方法

1. 試薬

本試験で用いた主な試薬は、ニトリロ三酢酸Na (Fe-NTA)、没食子酸一水和物及び没食子酸メチル (以上、和光純薬)、カテキン (東京化成) 及びペンタガロイルグルコース (PGG, Cayman chemical) である。これらの化合物は、蒸留水または0.5%カルボキシメチルセルロースに加温しながら溶解または懸濁して試験に供した。

2. シャクヤクエキスの調製

本試験で用いた梵天 (4年物, 平成25年10月収穫) の根部のエキスは、既報⁵⁾に従い調製したものを試験に供した。

3. 動物

本試験で用いたマウス (Balb/c, 雄性, 6週令) は、三協ラボサービスより購入し、予備飼育後7-9週目に試験に供した。

4. Fe-NTA投与酸化ストレスマウスを用いた抗酸化能の測定

一晚絶食したマウスに鉄キレート化合物であるFe-NTA溶液投与前の4時間及び30分前の2回被検液を経口投与し、その後Fe-NTA溶液 (Fe相当量, 5 mg/kg) を腹腔内投与した。1時間後にマウスをインフルラン麻酔下で解剖し、下大静脈より採血した後腎臓を摘出した。血液を遠心分離して得た血漿及び腎臓は、過酸化脂質の定量に供した。なお、Fe-NTA溶液は、前報⁴⁾に従いFe相当量0.5mg/mlに調製して試験に供した。

5. 血中及び腎臓中の過酸化脂質の定量

血中及び腎臓中の過酸化脂質は、チオバルビツール酸を用いた方法により各々蛍光法及び比色法により定量した⁴⁾。

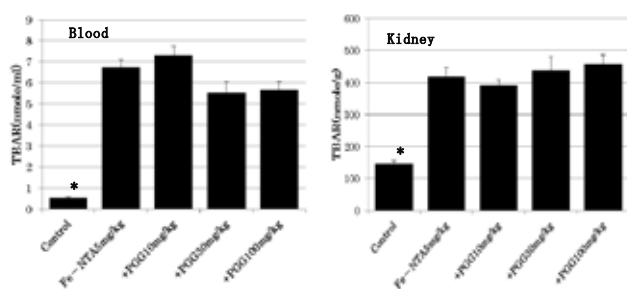


Fig. 1 Effect of pentagalloylglucose on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of pentagalloylglucose 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

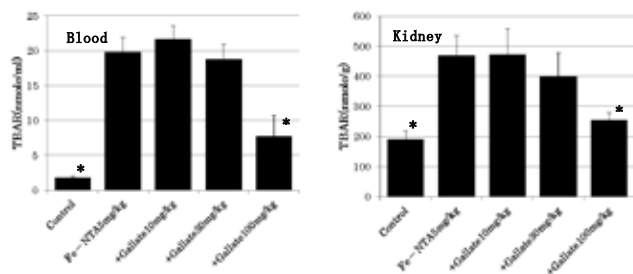


Fig.3 Effect of gallic acid on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of gallic acid 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

6. 統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、One-way-ANOVAとDunnett's testによる多重比較を用いて行い、有意水準は5%とした。また、表の測定値の有意差検定は、Student's t-testにより行った。

実験結果

1. 酸化ストレス誘発マウスに対するPGG及びカテキンの効果

Fe-NTA投与により誘発した酸化ストレスマウスにおける脂質過酸化を指標に、PGG及びカテキンの効果を検討した。その結果、腎臓中の過酸化脂質の生成は、Fe-NTA投与により約3倍に上昇したが、PGG100mg/kgの投与においても有意な変化は見られなかった。また、血中の過酸化脂質は、Fe-NTA投与により約12.7倍に上昇したが、

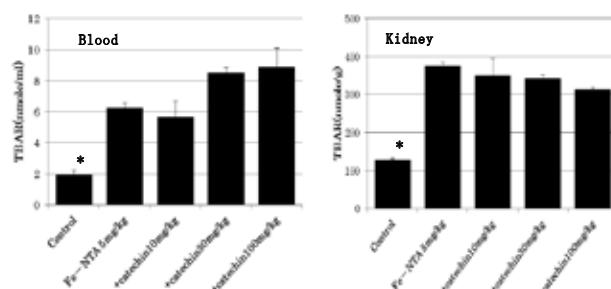


Fig.2 Effect of catechin on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of catechin 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

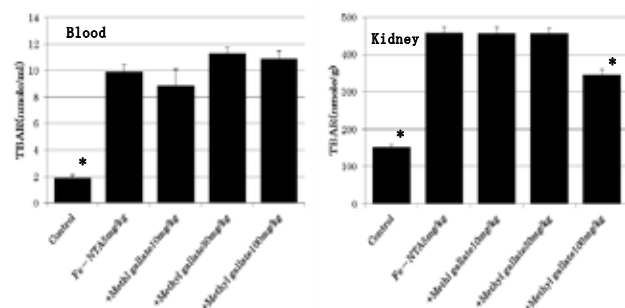


Fig.4 Effect of methyl gallate on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of methyl gallate 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

PGG30及び100mg/kgの投与時には若干の減少傾向を示すのみであった (Fig. 1). 一方, カテキン100mg/kgの投与時においても, 腎臓中及び血中の過酸化脂質の生成には有意な変化は認められなかった (Fig. 2).

2. 酸化ストレス誘発マウスに対する没食子酸及び没食子酸メチルの効果

次に, 同モデルを用いて没食子酸及び没食子酸メチルの効果を検討した. その結果, 没食子酸100mg/kg投与時には, 腎臓中及び血中の過酸化脂質の生成が有意に抑制された (Fig. 3). 一方, 没食子酸メチルの場合は, 高用量の投与時において腎臓中の過酸化脂質生成が抑制された (Fig. 4).

3. 酸化ストレス誘発マウスに対するシャクヤクエキスの効果

次に, 薬用のシャクヤクとしてとして汎用されている梵天エキスについて, 酸化ストレスの動物モデルに投与して有効性を評価した. その結果, エキス1g/kgを経口投与した場合, 血中の過酸化脂質生成が有意に抑制された. また, 腎臓中の過酸化脂質においても低下傾向が認められた (Table).

考 察

天然物には活性酸素の消去能を有する化合物が多く知られているが, 試験管レベルで効力比較をなされている例が多い. 先に, 我々はシャクヤクエキス及びその中に含まれる代表的な成分の抗酸化能を試験管レベルで検証した結果, シャクヤクの品種及びそれぞれの成分ごとに効力に差のあることを報告した³⁾. 今回, 抗酸化性物質の評価系として有効であると既に報告している鉄キレート剤投与による酸化ストレスモデル⁴⁾を用いて, シャクヤクの代表品種である梵天のエキス及びシャクヤク含有成分について有効性を評価した.

今回用いた梵天エキスのジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) 還元能は, 22.9 μ g/mlと先に報告した平成21

年度収穫の梵天の34.6 μ g/ml³⁾より強いことを確認している. このエキスを1g/kg2回投与した時, 酸化ストレスマウスにおける血中の過酸化脂質生成が有意に抑制された. また, 腎臓中の過酸化脂質生成も抑制傾向が認められた. シャクヤクエキスには, 虚血に対する心筋保護作用⁶⁾や糖尿病に伴う腎障害⁷⁾に対して予防効果を示すことが報告されており, その作用機序として活性酸素の消去能及び生体内の抗酸化酵素の維持・活性上昇が関与することが指摘されている. 今回用いた梵天エキスには, 抗酸化成分としてよく知られているPGGの他, 没食子酸及びそのメチル体, そしてカテキンが含まれることが既に報告⁵⁾されており, 今回認められた酸化ストレスに対する保護効果は, これらの抗酸化成分に起因するものと考えられる.

そこで, シャクヤクエキスに含まれる4種の抗酸化性成分の酸化ストレスモデルに対する有効性を検討した. その結果, DPPH還元能の最も強かったPGG100mg/kg投与では脂質過酸化に対して有意な変化は認められず, 血中の過酸化脂質生成が高用量で若干の抑制傾向が認められるのみであった. また, 4種の抗酸化成分の中では効力が最も低いカテキン100mg/kg投与でも有意な変化は認められず, 高用量で腎臓中の過酸化脂質生成が若干抑制される傾向が, また, 血中では若干増加する傾向が認められた. PGGが, 試験管内では比較的強い抗酸化能を有することはAbdelwahedら⁸⁾も報告しているが, 特に, 動物に経口投与した場合のバイオアベイラビリティは悪いことが示唆されており, 水に対する難溶性及び消化管粘膜での代謝などに起因することが推察されている⁹⁾. このため, 生体に投与した場合には活性酸素の消去能が減弱したものと考えられる. また, カテキンについては, ヒトや動物で吸収される事が報告されおり¹⁰⁾, 今回, 有意な効果が見られなかったのは, 投与量が低かったこと, あるいは代謝による効果減弱などが考えられる. さらに, カテキンには, 濃度によっては活性酸素消去能あるいは活性酸素生成の促進効果の相反する作用を示す場合が知られており, このことも関与しているかもしれない^{11, 12)}.

次に, 没食子酸及びそのメチル体の酸化ストレスモデ

Table Effect of peony extract on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

	Dose	Blood	Kidney
		TBAR(nmole/ml)	TBAR(nmole/g)
Control		2.01 \pm 0.39 ^{***}	245 \pm 12.4 ^{***}
Fe-NTA	5mg/kg(Fe)	18.1 \pm 1.10	588 \pm 26.8
+Bonten extract	1g/kg	14.8 \pm 0.35 ^{**}	530 \pm 7.05

Mice were administered perorally with Bonten extract(1g/kg) 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each value shows the mean + SE of 5 mice.

,*:Significantly different from Fe-NTA at p< 0.01, 0.001

ルに対する効果を検討した。既報³⁾で、試験管内における没食子酸の抗酸化能は、没食子酸メチルに比べて約1.5倍強く、今回の動物モデルにおいても、血中及び腎臓中の過酸化脂質生成を100mg/kg投与時に有意に抑制した。また、メチル体では、腎臓中の過酸化脂質生成のみ抑制された。没食子酸は、比較的水に可溶であり、ラットではあるが経口投与後すみやかに吸収され、100mg/kg投与時には、静脈血中の没食子酸濃度は投与後3時間までは1 µg/ml以上の濃度が維持されることが報告されている¹³⁾。マウスでも同様の体内動態、血中濃度変化と想定すれば、試験管内の効力から考えると十分な抗酸化能を発現しているものと推察される。一方、没食子酸メチルは、抗酸化能が弱く、また、没食子酸に比べて疎水性であるため、血中及び腎臓中の局在濃度に違いがあると思われる。ことが有効性の差の原因の一つであるとも考えられる。抗酸化剤として食品添加物として利用されている没食子酸プロピルは、肝細胞のエステラーゼにより分解され、没食子酸を生成することが報告されている¹⁴⁾。没食子酸メチルにおいても、吸収された後肝臓において没食子酸に変換されることが考えられるが、吸収効率に差がある可能性もあると思われる。

今回、シャクヤクエキスに含まれる抗酸化成分4種の酸化ストレス動物モデルを用いて有効性を評価した結果、没食子酸及びそのメチル体100mg/kg投与時に過酸化脂質生成が抑制されることが明らかとなった。今回調べた梵天エキス中の両成分の含有率は各々0.17%及び1.24%であり、マウスへのシャクヤクエキス1g/kgの投与で認められた酸化ストレスの抑制効果は、これらの成分のみでは効果を説明できないものと思われる。酸化ストレスモデルに対するシャクヤクエキスの改善効果は、エキスに含まれる抗酸化性の多成分による複合効果あるいは未検出成分に起因するものと推察される。

参考文献

- 1) 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)
- 2) フリーラジカルと和漢薬 (奥田拓男, 吉川敏一編集), 国際医書出版 (1990)
- 3) 松永孝之, 横田洋一, 田村隆幸, 田中彰男: 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, 富山県薬事研究所年報, **38**, 17-20 (2011)
- 4) 松永孝之: 酸化ストレス病態動物における抗酸化物質の効力の比較検討, 富山県薬事研究所年報, **40**, 17-21 (2013)
- 5) 横田洋一, 高橋敏, 寺崎さち子, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別成分分析 (1), 富山県薬事研究所年報, **39**, 61-68 (2012)
- 6) Luo, C., Wang, H., Chen, X., Cui, Y., Li, H., Long, J., Mo, X. and Liu, J.: Protection of H9c2 rat cardiomyoblasts against oxidative insults by total paeony glucosides from Radix Paeonia Rubrae, *Phytomed.*, **21**, 20-24 (2013)
- 7) 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, *Phytomed.*, **17**, 254-260 (2010)
- 8) Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, AM., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, MG., Chekir-Ghedira, L.: Study on antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from Pistacia lentiscus, Confirmation by microarray expression profiling, *Chem. Biol. Interact.*, **165**, 1-13 (2007)
- 9) Zhang, J., Li, L., Kim, S.-H., Hagerman, A.E. and Lu, J.: Anti-cancer, antidiabetic and other pharmacological and biological activities of penta-galloyl-glucose, *Pharm. Res.*, **26**, 2066-2080 (2009)
- 10) 茶の機能 (村松敬一郎, 小国伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本万里編集), 学会出版センター (2002)
- 11) Lapidot, T., Walker, MD. And Kanner, J.: Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7220-7225 (2002)
- 12) Chedea, V.S., Braicu, C., Chirila, F., Ogola, H.J.O., Pelmus, R.S., Calin, L.G. and Socaciu, C.: Antioxidant/prooxidant and antibacterial/probacterial effects of a grape seed extract in complex with lipoxygenase, *Biomed. Res. Internat.*, **2014**, 1-9 (2014)
- 13) Zong, L., Inoue, M., Nose, M., Kojima, K., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Takeda, T. and Ogihara, Y.: Metabolic fate of gallic acid orally administered to rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 326-329 (1999)
- 14) Nakagawa, Y., Nakajima, K., Tayama, S. and Moldeus, P.: Metabolism and cytotoxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes: effects of a thiol reductant and an esterase inhibitor, *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1021-1027 (1995)

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

川筋 透

Effect of Constituents of Peony Root and Related Compounds on the Twitch Response to Electrical Stimulation in the Isolated Mouse Vas Deferens

Toru KAWASUJI

要 約

シャクヤクは、平滑筋及び骨格筋の痙縮を緩和する作用を有するとされている。数種のシャクヤク成分及び関連化合物について、参照薬物とともに、マウス精管の電気刺激収縮に対する抑制作用を検討した。止瀉薬のロペラミド (0.01-0.1 μ M) は、マウス精管のtwitch収縮反応を顕著に抑制し、オピオイド受容体遮断薬であるナロキソン (0.3 μ M) で拮抗された。L型カルシウムチャンネル遮断薬で血管拡張薬であるニフェジピン (0.03-0.3 μ M) や非特異的鎮痙薬であるパパペリン (1-10 μ M) は、顕著なtwitch収縮抑制作用を示した。アデノシン受容体作用薬のアデノシン (0.3-3 μ g/mL) は、やや作用持続の短いtwitch収縮抑制作用を示した。没食子酸メチル (100 μ g/mL) とピロガロール (10 μ g/mL) は、twitch収縮抑制作用と収縮作用を示した。タンニン酸 (10-30 μ g/mL)、没食子酸 (1-3 μ g/mL)、ペオノール (30-100 μ g/mL) 及び安息香酸 (100 μ g/mL) はtwitch収縮抑制作用を示した。これらの結果から、没食子酸と関連化合物、ペオノール及び安息香酸は、マウス精管における神経刺激性収縮に対する抑制作用を有することが示唆された。

Summary

Peony root is recognized to possess antispasmodic effect on smooth muscle and skeletal muscle. Effect of some constituents of peony root and related compounds on the twitch response to electrical stimulation were examined as well as reference drugs. Loperamide (0.01-0.1 μ M), a purgative agent, showed the potent twitch-inhibitory effect which is antagonized by naloxone (0.3 μ M), an opioid receptor antagonist. Nifedipine (0.03-0.3 μ M), a L-type calcium channel blocker and a vasodilator, and papaverine (1-10 μ M), a non-specific antispasmodic agent, showed the remarkable twitch-inhibitory effect. Adenosine (0.3-3 μ g/mL) showed a relatively short-acting twitch-inhibition. Methyl gallate and pyrogallol, showed the twitch-inhibitory effect and the contractile effect. Tannic acid (10-30 μ g/mL), gallic acid (1-3 μ g/mL), paeonol (30-100 μ g/mL) and benzoic acid (100 μ g/mL) showed the twitch-inhibitory effect. These results suggest that gallic acid, its related compounds, paeonol and benzoic acid possess the inhibitory effect on the neurogenic contraction in the mouse vas deferens.

キーワード：タンニン酸, 没食子酸メチル, ロペラミド, 精管, 電気刺激

Key words: Tannic acid, Methyl Gallate, Loperamide, Vas deferens, Electrical stimulation

シャクヤクは、一般に鎮痙、鎮痛、鎮静、収れんなどの薬理作用があるとされ¹⁻³⁾、シャクヤクとカンゾウからなる芍薬甘草湯は、こむら返り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³⁻⁵⁾。

シャクヤクの成分としては、モノテルペン配糖体であるペオニフロリンやアルビフロリン及びそれらの類縁化合物やガロタンニン類、安息香酸やペオノールなどが知られている^{2-4,6-9)}。

当所では、県薬用植物指導センターで栽培されているシャクヤクの品種の中から、優れた薬効が期待できる品種を見出し、栽培普及と利用促進を目指して、シャクヤクの薬効評価研究等を行っている。

モルモット回腸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。シャクヤクエキスは、モルモット回腸の電気刺激収縮に対する抑制作用を示すことが報告されている^{10, 11)}。

マウス精管は、電気刺激によってモルモット回腸の場合と類似の収縮反応が生じ、神経終末部に作用する薬物の評価等に用いられる^{12, 13)}。

これまで研究で、シャクヤクエキスには、マウス精管での電気刺激収縮抑制作用がみられ¹⁴⁾、芍薬甘草湯エキスにも抑制作用がみられている¹⁵⁾。シャクヤクの成分としては没食子酸類やカテキンに電気刺激収縮抑制作用がみられたが¹⁴⁾、活性本体については十分には解明されていない。

今回、数種のシャクヤク成分及び関連化合物について、マウス精管での電気刺激収縮抑制作用を検討した。シャクヤクのカロタンニン類と近い関係にあり、医薬品等で広く用いられているタンニン酸^{3, 7, 8)}や、シャクヤク成分である没食子酸類、安息香酸、ペオノールなどを用いた。また、参照薬物として、非特異的鎮痙薬であるパパペリンやL型カルシウムチャンネル遮断薬で血管拡張薬であるニフェジピン、止瀉薬であるロペラミドなどについて

ても電気刺激収縮抑制作用を検討したので報告する。

実験材料及び実験方法

1. 使用薬物

ロペラミド塩酸塩, ナロキソン塩酸塩 (以上, Sigma), ニフェジピン, パパベリン塩酸塩, アトロピン硫酸塩, アデノシン, タンニン酸, 没食子酸メチル, ピロガロール, アルピフロリン, ペオノール, 安息香酸 (以上, 和光純薬), 没食子酸 (ナカライテスク), ペオニフロリン (生薬精製品) 他を使用した。

ニフェジピン, アデノシン, タンニン酸, 没食子酸メチル, ピロガロール, アルピフロリン, ペオノール, 安息香酸, 没食子酸, ペオニフロリンは, 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。

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 (130mM NaCl, 5.9mM KCl, 2.2mM CaCl₂, 0.9mM NaH₂PO₄, 25.0mM NaHCO₃, 13.1mMスクロース及び11.1mMグルコース) を満たした30mL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0.1Hz) 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。基線上昇 (収縮) がみられた場合は, 適用0分における基線位置を0%, 振幅を100%として, 基線上昇 (%) を表した。

3. 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。

実験結果

1. マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対する各種薬物の作用

止瀉薬であるロペラミドは, 0.01-0.1 μ Mで, 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. 1, Fig. 2)。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IC₅₀値は0.021 μ Mであった。また, ロペラミド (0.03 μ M) による電気刺激収縮抑制作用は, オピオイド受容体遮断薬であるナロキソン (0.3 μ M) によって拮抗された (Fig. 2)。

L型カルシウムチャンネル遮断薬で血管拡張薬であるニフェジピンは, 0.03-0.3 μ Mでtwitch収縮反応を抑制し, IC₅₀値は0.13 μ Mであった (Fig. 3)。

非特異的な鎮痙薬であるパパベリンは, 1-10 μ Mでtwitch収縮反応を抑制し, IC₅₀値は1.6 μ Mであった (Fig. 4A)。一方, ムスカリン受容体遮断作用を有する鎮痙薬であるアトロピン (10 μ M) は, 抑制作用を示さなかった (Fig. 4B)。

アデノシン受容体を活性化する天然成分物質である

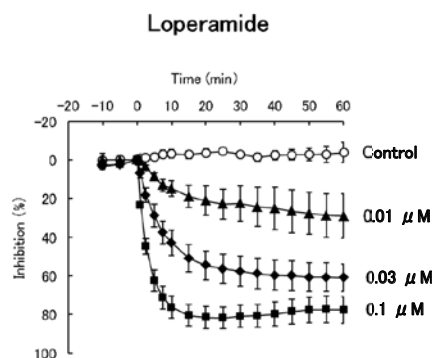


Fig. 1 Effect of loperamide on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Loperamide hydrochloride was dissolved in distilled water. Each point is presented as a mean ± S.E. of 4-6 experiments.

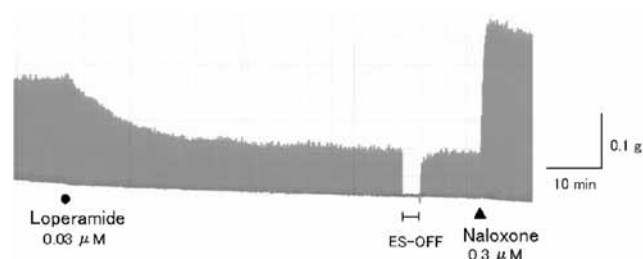


Fig. 2 Antagonistic effect of naloxone against the twitch-inhibition induced by loperamide in the isolated mouse vas deferens

Loperamide hydrochloride and naloxone hydrochloride were dissolved in distilled water and were added to the bath at the points indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) was stopped at the period indicated.

アデノシンは、0.3-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でtwitch収縮反応を抑制し、 IC_{50} 値は2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig. 5). アデノシンによる電気刺激収縮抑制作用は、速やかに発現するが、作用持続はやや短いものであった。

2. マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対するシャクヤク成分及び関連化合物の作用

医薬品等で広く用いられるタンニンであるタンニン酸は、10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でtwitch収縮反応を抑制し、 IC_{50} 値は13.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig. 6A). 没食子酸は、1-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で発現の遅い徐々に進行するtwitch収縮抑制作用を示し、 IC_{50} 値は1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig. 6B).

没食子酸メチルは、30-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でtwitch収縮抑制作用

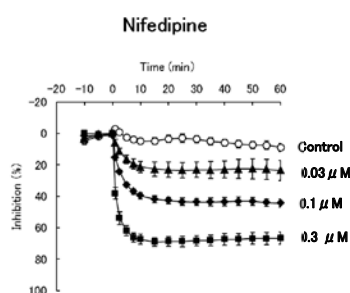


Fig. 3 Effect of nifedipine on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Nifedipine was dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4-5 experiments.

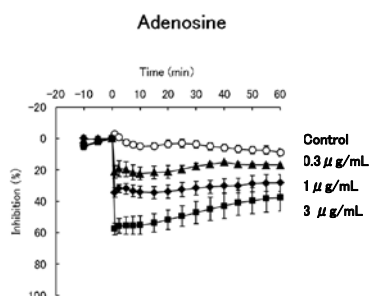


Fig. 5 Effect of adenosine on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Adenosine was dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 3-4 experiments.

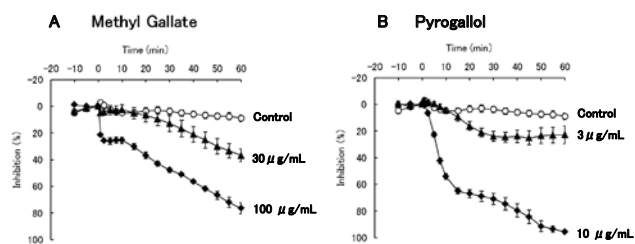


Fig. 7 Effect of methyl gallate and pyrogallol on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Methyl gallate and pyrogallol were dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4 experiments.

用を示し、適用初期の若干の抑制と徐々に進行する抑制が観察され、 IC_{50} 値は44.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig. 7A). 没食子酸が脱炭酸した構造のピロガロールは、3-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でtwitch収縮反応を抑制し、 IC_{50} 値は4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig. 7B). 没食子酸メチル及びピロガロールは、 IC_{50} 値の算出のために使用した高濃度側の濃度で、適用10-20分後から、基線を上昇させる作用、すなわち収縮反応がみられた (Fig. 8, Fig 9). また、没食子酸メチル適用後の栄養液の交換によって、徐々に進行する基線の戻りが観察された (Fig. 8).

芳香性成分の一つであるペオノールは、30-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、弱いtwitch収縮抑制作用を示し (Fig. 10A), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で最大抑制率は41.4%であった。また、安息香酸は、

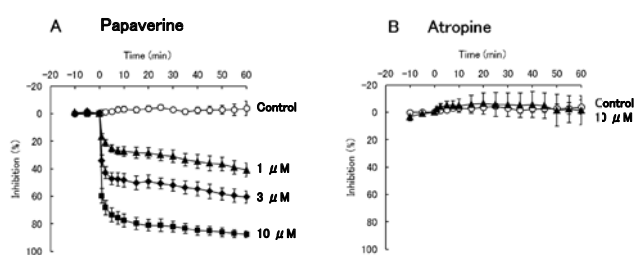


Fig. 4 Effect of papaverine and atropine on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Papaverine hydrochloride and atropine sulfate were dissolved in distilled water. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4-6 experiments.

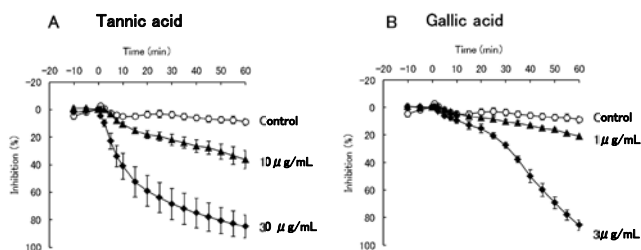


Fig. 6 Effect of tannic acid and gallic acid on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Tannic acid and gallic acid were dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4 experiments.

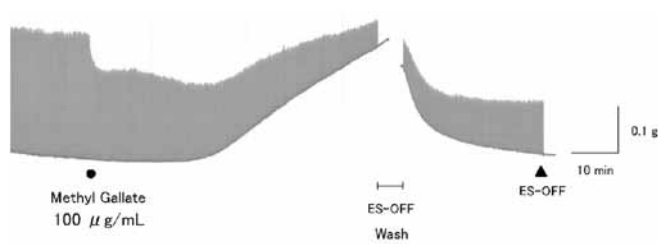


Fig. 8 Effect of methyl gallate on the twitch response and the basal contraction in the isolated mouse vas deferens
Methyl gallate was dissolved in DMSO and was added to the bath at the point indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) was stopped at the point indicated.

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でtwitch収縮抑制作用を示し (Fig. 10B), 最大抑制率は41.8%であった. 安息香酸によるtwitch収縮抑制作用は, 時間経過で徐々に減弱し, 60分までにほぼ消失した.

シャクヤクの主要成分であるペオニフロリン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及びアルピフロリン (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は, マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対して抑制作用を示さなかった.

考 察

マウス精管では, 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¹²⁾. マウス精管実験で使用している電気刺激条件では, twitch収縮反応が, 活動電位の発生・伝導を抑制する高選択的Na⁺チャンネルブロッカーであるテトロドトキシンの低濃度適用によって完全に抑制されることがわかっており¹⁴⁾, 神経刺激性の収縮反応といえる. twitch収縮抑制作用 (電気刺激収縮抑制作用) がみられた場合は, 神経伝達機構や平滑筋収縮機構における抑制があると考えられる.

マウスの精管は, モルモットの回腸と同様に, 神経終末上に神経伝達物質の遊離を抑制的に調節する受容体としてオピオイド受容体, α_2 -アドレナリン受容体, A₁-アデノシン受容体が存在し, 各受容体活性薬によって電気刺激によるtwitch収縮が抑制されることが知られている^{12, 13)}.

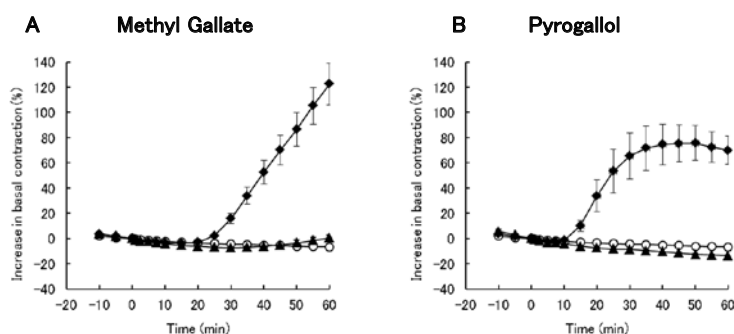


Fig. 9 Effect of methyl gallate and pyrogallol on the basal contraction in the electrically stimulated mouse vas deferens. Methyl gallate and pyrogallol were dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4 experiments. A: Control (○); methyl gallate at 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (▲) or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (◆). B: Control (○); pyrogallol at 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (▲) or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (◆).

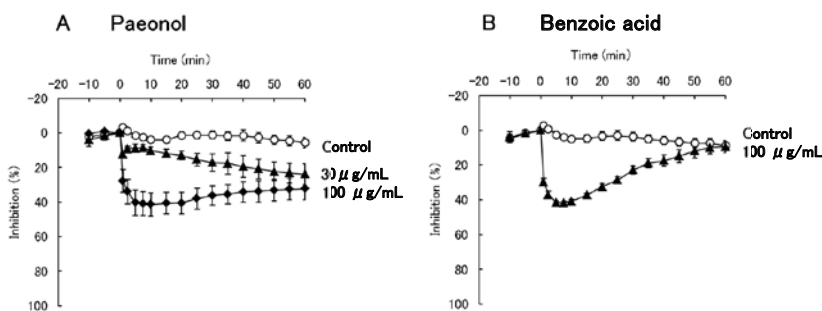


Fig. 10 Effect of paeonol and benzoic acid on the twitch response in the isolated mouse vas deferens. Paeonol and benzoic acid were dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 3-5 experiments.

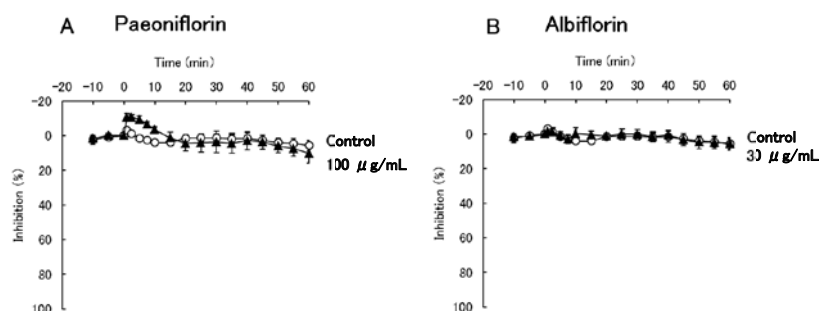


Fig. 11 Effect of paeoniflorin and albiflorin on the twitch response in the isolated mouse vas deferens. Paeoniflorin and albiflorin were dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4 experiments.

マウスの精管とモルモットの回腸を用いた電気刺激収縮実験は、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の検定に繁用されている¹²⁾。

止瀉薬のロペラミドは、モルヒネ様薬物であるが、中枢作用を欠いた、安全域の広い、強力な止瀉薬とされている¹⁶⁾。ロペラミドがマウス精管での電気刺激収縮を抑制することは報告があり¹⁷⁾、今回の実験においても、ロペラミドは低濃度で強い電気刺激収縮抑制作用を示し、オピオイド受容体遮断薬であるナロキソンで拮抗された。

ニフェジピンは、L型カルシウムチャネル遮断薬で血管拡張薬である。ニフェジピンは、低濃度で電気刺激収縮抑制作用を示したことから、カルシウム拮抗剤様の作用物質の評価にも使える評価系であると思われる。

非特異的な鎮痙薬であるパパベリンは、強い電気刺激収縮抑制作用を示したことから、パパベリン様の平滑筋弛緩物質の評価に使える評価系であると思われる。

アトロピンは、抗アセチルコリン作用に基づく鎮痙薬である。アトロピンはマウス精管で電気刺激収縮抑制作用を示さなかった。マウス精管実験では、抗コリン性の鎮痙薬は検出されないことが確認された。

シャクヤク成分の一つで、食品添加物として酸化防止剤の用途のある没食子酸は¹⁸⁾、以前の検討で、低濃度で電気刺激収縮抑制作用がみられている¹⁴⁾。今回、IC₅₀値を求めるために、1 μg/mLと3 μg/mLの2つの濃度で作用を検討した。以前と同様に¹⁴⁾、低濃度において作用発現が遅く、徐々に進行する電気刺激収縮抑制作用がみられた。

ガロタンニンは、加水分解によって生成するフェノールカルボン酸が没食子酸のみのタンニン群であり、その中でガロイルグルコース類が最も広く分布しているとされている⁷⁾。医薬品等で広く使用されるタンニン酸は、ガロタンニン（混合物）であり^{7, 8)}、蛋白を凝固し、収れん作用によって、局所の保護や抗炎症作用を示すとされている¹⁾。以前の検討で、シャクヤク中のガロタンニン類の1種であるペンタガロイルグルコースに電気刺激収縮抑制作用がみられている¹⁴⁾。今回、タンニン酸を用いて作用を検討したところ、電気刺激収縮抑制作用がみられた。

シャクヤクの主なタンニンは、ガロイルグルコース類であり⁸⁾、ペンタガロイルグルコースを基本骨格とし、さらに没食子酸が結合した分子量の大きいガロタンニンなども存在しているとされている^{6, 8, 9)}。タンニン酸に電気刺激収縮抑制作用がみられたことから、シャクヤク中のガロタンニン類が、エキスによる電気刺激収縮抑制作用に寄与し、蛋白質に対する非特異的な作用が関与している可能性があると考えられた。

シャクヤクの50%メタノールエキス中に没食子酸メチルが検出されている¹⁵⁾。以前の検討では、没食子酸メチルは30 μg/mLで弱い収縮抑制作用を示していたので¹⁴⁾、今

回、IC₅₀値を求めるために、溶媒をDMSOに変更し、没食子酸メチルを100 μg/mLに濃度を高めて作用を検討した。興味深いことに、基線の上昇、すなわち収縮反応が観察された。没食子酸メチルは、収縮抑制作用と収縮作用の両方の作用を有しているものと考えられた。

没食子酸メチルと類似の構造を有する酸化防止剤（食品添加物）として没食子酸プロピルがある¹⁸⁾。ラットに経口投与した場合、没食子酸とプロピルアルコールに加水分解され、大部分が没食子酸のまま尿中に排泄され、一部は腸内細菌によって脱炭酸されてピロガロールになることが報告されている¹⁸⁾。没食子酸類の関連化合物としてピロガロールについても作用を検討した。ピロガロールは、マウス精管実験で、電気刺激収縮抑制作用を示すとともに、没食子酸メチルに類似した収縮反応を示した。没食子酸メチルと比較して、反応性が高いと考えられるピロガロールは、低い濃度で作用が発現し、収縮作用の発現も早いものであった。没食子酸メチルだけでなく、没食子酸関連化合物の中には収縮性を有する物質も存在する可能性があると考えられた。なお、没食子酸メチルの収縮作用は、栄養液の交換によって作用が減弱したことから、可逆性のある収縮性反応であると考えられた。

没食子酸メチルは、投与初期の抑制と、徐々に進行する抑制からなる収縮抑制パターンを示した。シャクヤクエキスの電気刺激収縮抑制作用の特徴として、発現の早い収縮抑制と、徐々に進行する収縮抑制が観察されている¹⁴⁾。抑制パターンの類似性から、没食子酸メチルは、ある程度エキスの電気刺激収縮抑制作用に寄与している可能性があると思われる。

ペオノールは、ボタンピの主要な活性成分として知られる芳香性化合物であるが³⁾、シャクヤクにも存在するとされている⁶⁾。ペオノールは、マウス精管実験において、30 μg/mLで弱い電気刺激収縮抑制作用を示した。ペオノールは、50 μg/mLで摘出腸管において収縮抑制作用を示し、パパベリン様の向筋性鎮痙作用を有するとされている^{16, 17)}。ペオノールによるマウス精管での電気刺激収縮抑制作用は、パパベリン様の作用によるものかもしれない。揮発性の高いペオノールは、シャクヤクの50%メタノールエキス中に、わずか又はほとんど検出されていないことから¹⁹⁾、エキスにみられた電気刺激収縮抑制作用には、ペオノールは寄与していないものと考えられた。

安息香酸は、シャクヤク成分の一つであり、ペオニフロリンの分子内にも安息香酸が存在している^{3, 21)}。安息香酸は、防腐剤としての効果を有し、医薬品等として用いられている³⁾。安息香酸は、マウスの精管実験で、高濃度で電気刺激収縮抑制作用を示した。作用発現は早い持続性が低い抑制作用を示した。シャクヤクエキスにみられる発現の早い収縮抑制の部分に一部寄与している可

能性はあると思われる。

ペオニフロリンは、モルモット回腸の電気刺激収縮に対する抑制作用を示さないことが報告されている¹¹⁾。以前の検討で、マウス精管の電気刺激収縮に対してもペオニフロリンには抑制作用はみられなかった¹⁴⁾。DMSO溶液として適用した今回も、ペオニフロリンには抑制作用はみられなかった。また、アルビフロリンについて検討したところ、電気刺激収縮抑制作用はみられなかった。

生理活性物質であるアデノシンが存在する生薬が知られている²²⁾。以前の検討で、選択的A₁-アデノシン受容体活性薬であるシクロペンチルアデノシンには、持続性が高く、強い電気刺激収縮抑制作用がみられている¹⁴⁾。今回、アデノシンは低濃度で電気刺激収縮抑制作用を示したが、持続性はやや低いものであった。シャクヤクのモルモット回腸での電気刺激収縮抑制作用については、アデノシン様物質の関与を否定する報告があることから¹¹⁾、マウス精管でのシャクヤクの電気刺激収縮抑制作用についてもアデノシンが関与していない可能性が高いと思われる。

マウス精管実験での電気刺激収縮抑制作用の評価は、非特異的鎮痙薬やカルシウム拮抗薬などの平滑筋収縮抑制薬や神経伝達物質遊離抑制薬などを低濃度で検出できることから、生薬の生物活性評価において有用な評価系であると思われる。シャクヤク中の活性本体の検討は今後も引き続き行う予定である。

文 献

- 1) 高木敬次郎, 原田正敏: 芍薬の薬理学的研究 (第1報) ペオニフロリンの中樞作用および甘草成分FM 100との併用効果, 薬学雑誌, 89, 879-886 (1969)
- 2) 生薬利用と新医薬品開発 (監修: 糸川秀治), シーエムシー (1988), p.186
- 3) 第十六改正日本薬局方解説書, 廣川書店 (2011), D-378 (シャクヤク), D-387 (芍薬甘草湯エキス), D-740 (ボタンピ), C-411 (安息香酸), C-2700 (タンニン酸)
- 4) 鳥居塚和生: 生薬の薬効・薬理 (伊田喜光, 寺澤捷年監修), 216-223, 医歯薬出版 (2003)
- 5) 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)
- 6) 森田直賢, 清水岑夫, 林 利光: 芍薬の化学的品質評価, 現代東洋医学, 12 (4), 86-92 (1991)
- 7) 西岡五夫: タンニンの化学 (1), 現代東洋医学, 11 (3), 75-81 (1990)
- 8) 西岡五夫: タンニンの化学 (2), 現代東洋医学, 11 (4), 70-75 (1990)
- 9) 西澤 信, 山岸 喬, 野中源一郎, 西岡五夫: 薬学雑誌, 104, 1244-1250 (1984)
- 10) Maeda T., Shinozuka K., Baba K., Hayashi M., Hayashi E.: Effect of Shakuyaku-kanzoh-toh, a prescription composed of shakuyaku (Paeoniae Radix) and Kanzoh (Glycyrrhizae Radix) on guinea pig ileum, J. Pharmacobio-Dyn., 6, 153-160 (1983)
- 11) 林真知子, 馬場行一, 前田利男: 芍薬抽出物のモルモット回腸に対する作用, 薬学雑誌, 110, 139-143 (1990)
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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)
- 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) 莊司行伸, 河島勝良, 中村秀雄, 清水当尚: 止瀉剤 Loperamideの薬理学的研究 (第1報) ヒマシ油ならびにProstaglandin E1誘発下痢に対する効果, 日薬理誌, 74, 145-154 (1978)
- 17) Giagnoni G., Casiraghi L., Senini R., Revel L., Parolaro D., Sala M., Gori E.: Loperamide: evidence of interaction with mu and delta opioid receptors, Life Sci., 33 Suppl 1, 315-318 (1983)
- 18) 食品添加物活用ハンドブック (日本食品化学学会編) II 食品添加物実用 必須データ編, 産業調査会事典出版センター (2009) p.227-229
- 19) 横田洋一, 高橋 敏, 寺崎さち子, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別成分分析, 富山県薬事研究所年報, 38, 61-68 (2011)
- 20) 原田正敏, 山下厚子, 油田正樹: 牡丹皮の薬理学的研究 (第2報) ペオノールの抗炎症作用, ストレス胃エロジオン抑制作用, 胃液分泌抑制作用ならびにその他の薬理作用, 薬学雑誌, 92, 750-756 (1972)
- 21) 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 (1982), p.286 (芍薬) p.299 (牡丹皮)
- 22) 杳名 裕, 藤井誠史郎, 北村謙始, 小松一男, 中野幹清: 中国産紅花中の血小板凝集抑制物質の同定と定量, 薬学雑誌, 108, 1101-1103 (1988)

実生産規模でのシャクヤクの乾燥調製を目指した基礎検討

田村 隆幸, 高田 正明, 大江 勇

Basic Studies on drying of *Paeonia lactiflora* Pallas for large-scale production

Takayuki TAMURA, Masaaki TAKATA, Isamu OE

要 約

近年、本県ではシャクヤクの栽培が拡大し、現在は県外へ新鮮根として出荷されているが、販路拡大や高付加価値化を目指して、今後は生産者側で乾燥調製することが検討されている。そこで、生産者組織の取り組みによりシャクヤク乾燥用に改良された平型乾燥機を用いて、当センターにおいて実生産規模での試験乾燥を実施した。その結果、一度に390kgのシャクヤクを8日間で乾燥することが可能であり、得られた生薬が第16改正日本薬局方に規定されるペオニフロリン含量、乾燥減量、灰分及び酸不溶性灰分の各規格に適合することを確認した。今回の結果を基に、さらに改良を加え、シャクヤクの乾燥マニュアルを作成し、生産者への技術移転を通して、シャクヤクの乾燥出荷を支援していく。

Summary

The cultivation area of *Paeonia lactiflora* is expanding in Toyama recently. The fresh roots harvested by the farmers are shipped to the outside of Toyama prefecture now, but it is considered that the farmers ship the dried Peony root in the near future for expansion in a market and adding a high value. Therefore, test drying of *P. lactiflora* for large-scale production was performed in this center using the flat-bed dryer improved for peony drying by production conference. As a result, 390 kg fresh roots were dried in 8 days by this dryer, and the obtained Peony roots were suited to the Japanese Pharmacopoeia quality (Sixteenth Edition). We will study on drying methods further and we will support the farmers by technology transfer.

キーワード：シャクヤク, 乾燥, 平型乾燥機

Key words : Peony root, Drying, Flat-bed dryer

生薬「芍薬」は、第16改正日本薬局方¹⁾(以下、「日局16」という。)において、「シャクヤク*Paeonia lactiflora* Pallasの根である」と規定され、鎮痛、鎮痙、活血等の作用を期待して漢方処方に配合されるほか、婦人薬や胃腸鎮痛鎮痙薬等の製剤にも配合される。その国内での年間使用量1,489トンのうち国内生産量はわずか81トン(約5%)で、輸入に依存している²⁾。県内の芍薬生産量については、平成25年度までは1トン程度(乾燥重量)で推移していたが、平成22年度からの栽培農家の急増により、その収穫が始まった平成26年度は約2.7トン(推定した乾燥換算重量)が生産された。現在の県内シャクヤク農家が栽培している薬用品種は、皮を剥いてから自然乾燥で仕上げる品種として知られるが、冬期に湿度が高い富山県での自然乾燥では変色等により仕上がりが悪くなることから、新鮮根として県外へ出荷されている。そこで県では、シャクヤクの栽培拡大とともに県内製薬企業への出荷の推進を目的として調査を実施した。その結果、買い取りの条件として品質や価格の他、乾燥品であることが必要であった。そのため、県内生産者等で構成する組織「富山型薬用作物生産協議会」が平成26年度の国事業「薬用作物等地域特産作物産地確立支援事業」の採択を受けて実施するシャクヤクの乾燥に関する取り組みを支援した。この取り組みは、乾燥機メーカーの協力を得

て、市販の乾燥機をシャクヤク乾燥用に改良するもので、多段式の乾燥機より大量に乾燥が可能な平型乾燥機(1坪タイプ)がベース機として選定された。改良内容としては、効率的なシャクヤクの乾燥を実現するために、乾燥槽内の風量の均一化や排気される温風の循環機能等が追加された。この改良されたシャクヤク用乾燥機については、ベース機において考えられる課題を解決したものであって、実際にシャクヤクが乾燥できることは確認されており、また温風の設定温度や時間等の乾燥条件も明らかでない。今後この乾燥機を用いて生産者が乾燥し、出荷するためには、少なくとも日局16の品質規格を満たす生薬を得るための乾燥マニュアルが必要である。

そこで、当センターにおいて乾燥技術を確立し、それを生産者に技術移転することを目指して、改良された平型乾燥機を用いて実生産規模でのシャクヤクの試験乾燥を実施し、得られた生薬の品質(ペオニフロリン含量、乾燥減量、横切面の変色の有無等)を確認した。また、乾燥調製に関する予備検討も実施したので、併せて報告する。

実験方法

1. 卓上型乾燥機での連続乾燥と断続乾燥の比較

(1) シャクヤク試料

富山県薬用植物指導センター（中新川郡上市町広野2732）で4年間栽培したシャクヤクの根を平成26年11月7日に収穫し、水洗後、太さ1.5～2.0cmの根を選び、長さ10～12cmで切断した。品種はTB-057（富山ブランド候補品種）を用い、根皮は剥がなかった。連続乾燥と断続乾燥の試料として各7本を取り、4℃で約2か月間貯蔵した後、乾燥した。

(2) 乾燥機

大紀産業(株)製 small food dryer Petit Mini

(3) 乾燥期間

平成27年1月5日から1月28日まで（23日間）

室温は5から10℃の範囲であった。

(4) 乾燥条件

連続サンプルについては、乾燥期間中は全て30℃、ダンパーは1（解放側）に設定して連続送風乾燥を実施した。

断続サンプルについては、乾燥機運転中は連続サンプルと同様の条件とし、70時間の乾燥、47時間の休止、72時間の乾燥、30時間の休止、329時間の乾燥を実施した。

2. 乾燥に伴う根の硬度変化

(1) シャクヤク試料

前項と同じ条件で採取したシャクヤク根を同様に貯蔵後、乾燥した。硬度測定用の試料は、3つの網袋に各7本の根を入れ、測定時に各袋から1本を測定に使用し、一度測定に用いた根は以降の測定に使用しないこととした。

また、乾燥中の重量変化を測定する試料は別の30本を3つの網袋に入れ、袋ごとに測定し、平均値を求めた。

(2) 乾燥機

大紀産業(株)製 small food dryer Petit Mini

(3) 乾燥期間

平成27年1月5日から1月19日まで（14日間）

室温は5から10℃の範囲であった。

(4) 乾燥条件

乾燥期間中は全て30℃、ダンパーは1（解放側）に設定して連続送風乾燥を実施した。

(5) 硬度測定

果実硬度計（株藤原製作所製 KM型）を使用し、シャクヤク根1本当たり20か所測定した。硬度計の針頭（試料との接触部分）は、円錐型と半球型の2種を用いた。

測定日は、乾燥の開始直前、乾燥開始から2、3、5、8、10、14日後の計7回とした。

3. 平型乾燥機での試験乾燥

(1) シャクヤク試料

富山県薬用植物指導センターで4年間栽培したシャクヤク（品種名：梵天）の根を平成26年9月下旬から10月に収穫し、洗浄せずに、細い主根（径5mm以下）や細根を概ね除去し、コンバイン袋（PP袋）に約20kgずつ入れた。これらを屋外、日陰の土の上に並べ、その上にビニールシートを被せて乾燥を防止し、試験乾燥の実施まで貯蔵した。

(2) 貯蔵後の再選別

日局16の医薬品各条「シャクヤク」における生薬の性状を参考に、概ね次の規格に適合するものを選別し、試験に供した。

- ・太さ 直径1.0cm～3.0cm
- ・長さ 7cm～30cm
- ・側根を分離し（股割り）、腐り、虫害、変色が認められるもの、皮の剥離の著しいもの（部分）、細根及び根茎部は除外する。

(3) 洗浄

試料は、回転式洗浄機（図1）を用いて水のみで洗浄した。なお、この洗浄機ではシャクヤク根とともに砂及び水を入れて回転させることにより、根の皮を剥くことが可能であるが、皮付きでの乾燥根の需要が比



図1 回転式洗浄機



図2 改良された平型乾燥機（幌状シート使用時）

較的高いことから、今回の試験では皮を剥かないこととした。

【回転式洗浄機の概要】

洗浄槽サイズ：幅120cmの六角柱型（六角形の一辺は40cm）

回転数：約45rpm

【洗浄の条件】

- ・洗浄1回当たりのシャクヤク重量：約20kg
- ・予備洗浄：なし
- ・洗浄時間：計2分間（1分洗浄後、水の入替え）

(4) 乾燥機の概要

乾燥機（図2）は、富山型薬用作物生産協議会が国事業（平成26年度薬用作物等地域特産作物産地確立支援事業）を活用してシャクヤク乾燥用に改良したものをを用いた。ベース機は大紀産業(株)製の1坪型平型乾燥機（SUS304仕様）で、次の改良が施された。

- ①風向板を設置することにより、乾燥槽の場所による風量の差が均一化された。
- ②幌状のシート及び循環装置を設置することにより、乾燥槽内の場所による温度差が均一化され、また低コスト化のための排熱利用機能が追加された。
- ③インバーターを設置することにより、風量調節機能が追加された。

乾燥槽は、幅1800mm、奥行1800mm、深さ500mm

（底板の位置調節を下段に設定）のサイズで、底板の多数の穴から温風が上方向に送風される。

(5) 乾燥方法

底面が網目の容器（外寸 幅×奥行×深さ：595×399×229mm）に水洗済みのシャクヤク根を入れ、乾燥槽内に1段当たりの容器数を13個として2段に重ねて計26個の容器を入れた。各容器に入れるシャクヤク根の重量は15kgとし、1回の乾燥で合計390kgを乾燥できる設定とした。

乾燥槽内で無加温送風を16時間実施した後、乾燥機を下記の設定として稼働させた。乾燥期間中は乾燥槽内の容器の位置の入れ換えを実施したが、その時に乾燥機を停止した以外は連続送風乾燥とした。また、容器の入れ換え時に容器ごとに重量を測定した。

【乾燥機の設定条件】

- ・温度：40℃
- ・風量（インバーター設定値）：50Hz
- ・循環機能（排気口ダンパー開閉度）：1（全開放）
- ・乾燥槽の幌状シート：設置

【乾燥槽内の容器の入れ換え方法】

- ・48時間ごとに、①水平方向の位置、②上段、下段の位置を入れ換える。①は図3の規則に従う。
- ・①と②を同時に実施し、48時間ごとに同じ要領で入れ換えを繰り返す。

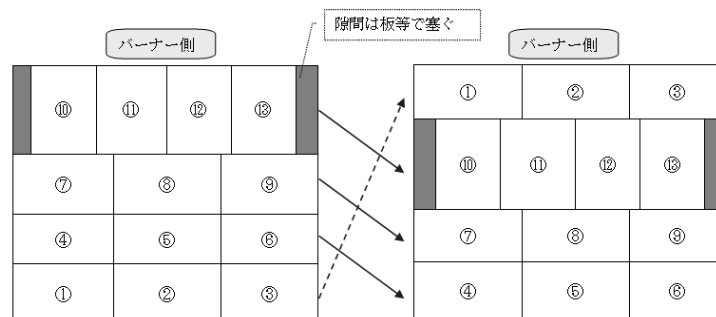


図3 乾燥槽内の容器の水平方向入れ換え規則（乾燥槽を上方から見た概略図）

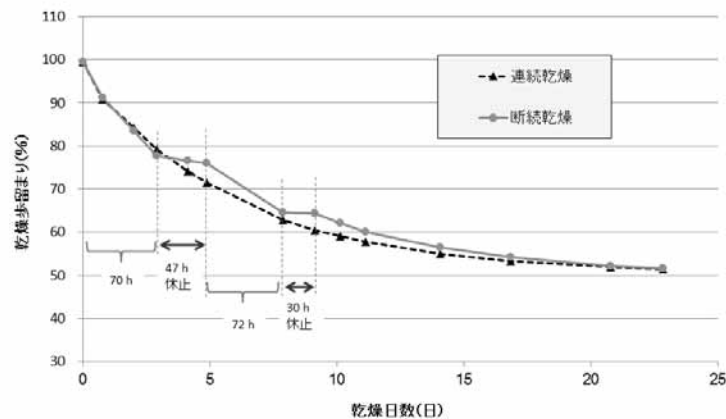


図4 連続運転と断続運転でのシャクヤク根の重量変化（卓上型乾燥機）

- ・位置の入れ換え時に、容器内のシャクヤクを混合する。

(6) シャクヤク乾燥根の品質試験

乾燥したシャクヤク根の横切面の色彩を分光色差計（日本電色工業(株)製 NF 333）で測定し、得られたL*a*b*値からハンター氏白色度を求めた。測定サンプルは、26個の容器から太さ1.0cmから2.0cmかつ長さ10cm以上の根をそれぞれ5本選び、その中央付近で切断した。切断した両側の面を測定し、全ての測定値の平均値を結果とした。

日局16の試験法を準用し、以下の項目を測定した。

- ・乾燥減量
- ・灰分
- ・酸不溶性灰分
- ・ペオニフロリン及びアルビフロリンの含量

結 果

1. 卓上型乾燥機での連続乾燥と断続乾燥の比較

(1) 連続乾燥での乾燥歩留まり

開始から約5日間で約70%に減少、同約9日間で約60%に減少し、同約23日で51.4%となった（図4）。

(2) 断続乾燥での乾燥歩留まり及び連続乾燥との比較

乾燥開始から70時間が経過し、約78%に減少した時点で、断続乾燥サンプルを乾燥機から出し、室内で保管した。断続乾燥サンプルは、休止期間の47時間で乾燥歩留まりが77.6%から75.9%となり、1.7%の減少であったが、その間に連続乾燥サンプルは79.3%から71.4%となり、7.9%の減少であった。

その後の72時間は両サンプルを同じ乾燥機内で乾燥

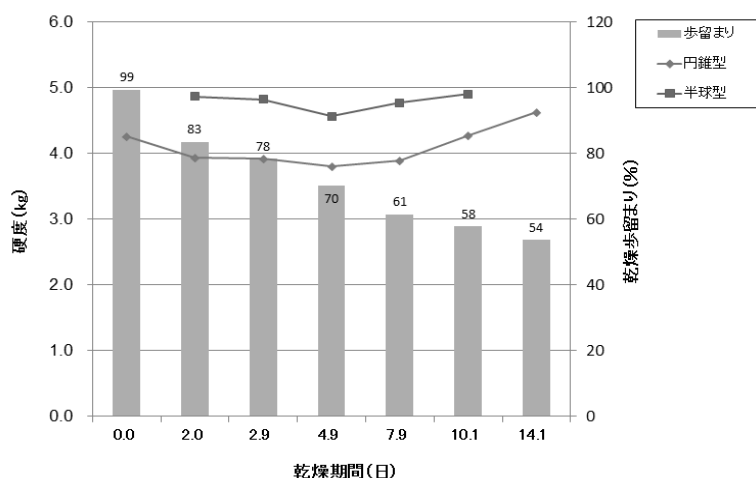


図5 シャクヤク根の乾燥に伴う硬度変化

したが、その間の重量減少幅としては、連続乾燥サンプルが8.6%の減少（71.4%から62.8%）であったのに対して、断続乾燥サンプルは11.3%の減少（75.9%から64.6%）であり、断続乾燥の方が約1.3倍であった。

その後の30時間の休止期間では、断続乾燥サンプルの歩留まりは64.6%から64.3%と0.3%しか減少しなかったが、連続乾燥サンプルは62.8%から60.5%と2.3%減であった。

この休止期間を経て両サンプルを同じ乾燥機内に入れた時点では、乾燥歩留まりは連続乾燥サンプルの方が3.8%低かったが、その後の約14日間の乾燥によりその差は縮まり、0.1%差となった。断続乾燥では乾燥機内での乾燥時間が計77時間分少ないにもかかわらず、乾燥開始から約23日経過時点で乾燥歩留まりの差がほとんどなくなった。

2. 乾燥に伴う根の硬度変化（図5）

(1) 円錐型の針頭での硬度測定

全7回の測定全てで、円錐形の針頭によりシャクヤク根に穴があいた。乾燥直前の硬度は4.3kgであったが、指による感触で少し弾性が生じ始める乾燥2日後においては3.9kgに低下した。乾燥5日後に硬度は最低値の3.8kgとなり、その後は上昇した。乾燥14日後には最高値の4.6kgとなり、乾燥開始前の硬度より高くなった。

(2) 半球型の針頭での硬度測定について

半球型では、測定の際に根に穴をあけることはなかった。乾燥開始前と乾燥14日後の測定では、根のどの位置を測定しても硬度計の測定限界値（5.0kg）を超えたために測定不可となった。乾燥2日後から10日後にかけては根に弾性があり、測定可能であった。



図6 乾燥前のシャクヤク根（洗浄後）



図7 乾燥後のシャクヤク根

乾燥5日後に最低値である4.6kgとなり、その後は上昇した。この傾向は円錐型と同様であった。円錐型での測定値(3.8から4.6kgの範囲)に比べて全体に高い値となり、4.6から4.9kgの範囲の測定値となった。

(3) 硬度と乾燥歩留まりの関係について

乾燥2日後に少し弾性が生じ、硬度も低下するが、このときの乾燥歩留まりは83%であった。硬度が最低値となる乾燥5日後の乾燥歩留まりは70%であった。これ以上乾燥が進むと硬度は上昇し、乾燥14日後には半球型で硬度が測定できなくなるほど硬くなり、弾性は消失した。

3. 平型乾燥機での試験乾燥

(1) 乾燥前後のシャクヤク根の外観等

乾燥前(洗浄後)を図6に、乾燥後を図7にそれぞれ示す。また、乾燥後のシャクヤク根の横切面を図8に示す。

(2) 乾燥に伴う重量変化及び乾燥に要した日数

乾燥開始時に上段であった容器と下段であった容器の各13個の乾燥歩留まりをそれぞれ平均値として、その変化を図9に示す。開始時に下段であった試料の乾燥歩留まりは、加熱送風の前の16時間の無加温送風により95.9%となり、その後の48時間の加熱送風により一気に64.2%にまで低下した。さらに48時間ごとに重量測定したところ、56.8%、54.2%、52.9%と減少していった。この時点で、1時間当たりの加熱による歩留まりの減少が0.027%となっており、乾燥完了とした。乾燥に要した日数は加熱送風を開始してから8日間であった。ただし、この期間には、48時間ごとの容器の入れ換え及び重量測定のために計3時間の加熱停止の時間(各1時間で3回)が含まれる。

開始時に上段であった試料については、開始時に下段の試料に比べてわずかに乾燥が遅れる傾向があるが、



図8 乾燥後のシャクヤク根の横切面

乾燥歩留まりで1%前後の差であった。乾燥完了時の歩留まりは53.4%で、開始時に下段の試料より0.5%高かった。

(3) 乾燥根の品質試験

各項目の結果は次のとおりであった。日局16に規格が掲載されているものについては、括弧内に規格値を記載する。

- ・ハンター氏白色度：73.3±3.7
- ・乾燥減量：11.38% (日局16：14.0%以下)
- ・灰分：2.83% (日局16：6.5%以下)
- ・酸不溶性灰分：0.02% (日局16：0.5%以下)
- ・ペオニフロリン含量：2.70% (日局16：2.0%以上)
- ・アルビフロリン含量：0.60%

考 察

本県では、今後は生産者がシャクヤク根を乾燥して出荷するための体制整備を進めており、富山型薬用作物生産協議会が平成26年度の国事業を活用して取り組み、従来の平型乾燥機をシャクヤク乾燥用に改良した。しかしながら、この乾燥機で実際にシャクヤクが乾燥可能かどうか、また乾燥条件や乾燥期間も不明で、医薬品として使用可能な生薬に仕上がるかどうか也未確認であったため、これらの解決を目的に、卓上型乾燥機にて予備検討を、平型乾燥機にて実生産規模での試験乾燥を実施した。

乾燥方法については、連続的に加熱送風する方法と、途中で加熱送風を休止する方法の2つに大別される。連続乾燥すると、根の表面だけが先に乾燥し過ぎて硬くなることによって中心部の水分が乾きにくくなり、乾燥時間が余計にかかる、又は乾燥が完了しない(日局16に記載の乾燥減量である14.0%以下にならない)、ということが考えられたため、卓上型乾燥機にて連続乾燥と断続乾燥の比較試験を実施した。30℃での連続乾燥の場合、表

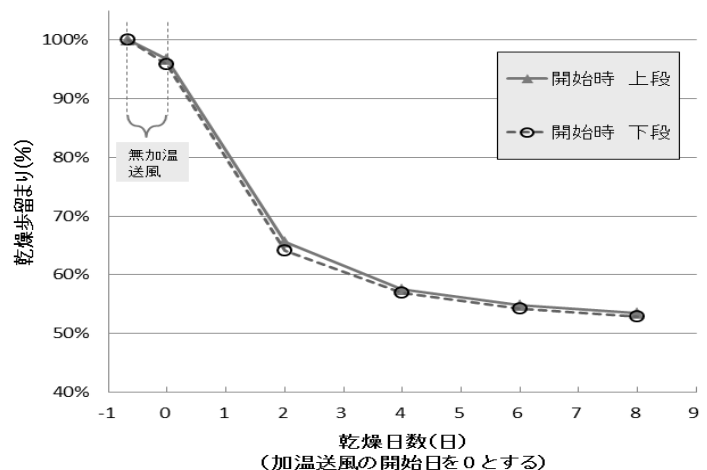


図9 シャクヤク根の重量変化(平型乾燥機)

面が硬くなった乾燥14日目以降も乾燥は徐々に進行し、乾燥まで約23日を要したが、乾燥歩留まりは51.4%となり、後に測定した乾燥減量は約12%であった。一方、途中に47時間及び30時間の2回の休止期間を設定した断続乾燥では、乾燥完了までに要する期間は連続乾燥と同じであった。このことから、断続乾燥は乾燥期間の短縮には有効ではないが、乾燥機の使用時間の短縮には活用できる可能性がある。例えば、乾燥機を一定期間で交互に使用することで、乾燥槽の2倍容量のシャクヤクを低コストに乾燥することが期待できる。この結果を得て、平型乾燥機での試験乾燥についても連続乾燥と断続乾燥の2回の試験乾燥を実施したが、品質や効率化・低コスト化の比較の基準となる連続乾燥での結果のみ本報告では掲載することとした。

また、断続乾燥では根の乾燥歩留まり（水分）がどの程度の時に休止を設定すべきかについて、今後検討する必要が生じることが考えられるが、根の乾燥が進むと生じてくる弾性と乾燥歩留まりの関連性を明らかにできれば、基礎資料として活用できる。そこで、卓上型乾燥機での乾燥の進行に伴って根の硬度を測定した。その結果、硬度が最低値となったときの乾燥歩留まりは70%であり、これより乾燥が進むと徐々に硬度は上昇し、弾性は消失した。今後の断続乾燥方法の検討においては、休止する時点での硬度は最低値が良いのか、それとも最低値に達する前なのか、また休止時間はどのくらいが適当かなどを明らかにする必要がある。

改良された平型乾燥機を用いた実生産規模での試験乾燥は、皮付きのシャクヤク根を15kgずつ26個の容器に入れ、乾燥槽内に2段に重ね、計390kgを同時に乾燥した。乾燥槽には幌状のシートを設置し、16時間の無加温送風の後、40℃の設定で連続運転したところ、8日間で乾燥が完了した。乾燥槽の底面から上方に送風される温風は、風向板の設置により風量差が解消され、均一になるよう改良されたものの、容器の設置位置による乾燥の進行に差が生じないように、容器の位置の入れ換えを48時間ごとに実施した。その際に容器ごとに重量を測定しており、その減少を確認したところ、ほぼ同様に乾燥が進行しており（データ省略）、生薬の品質の均一化に必要な作業であると考えられた。

また、乾燥した生薬の品質については、今回測定した乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分及びペオニフロリン含量の全てにおいて日局16の規格に適合した。シャクヤクは生薬の内部の色が白いものが一般に良品とされ、変色したものは買取不可となることもあるため、白色度についても評価したところ、乾燥した26個の容器から5本ずつ採取して求めた白色度の平均値は73.3であった。この数値は、今回の試料と同じ品種の根を専門業者が調製加工し

たサンプルの75.6と同等であり、白さについても問題ないことが確認された。

連続乾燥より低コスト化が期待できる断続乾燥の検討については、24時間ごとに40℃の加熱送風と休止を繰り返す方法で、他の条件は今回の連続乾燥と同様として平型乾燥機で試験乾燥を実施している。連続乾燥の実施時期とは気温等の環境が異なることから単純な比較はできないが、乾燥完了までの期間は12日間を要したものの、加熱乾燥した期間は6日間に短縮した。燃料（灯油）の消費量も連続乾燥のときの380Lから220Lに減少した。断続乾燥の休止期間中を利用して次ロットの乾燥も同時進行させた場合、乾燥処理能力は約1.3倍になる。このような高効率化や低コスト化、さらには高品質化に関する検討が今後の課題である。また、乾燥完了の判定に関しても、日局の乾燥減量の測定は粉末化や測定時間が必要であるため、乾燥現場での適用には向かない。薬用品種「梵天」については乾燥歩留まりと乾燥減量の相関データの蓄積が多くあるため、ある程度は重量から推定可能であるが、簡易的な判断方法が求められる。これに関しては、野菜等の測定に使用される水分計の活用を目指し測定値と乾燥減量との相関性を検討することとしている。

以上のことから、シャクヤク乾燥用に改良された平型乾燥機は、一度に390kgのシャクヤクを8日間で乾燥することが可能であり、得られた生薬は品質的にも問題ないことが確認された。そのときの乾燥機の設定条件等としては、①幌状のシートの設置、②ダンパー設定が1、③インバータ設定が50H、④温度設定が40℃、⑤加熱送風の前に16時間の無加温送風の実施、⑥乾燥槽に入れた容器の入れ換えを48時間ごとに実施、である。今回の結果を基に、さらに改良を加え、シャクヤクの乾燥マニュアルを作成し、生産者への技術移転を通して、シャクヤクの乾燥出荷を支援していきたいと考えている。

謝 辞

本研究において、乾燥したシャクヤク根の成分分析等の品質試験を実施していただきましたクラシエ製薬株式会社漢方研究所の土田貴志生薬研究グループ長、磯崎隆史主任研究員及び豊岡寛美研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省；第16改正日本薬局方，1514（2011）
- 2) 日本漢方生薬製剤協会，原料生薬使用量等調査報告書（3）—平成23年度および平成24年度の使用量—（2015）

V 資 料

「平成26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 2014

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25年で全国第3位（6,089億円）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⁾。

平成25年度においては、pH測定、水分測定、融点測定、定量（紫外可視吸光度測定法）、質量偏差、定量（HPLC法）及び溶出試験について実施したところ、93%が適合（ $|Z| \leq 3$ または USP 適合）であったが、単純な操作の試験においても不満足な結果となる事例などがあったことから、今後もさらに改善すべき課題があると考えられた²⁾。そのため平成26年度においては、前年度に問題があった試験項目について、対象品目を変更して実施し、結果解析、原因調査及び改善指導を行ったので、その概要について報告する。

1. 実施方法

(1) 試験項目及び試験方法

試験項目は、L-グルタミン酸及びグリシンのpH測定、(+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定、イソニアジドの融点測定、日局アラセプリル錠12.5mgの定量試験、日局アラセプリル錠50mgの溶出試験とした（下表参照）。なお、pH測定、水分測定及び融点測定については、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。

定量試験は、日本薬局方の試験方法（20錠以上を粉砕したものを用いる）と別法（4錠を粉砕せずに用いる）の2通りの方法（前者を試験法1、後者を試験法2とする）で試験した。水分測定は試料0.1gを直接滴定で測定した。その他の試験項目については、日本薬局方に準じた試験方法とした。

表：試験項目及び参加企業数等について

試験種別	試験項目	対象品目	主な使用機器	参加企業数
原薬試験	pH測定	L-グルタミン酸	pH計	38
	pH測定	グリシン	pH計	38
	水分測定	(+)-酒石酸ナトリウム二水和物	水分計（容量滴定法）	29
	融点測定	イソニアジド	融点測定装置	32
製剤試験	定量（HPLC）	日局アラセプリル錠12.5mg	HPLC、乾燥機	34
	溶出試験	日局アラセプリル錠50mg	溶出試験器、分光光度計	14

(2) スケジュール

平成26年9月9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10月24日とした。報告内容をとりまとめて下記(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27年3月18日に報告会を開催し、参加企業に対して結果を説明し、改善指導を行った。

なお、実施説明会においては、試験機器メーカー（株堀場製作所）の技術担当者を外部講師として、pH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測定については、多くの参加企業の報告値が平均pH値に非常に近い値であったことから、報告値が「平均値±0.10以内」の場合は、Zスコアの値に関わらず「適合」と判定することとした。

(4) 評価結果に基づく対応

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

2. 結果及び考察

(1) L-グルタミン酸及びグリシンのpH測定

報告されたpH値を評価したところ、L-グルタミン酸のpH測定については、38社のうち、36社が平均値±0.10以内の「満足」であり、残り2社が「不満足」であった。また、その2社が再試験を実施したところ、すべて「満足」と判定される結果であった。（図1～3参照）

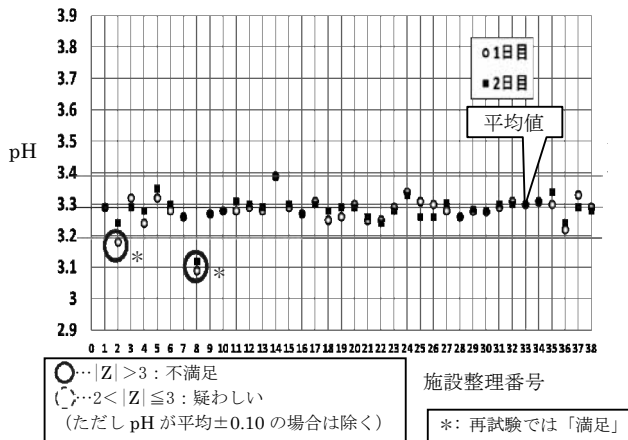


図1 L-グルタミン酸のpH測定の報告値

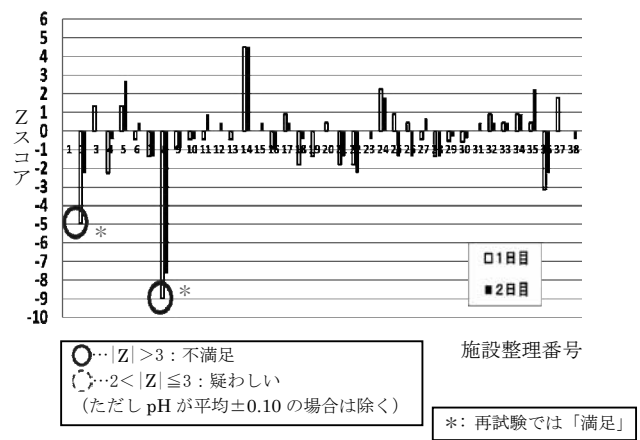


図2 L-グルタミン酸のpH測定のZスコア

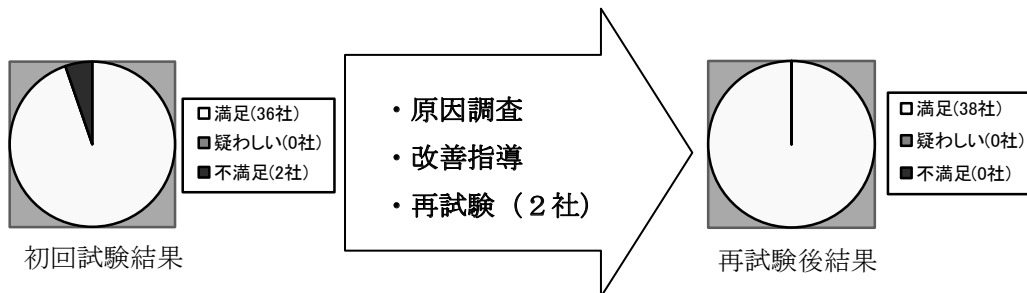


図3 L-グルタミン酸のpH測定の評価結果

グリシンのpH測定については、38社のうち、34社が平均値±0.10以内の「満足」であり、残り4社が「不満足」であった。そのうちの3社が再試験を実施したところ、すべて「満足」と判定される結果であった。(図4～6参照)

原因調査を実施したところ、pH計の測定値の読み取りを自動で行った場合と目視で行った場合で値が異なる事例があった。これは、まだ安定していない値を自動的に読み取って測定結果としたことが原因と考えられるので、装置の設定を変更するか、または目視で読み取ることで改善されると考えられた。なお、定期的に測定値の読み取りを自動と目視の両方で行い、差がないことを確認することが望ましいと考えられた。

また、実地の原因調査では、測定時の試料溶液の攪拌の有無により測定値が異なり(試料グリシンの場合の差: 0.3)、電極の応答性もやや遅い(測定値の安定化にかかる時間: 2分)事例があった。電極又は装置の異常の可能性が考えられたので、別の電極に交換して再試験を実施したところ、「満足」と判定される結果が得られた。日常の使用前点検において、電極の汚れの有無、応答性及び安定性を確認し、異常がないか注意を払うとともに、必要に応じて内部液交換、電極洗浄または電極交換等の処置を行うことが重要であると考えられた。

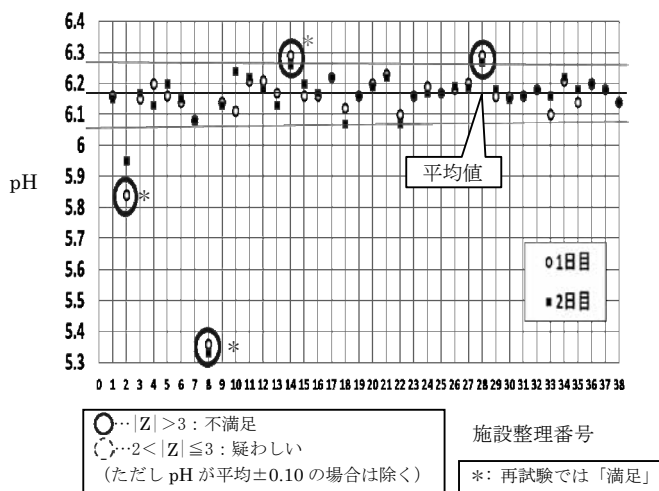


図4 グリシンのpH測定の報告値

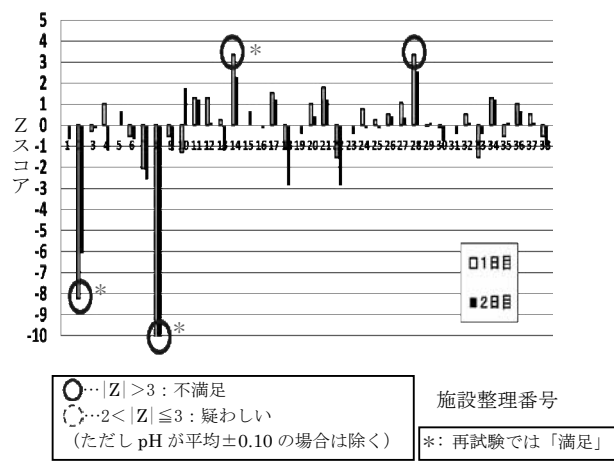


図5 グリシンのpH測定のZスコア

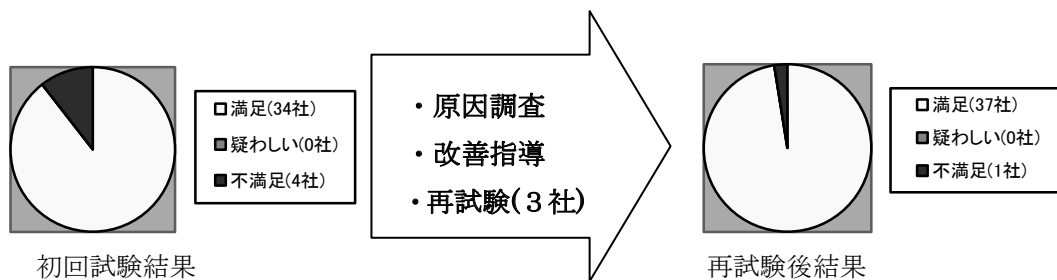


図6 グリシンのpH測定の評価結果

(3) (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定

29社のうち、「不満足」が4社、「疑わしい」が3社であった。また、5社が再試験を実施したところ、すべて「満足」と判定される結果が得られた。(図7～9参照)

原因調査を実施したところ、電極洗浄後の処理に問題があった事例(電極を洗浄用溶媒で洗浄した後、滴定溶媒に30～60分浸す作業を実施せずに使用した)、試料の結晶が完全に溶解していない状態で滴定を開始したために水分値が低くなった事例(試料投入から滴定まで5分以内)、適さない滴定溶媒を使用した事例(エタノールの滴定溶媒を使用したために、なかなか溶解せず、試料投入から滴定まで40分もかかり、水分値が高くなった)、水分測定用試液の標定に問題があった事例(標定値が高めの値になったために水分測定値も高めになった)などがあった。試料が完全に溶解したことを確認して水分を測定すること、適した滴定溶媒を選択すること、及び前回の標定値と比較して異常がないか試験の都度確認することが重要であると考えられた。

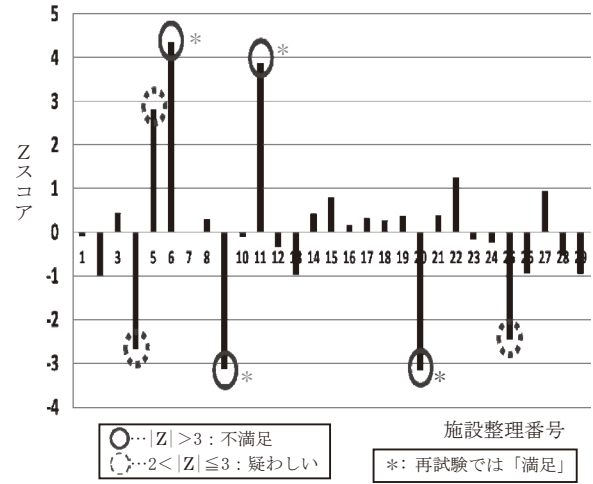
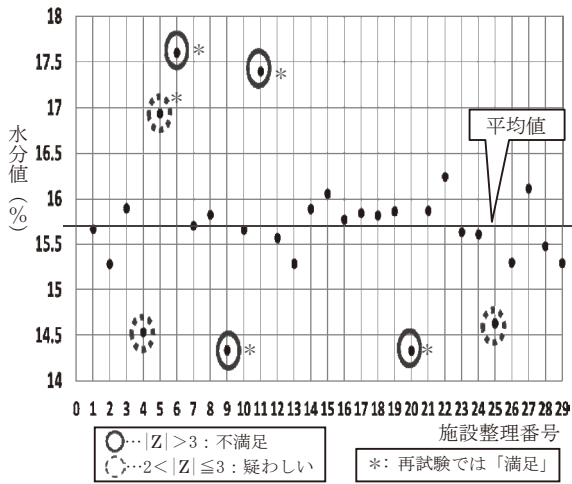


図7 (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定の結果値 図8 (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定の結果値

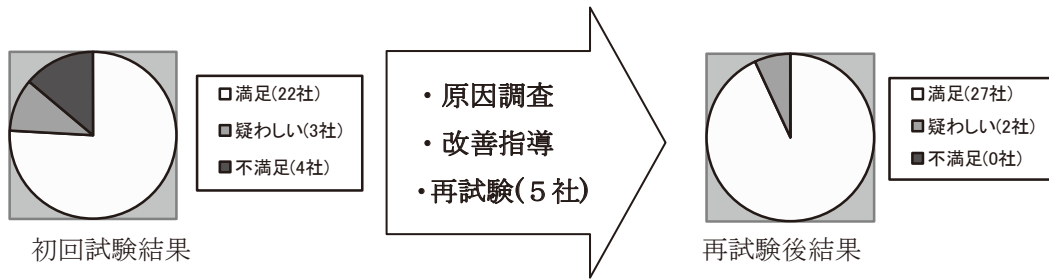


図9 (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定の結果値

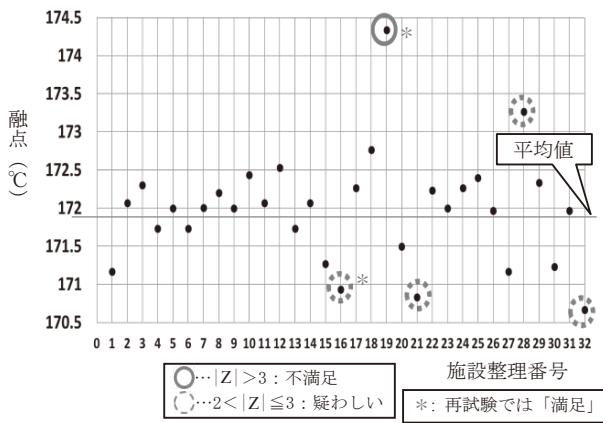


図10 イソニアジドの融点測定の結果値

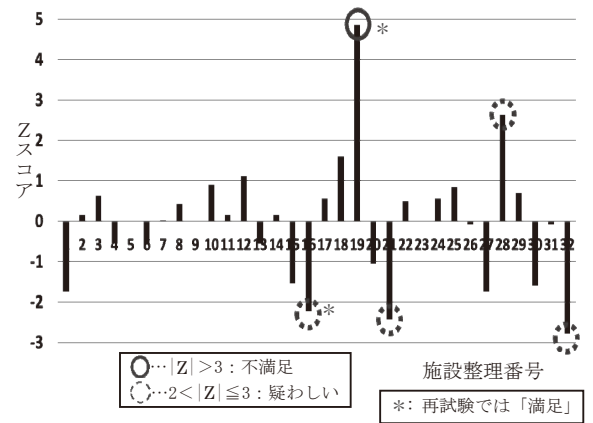


図11 イソニアジドの融点測定の結果値

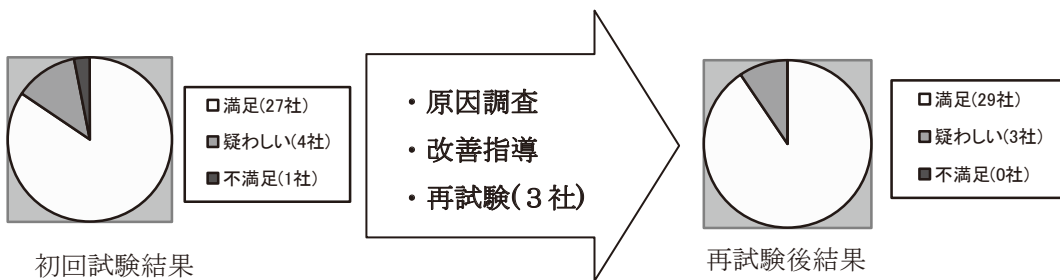


図12 イソニアジドの融点測定の結果値

(4) イソニアジドの融点測定

27社のうち、「不満足」が1社、「疑わしい」が4社であった。また、そのうち3社が再試験を実施したところ、2社が「満足」と判定される結果であった。(図10~12参照)

バーナーで加熱を行ったために日局に規定されたとおりの昇温速度で昇温できなかったことが原因と考えられる事例があった。前年度の融点測定においても同様の原因で満足な結果が得られなかった参加企業があったので、バーナーで加熱を行う際は昇温速度に十分注意する必要があると考えられた。その他にも、試料の事前乾燥及び粉碎を実施せずに測定していたことが原因と考えられる事例があった。日局の内容を再確認するとともに、日局融点測定用標準品を用いて装置の適格性を確認することが重要と考えられた。

(5) 日局アラセプリル錠12.5mgの定量試験 (HPLC)

試験法2 (4錠を粉碎せずに用いる別法) については、34社のうち「不満足」が3社、「疑わしい」が2社であった。そのうち3社が再試験を実施したところ、すべて「満足」と判定される結果が得られた(図13~15参照)。含量値が高すぎた事例については、標準溶液の調製に問題があったことが考えられた。含量値が低すぎた事例については、多数のメスフラスコ等を同時に超音波処理したために抽出不足となったことが考えられた。なお、試験法1 (20錠以上を粉碎したものをを用いる日局の試験法) については、試験法2の結果から含量値の真値がほぼ100%と考えられるにも関わらず、多くの参加企業が100%に近い値を得ることができず、ばらつきも大きかったので、Zスコア等による評価は実施しなかった。その原因については今後さらに検討を行う必要がある。

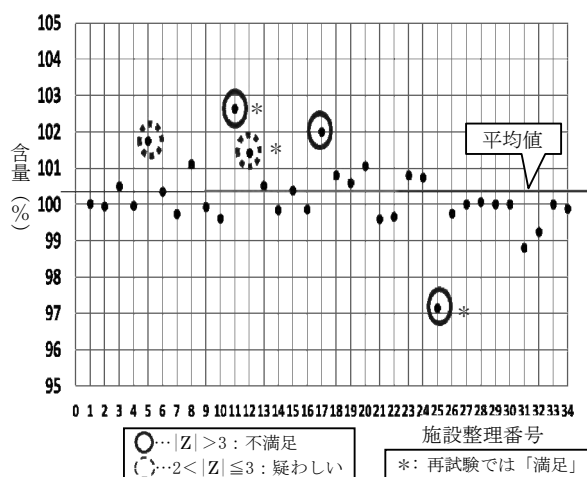


図13 日局アラセプリル錠12.5mgの定量試験 (試験法2) の報告値

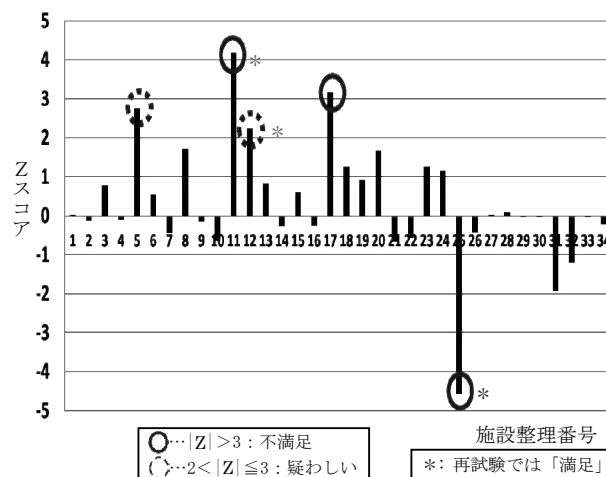


図14 日局アラセプリル錠12.5mgの定量試験 (試験法2) のZスコア

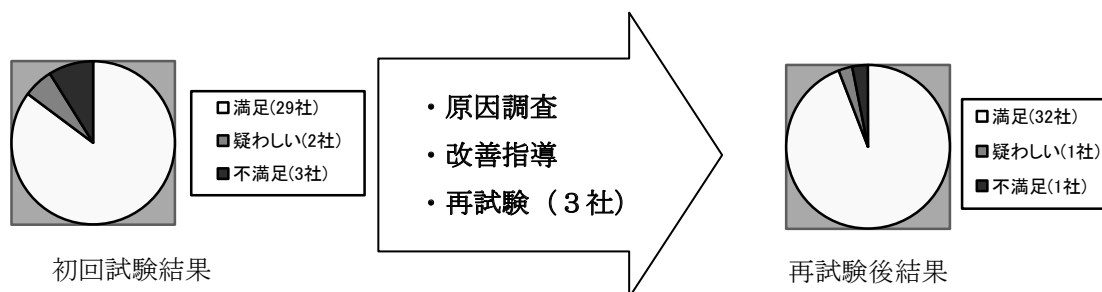


図15 日局アラセプリル錠12.5mgの定量試験 (試験法2) の評価結果

(6) 日局アラセプリル錠50mgの溶出性

14社のうち、「不満足」が1社、「疑わしい」が1社であった。原因を調査したところ、「満足」の12社は、すべて脱気した試験液を用いて試験していたが、「不満足」「疑わしい」の2社は、脱気していない試験液を用いていた。そこ

で薬事研究所において、45℃ 2時間加温脱気した試験液と脱気していない試験液で比較試験を行ったところ、脱気した試験液を用いた場合は「満足」と判定される結果（ほぼ平均値82.3%付近の溶出率）が得られたが、脱気していない試験液を用いた場合は「不満足」と判定される結果（100%付近の溶出率）であった。以上より、本試験においては試験液の脱気処理の有無が影響していたと考えられた。なお、「不満足」の1社が脱気した試験液を用いて再試験を実施したところ、「満足」と判定される結果が得られた。（図16～18参照）

日本薬局方においては、「試験結果に影響を及ぼす場合には、試験の前に脱気する」と記載されているのみであり、一律すべてに脱気を行うことは記載されていない。しかし、実際に今回の事例のように、品目によっては、試験液を脱気しないと溶出率が高くなる危険性がある。脱気の有無が試験結果に影響しないことを示す根拠が品目毎にない限りは、脱気した試験液で溶出試験を実施する必要があると考えられた。

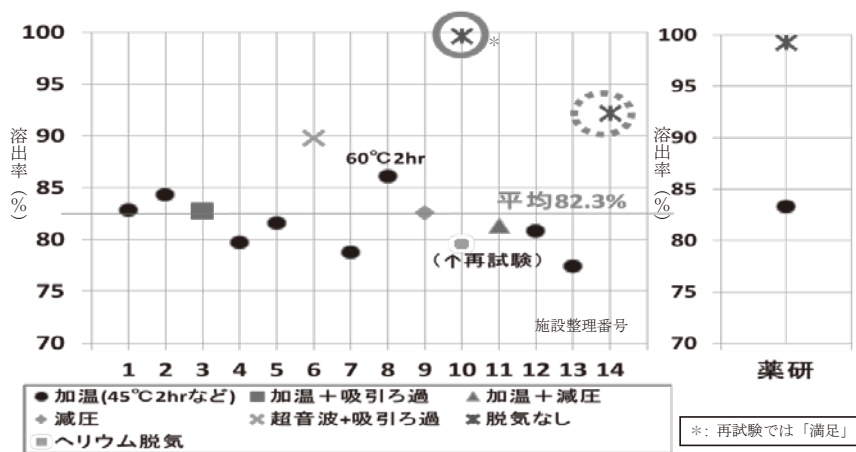


図16 日局アラセプリル錠50mgの溶出試験の報告値

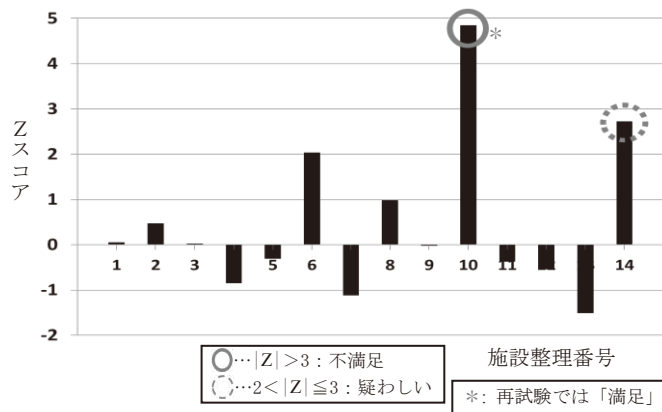


図17 日局アラセプリル錠50mgの溶出試験のZスコア

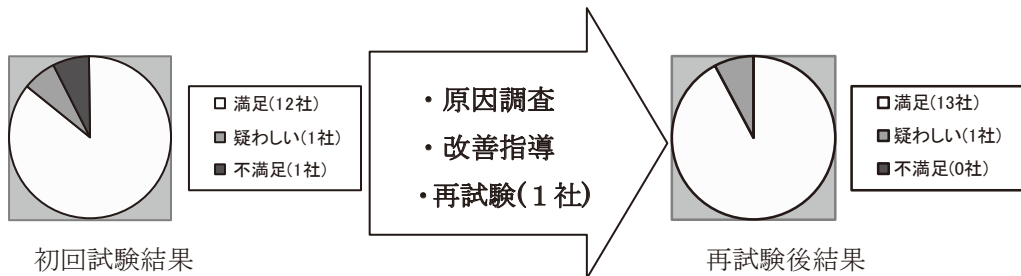


図18 日局アラセプリル錠50mgの溶出試験の評価結果

3. まとめ

今年度7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92%（のべ185社中170社）であり、前年度の93%（のべ180社中168社）とほぼ同程度であった。前年度のpH測定及び水分測定は、単純な試験操作であるにも関わらず良好な結果が得られなかった企業が多かったが、今年度のpH測定はほぼ全社が平均±0.10以内であり、前年度よりは良好な結果を得ていると考えられた。一方、水分測定については、前年度は湿度の高い環境下で試験したことが問題となったが、今年度は湿度が問題と考えられるような事例はなかったものの、「不満足」の企業が前年度と同様に多かった。これらの試験項目については、今後も改善すべき課題があり、装置状態及び操作手法等に十分注意を払う必要があると考えられた。

「不満足」の企業の87%が再試験を実施し、さらに「疑わしい」の企業も40%が再試験を希望して実施したことから、参加企業の改善に向けた積極的な姿勢が見られた。また、原因調査、改善指導及び再試験等により、大部分の参加企業は「満足」な結果を得ることができたので、技術の習熟度が上昇したと考えられた。今後とも、本事業及び相談対応などを通して、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

「製剤開発・創薬研究支援ラボ」の設置及び 製剤開発・創薬研究実践研修の実施について

Establishment of “Laboratory for Innovation in Pharmaceutical Development and Drug Discovery” and Training Report

永井 秀昌

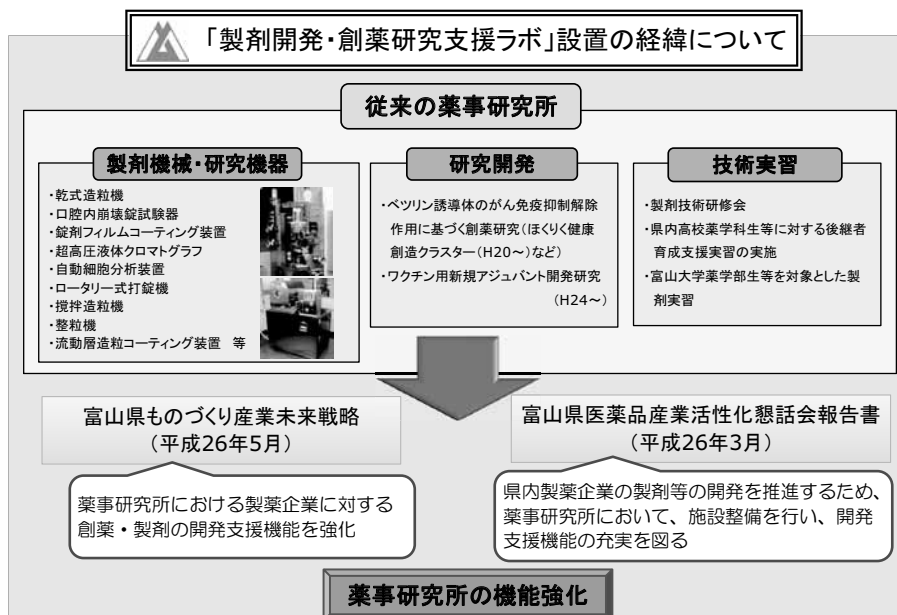
Hidemasa NAGAI

平成27年2月末に完成した「製剤開発・創薬研究支援ラボ」について、その概要や導入装置及び製剤開発・創薬研究実践研修について紹介する。

1. 「製剤開発・創薬研究支援ラボ」設置の概要

(1) ラボ設置の経緯

ものづくり産業未来戦略会議と医薬品産業活性化懇話会での提言を受け、本県の医薬品産業の活性化に必要な創薬マインドの促進と製剤技術力の強化を目的として、製剤開発研究や創薬研究を実施するための研究支援ラボを設置することになった。事業費は129,000千円で、財源は国の「地域の元気臨時交付金（地域経済活性化・雇用創出臨時交付金）」を活用している。



(2) ラボの概要

- | | | | | | | | |
|-----------|--|-----------|---------------------|---------|----------------------|---|------------------------|
| ①所在地 | 薬事研究所内（射水市中太閤山17-1） | | | | | | |
| ②着工 | 平成26年10月6日 | | | | | | |
| ③竣工 | 平成27年2月27日 | | | | | | |
| ④改修面積 | 337㎡（薬事研究所1階西側の実験室エリアを改修） | | | | | | |
| ⑤事業費 | 1億2,900万円 | | | | | | |
| | <table border="0"> <tr> <td>（ ・ 施設改修費</td> <td>4,600万円（平成26年度当初予算）</td> </tr> <tr> <td>・ 備品購入費</td> <td>6,900万円（　　　　　　　　　　　）</td> </tr> <tr> <td>・ 　　　　　　　　　　　</td> <td>1,400万円（平成26年度11月補正予算）</td> </tr> </table> | （ ・ 施設改修費 | 4,600万円（平成26年度当初予算） | ・ 備品購入費 | 6,900万円（　　　　　　　　　　　） | ・ | 1,400万円（平成26年度11月補正予算） |
| （ ・ 施設改修費 | 4,600万円（平成26年度当初予算） | | | | | | |
| ・ 備品購入費 | 6,900万円（　　　　　　　　　　　） | | | | | | |
| ・ | 1,400万円（平成26年度11月補正予算） | | | | | | |

(3) 活用目的

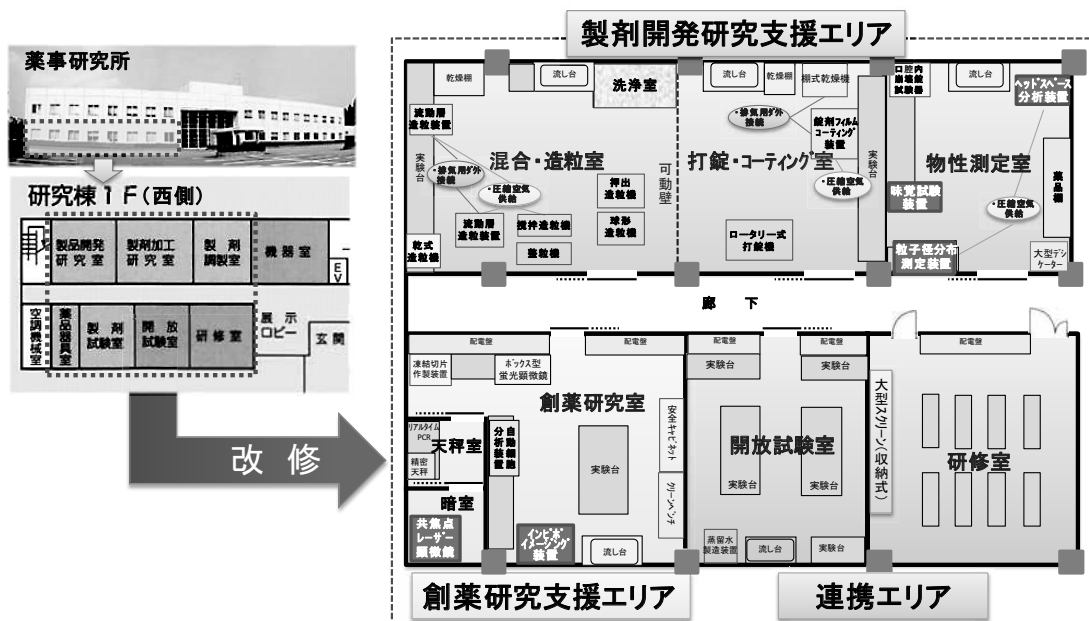
本県の医薬品研究開発及び医薬品産業の活性化に必要な製剤開発力の強化，研究開発の促進，人材の育成を目的とする。

- ① 技術支援… 施設の利用や技術指導を通して，製剤開発力の強化を図る。
- ② 研究開発… 製剤開発研究や医薬品開発シーズの探索研究を推進する。
- ③ 人材育成… 学生や研究者等を対象とした技術実習等を通して，医薬品産業を担う人材の確保につなげる。

(4) 施設改修の概要

3つの研究支援エリアを整備（大型洗浄設備や空調設備を完備し，暗室等を設置）

- ① 製剤開発研究支援エリア（混合・造粒室，打錠・コーティング室，物性測定室）
- ② 創薬研究支援エリア（創薬研究室，天秤室，暗室）
- ③ 連携エリア（開放試験室，研修室）



混合・造粒室／打錠・コーティング室



洗浄室



物性測定室



創薬研究室



開放試験室



研修室

2. 新しく導入した装置について

(1) 創薬研究装置

<p style="text-align: center;">共焦点レーザー顕微鏡</p>  <p>組織切片及び培養細胞中の目的分子を、蛍光標識された抗体等と反応させ可視化する装置。薬物を投与した際の生体内分子の局在変化や蛍光標識した薬剤の生体内局在変化が解析可能。</p>	<p style="text-align: center;">インビボ イメージング装置</p>  <p>生体内の微弱な発光や蛍光を、動物を殺傷することなく検出するための装置。蛍光標識した薬剤のマウス生体内での動態を経時的に解析可能。</p>
---	--

(2) 製剤開発研究装置

<p style="text-align: center;">味認識装置（味覚センサー）</p>  <p>医薬品等の味をセンサーにより数値化し、解析する装置。苦味薬物のマスキング効果を客観的に評価することが可能で、ほかにも甘味・酸味・旨味・塩味などの数値化が可能。</p>	<p style="text-align: center;">レーザー回折式粒子径分布測定装置</p>  <p>医薬品原料や顆粒の粒子径を測定し、解析する装置。原料粉体や顆粒剤の物性を評価することが可能（粒度分布、平均粒子径の測定に利用）。</p>
<p style="text-align: center;">ヘッドスペースサンプラ、オートサンプラ及びFID付きガスクロマトグラフ</p>  <p>揮発性化合物をガスクロマトグラフに導入し、分析する装置。医薬品及びその原料中に含有する揮発性成分を分析し、製品開発・品質管理に活用。</p>	<p style="text-align: center;">ECD及びFID付きガスクロマトグラフ並びにガスクロマトグラフ質量分析計</p>  <p>ガス化した医薬品等化学物質を分離し、定性・定量する装置。医薬品分析、生薬中の残留農薬や危険ドラッグの分析に活用。 ※2階 特殊機器室に設置</p>

3. ラボ設置で期待される効果

新規導入機器の利用や研修・セミナーを通じて、県内製薬企業の高付加価値製剤の開発研究に貢献し、医薬品生産額の増加が期待される。

また、新規導入機器を活用して、平成26年度より実施している「バイオ医薬品開発研究事業」と「ベツリン創薬研究事業」の研究を推進し、今後の研究の進展が期待される。

人材育成面では、平成24年度より実施している富山大学薬学部・工学部の学生実習をはじめ、高校生を対象としたエキスパート実習や製薬企業の若手技術者を対象とした実習を円滑に実施できる環境が整うことにより、製剤技術を習得した人材の育成が期待される。



ラボ開設式（左）及び除幕式（右）の様子（平成27年3月12日）

4. 製剤開発・創薬研究実践研修の実施について

県内製薬企業によるラボの円滑な利活用を図るため、平成26年度に厚生労働省の補助金を活用し、県内製薬企業の技術者を対象とした装置の活用法を学ぶツアー研修を実施したので、その概要について報告する。

(1) 研修内容について

1) 味覚評価技術研修

①概要

月 日：平成26年12月11日、12日

場 所：(株)インテリジェントセンサーテクノロジー（神奈川県厚木市）

受講者：富山県内の製薬企業等に勤務する技術者 8名

テーマ：「味覚評価技術の基礎と応用技術」

②内容

a. 味認識装置の概要説明及び官能検査体験

味覚センサーの味覚応答メカニズムや製薬企業における味覚評価の活用事例についての説明。ギムネマ茶を用い、味認識装置で測定した値と官能検査による値とを比較。

b. 口腔内崩壊錠試験器（OD-Mate）の操作実習

味認識装置と連動させて測定が可能な口腔内崩壊錠試験器を用い、口腔内崩壊錠の崩壊時間を測定。

c. 味認識装置（TS-5000Z）の操作実習

センサーの取り付け方法、測定プログラムの設定手順等を習得。

d. 味覚データの解析方法説明

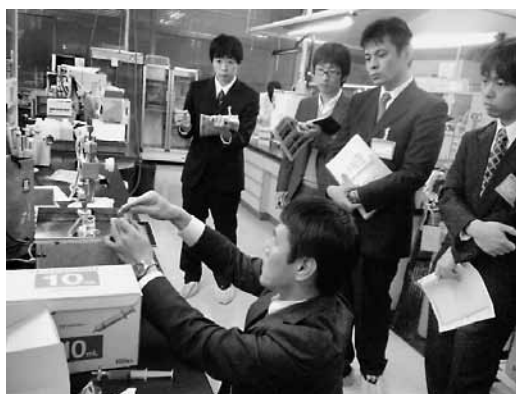
測定結果に基づき、データの解析やグラフ化の手順等を習得。

e. アンリツ産機システム(株) 工場内見学

インテリジェントセンサーテクノロジーに隣接するアンリツ産機システム(株)の工場内において、質量検査機、異物検査機の製造ラインを見学。



味認識装置の操作法の説明



口腔内崩壊錠試験器の説明

研修後に実施したアンケートによれば、味認識装置を自社で活用したいと感じた参加者が多く、判定に曖昧さがある「味」を数値化できることへの期待が多く述べられていた。

2) 粒度分布測定技術研修

①概要

月 日：平成27年1月8日、9日

場 所：(株)島津製作所（京都府京都市）

受講者：富山県内の製薬企業等に勤務する技術者 11名

テーマ：「粒度分布測定の基礎と周辺技術」

②内容

- a. 講義「レーザー回折式粒子径分布測定装置SALDシリーズの測定原理とアプリケーション」及び「密度、比表面積、細孔分布の測定法とアプリケーション」
レーザー回折式粒子径分布測定装置や関連する粉体測定機器について、原理や活用方法を習得。
- b. 島津製作所内サイエンスプラザ・グローバルアプリケーションセンター見学
サイエンスプラザ内に展示されている最新の各種クロマトグラフ、質量分析計等の見学及び医用機器ショールーム「メディカルセンター」での最新の医療機器を見学。
- c. レーザー回折式粒子径分布測定装置「SALD-2300」、「SALD-7500nano」を用いた実際の粒子径測定実験
参加者から測定依頼を受けていた検体を持ち込み、湿式・乾式法において粒子径分布を測定。



粒子径分布の測定実習



サイエンスプラザの見学

研修後に実施したアンケートによれば、自社で活用したいと思う装置・技術として、「粒度分布測定装置」や「湿式、乾式測定時のコツ」などが多く記載されており、取扱説明書だけでは理解できない測定時のノウハウが習得できたものと感じられた。

(2) 研修のまとめ

本研修は、県内製薬企業による薬事研究所「製剤開発・創薬研究支援ラボ」の円滑な利活用を図るため、平成26年度に新規に実施した事業である。研修後には、研修生に対し、研修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。結果によると、研修内容を「良く理解できた」と「大体理解できた」の合計が9割以上を占めており、ほぼ全ての研修者に内容が理解できたものと考えている。

また、全ての研修は1泊2日の日程で実施し、懇親会も併せて開催したため、他の製薬企業の技術者とのコミュニケーションによる情報交換ができ、有意義であったとの意見が多く寄せられていた。今後は研修で得られた知識や情報を自社で利用するとともに、当所のラボを十分に活用されることが期待される。

VI 誌上・学会発表など

1. 原著の抄録

J. Leukoc. Biol.,96 (6) :1087-1100, 2014

Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation

Honda H., Nagai Y., Matsunaga T., Okamoto N., Watanabe Y., Tsuneyama K., Hayashi H., Fujii I., Ikutani M., Hirai Y., Muraguchi A., and Takatsu K.

近年の研究から、肥満や2型糖尿病等の病態に「慢性炎症」が関わっている事が明らかにされている。2型糖尿病においては、炎症物質であるインターロイキン-1 β (以下IL-1 β) の過剰な産生を原因としてインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性状態が誘導される。IL-1 β の産生には、NLRP3インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体が必須な役割を果たしている事から、この「NLRP3インフラマソーム」の活性化を阻害する物質は、これらの疾患に対する治療薬となりうる可能性がある。

我々は以前に生薬甘草由来のカルコンであるイソリクイリチゲニン (以下ILG) がLPSによるNF- κ Bの活性化を抑制することを明らかにしてきた。今回、我々はTLR4の阻害効果とは別にILGにNLRP3インフラマソーム活性化抑制効果があることを見出した。甘草の別の主要成分であるグリチルリチン (以下GL) もILGと同様にNLRP3インフラマソーム活性化抑制作用を示したが、高濃度を要した。また、二本鎖DNAによって活性化するAIM2インフラマソームについては、GLによって阻害されるが、ILGによっては阻害されなかった。また、GLはNLRP3及びAIM2インフラマソームによるASCタンパクの重合化を抑制するが、ILGはNLRP3インフラマソーム活性化によるASCタンパクの重合化を抑制した。さらに、ILGはスルホニルウレア系の抗糖尿病薬グリブライドよりも低濃度でIAPP (Islet amyloid polypeptide) によるIL-1 β の産生を抑制した。

より低濃度でNLRP3インフラマソーム活性化抑制作用を示したILGをマウスに混餌投与したところ、高脂肪食投与による肥満、脂肪肝及びインスリン抵抗性等が改善された。また、ILGにより高脂肪食投与による脂肪組織の炎症が抑制され、ex vivoでの白色脂肪組織からのIL-1 β 及びカスパーゼ-1の産生が抑制されていることが明らかとなった。

以上から、ILGがNLRP3インフラマソーム活性化が関与する炎症性疾患の治療薬として役立つことが期待される。

Immunol. Letters.,163:22-31, 2015.

Differential Requirements of MyD88 And TRIF Pathways in TLR4-mediated Immune Responses in Murine B Cells.

Yanagibashi T., Nagai Y., Watanabe Y., Ikutani M., Hirai Y., and Takatsu K.

エンドトキシン (LPS) は、Toll様受容体 (TLR) 4を介してB細胞を活性化し、増殖反応や抗体産生等の様々な免疫反応を誘導する。また、LPSはインターロイキン (IL) -4やトランスフォーミング増殖因子 (TGF) - β 等のサイトカイン刺激と共同で、免疫グロブリン (Ig) G1, IgE及びIgAを誘導する。IgG1, IgAはワクチン及び免疫増強剤 (アジュバント) の接種により誘導され、感染防御の主体を担う。よって、IgG1及びIgAの誘導機構を明らかにすることは、効果的なアジュバント開発のために必要不可欠である。TLR4シグナルの下流には、2つのシグナル伝達経路、MyD88経路とTRIF経路が存在するが、これまでB細胞のLPS反応性における両経路の役割は不明であった。私達は、LPS単独刺激によるB細胞応答が、MyD88経路に強く依存する一方、LPS+IL-4刺激によるB細胞応答は、TRIF経路に依存すると共に、MyD88経路により負に制御されることを明らかにした。

HPLC法の分析時間短縮化に関する検討 (第7報) —無コウイ大建中湯エキスの [6]-ショウガオール定量法の基礎的検討—

堀井 周文, 田中 啓介, 大根谷 章浩, 古寺 篤子, 竹脇 奈々子, 奥野 康之,
永井 喜美, 菊池 菜々香, 横田 洋一

日本薬局方に記載されている漢方処方HPLC法による分析で、保持時間が約30分と長く、分析時間の短縮が望まれる無コウイ大建中湯エキスの [6]-ショウガオールの分析時間の短縮化について、従来の粒径 $5\mu\text{m}$ 、内径 4.6mm 、長さ 150mm のC8カラムを粒径 $3\mu\text{m}$ 、内径 4.6mm 、長さ 75mm のC8カラムに替え、調製エキスを用いて基礎的検討を行った。その結果、Inertsil C8-3、YMC-Pack C8及びMightysil RP-8GPを用いることで、分析時間を約半分に短縮化することができ、またエキスの定量値の再現性も良好であったため、日局無コウイ大建中湯エキスへの応用の可能性が示唆された。

医薬品試験の効率化に関する検討 —UHPLCによる省力化・低コスト化の検証及び親水性相互作用 クロマトグラフィー (HILIC) による分離分析検討—

山本 豊巖, 岩城 有里, 野坂 宜宏, 野本 有沙, 高崎 純一, 梶川 敬雄,
松任 宏子, 北原 一治, 小泉 テシャワリー, 藤野 彬仁, 飯村 和也, 池崎 富子, 横田 洋一

1. HPLCからUHPLC (超高速液体クロマトグラフィー) への試験法移管を解熱鎮痛薬成分を対象として、複数の会社の機器を用いて検討した。その結果、一部の機器のシステムに問題が見られたが、それ以外では概ね良好な分離を示し、分析時間はほぼ20%に短縮されたため、UHPLCは医薬品試験の効率化に寄与できることが示唆された。

2. 逆相系充填剤では同時分析が困難な極性化合物とその他成分の同時分析の検討を、HILICを用いて検討した。今回、点眼剤に使用されるアラントイン、ビタミン等4成分及び内標準物質の分離分析を2種類のカラムを用いて検討したところ、そのうちの1種類のカラムでそれぞれの分離が達成されたが、カラムの安定化に長時間を要したため、今後の検討課題とした。

(平成25年度富山薬事研究所年報 p49, 家庭薬研究32→家庭薬研究33)

乾式造粒法における圧縮・整粒条件が顆粒物性に与える影響の検討

重倉 好博, 二谷 章大, 山下 成彬, 杉窪 克哉, 吉田 朗, 生川 雄一, 渡辺 雅彦,
霜鳥 武司, 栗山 武大, 斉藤 充広, 八島 淳, 八木 清, 福田 大輔, 西野 諭,
池田 久尚, 宮田 慶亮, 明官 勇雄, 永井 秀昌

(富山県薬事研究会製剤部会)

乾式造粒法における最適な圧縮・整粒条件を確立することを目的として、乾式造粒機および2種類の整粒機で実験を行った。フレーク強度に及ぼすロールおよびスクリーン回転数の影響を検討した結果、ロール回転数を減少し、スクリーン回転数を増加させるとフレーク厚および強度が増加することを確認した。これは、ロール回転数を減らすことにより単位時間あたりの圧縮力が増加するとともに、スクリーン回転数を増やすことで、圧縮する粉体の供給量が増加し、厚く硬いフレークが成形されることが考えられる。また、顆粒物性に及ぼすフレーク物性の影響を検討した結果、フレーク強度が増加するとかさ密度が増加し、流動性が良い顆粒が得られることが確認された。整粒方法が顆粒物性に与える影響を検討した結果、オシレーター式に比べて、解砕式の方が、シャープな粒子径分布を持つ顆粒が得られ、平均粒子径のバラツキも小さいことが明らかになった。今回の実験により、標準処方を用いた乾式造粒法では、①硬いフレークを成形（条件：ロール回転数2rpm, スクリーン回転数30rpm）し、②解砕式整粒機を使用する条件で、流動性の良い粒ごろいな顆粒が製造できることを確認した。特に、乾式造粒においては、フレーク強度と整粒機の種類が顆粒物性に大きな影響を与えられらる。

2. 講演・学会発表

「IL-33に誘導される血管壁肥厚とIL-5産生ILC2」

生谷 尚士, 常山 幸一, 長井 良憲, 高津 聖志
第35回日本炎症・再生医学会, 2014, 7, 1-4, 沖縄.

「免疫と自然炎症の接点：創薬探索へのアプローチ」

高津 聖志
第16回免疫サマースクール2014, 2014, 7, 30, 小豆島.

「Chemical Constituents Analysis of the Leaf of *Eleutherococcus senticosus* Cultivated in Different environment」

葛躍 偉, 村上 守一, 田村 隆幸, 川本 元裕, 磯田 進, 朱 姝, 吉松 嘉代, 小松 かつ子
第31回和漢医薬学会学術大会, 2014, 8, 31, 千葉

「Comparing the contents of main components in the roots of Bonten, a medicinal cultivar of *Paeonia lactiflora* after different post-harvest processing」

Zhu S, Shirakawa A, Shi YH, Yu XL, Tamura T, Yoshimatsu K, Komatsu K.
The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (第8回日中韓生薬学合同シンポジウム), 2014, 9, 13, 福岡

「モデルマウスを用いた副腎白質ジストロフィーに対する骨髄移植の検討」

松本 隼, 守田 雅志, 渡邊 康春, 長井 良憲, 小林 博司, 高津 聖志, 今中 常雄
日本薬学会第13回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム2014, 2014, 9, 20, 富山.

「免疫・炎症制御を活用した和漢薬の薬効解明への挑戦—甘草成分によるインフラマソームの制御と肥満抑制効果—」

高津 聖志
国立医薬品食品衛生研究所「特別講演会」, 2014, 9, 30, 東京.

「水系基剤を用いた腸溶性フィルムコーティング条件の検討」

永井 秀昌, 水上 一也, 寄木 優作, 杉窪 克哉, 無江 邦充, 布目 基倫, 川岸 貴博, 堀内 始, 野口 博和, 藤村 友明, 霜鳥 武司, 齊藤 充広, 成島 遼太, 藤岡 準平, 南 敬照, 中齋 浩文, 池田 久尚, 明官 勇雄
第16回富山県薬学会年会, 2014, 10, 18, 富山市

「Structural Determination and Synthesis of Isoprenoids as Immune Activators via TLR4/MD-2」

Mizote K., Saeki A., Honda H., Okamoto N., Kimura T., Nagai Y., Takatsu K., Fujimoto Y., Fukase K.
SLB IEIIS 2014, 2014, 10, 23, Salt Lake City, USA.

「遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症における好中球とIL-1シグナルの機能解析」

長井 良憲, 渡邊 康春, 高津 聖志
第35回日本肥満学会, 2014, 10, 24, 宮崎.

「富山県内医薬品製造業者の分析データ信頼性確保事業について」

竹林 憲司, 横田 洋一, 大戸 幹也
第51回全国薬事指導協議会総会, 2014, 10, 24, 名古屋市

「副腎白質ジストロフィー：レンチウイルスベクターによるABCD1タンパク質の発現と骨髄移植」

松本 隼, 守田 雅志, 渡邊 康春, 長井 良憲, 小林 博司, 高津 聖志, 今中 常雄
第56回日本先天代謝異常学会総会, 2014, 11, 13-15, 仙台.

「副腎白質ジストロフィーモデルマウスへの骨髄移植とその効果」

松本 隼, 守田 雅志, 渡邊 康春, 長井 良憲, 小林 博司, 山本 誠士, 石井 陽子, 笹原 正清, 高津 聖志,
今中常雄
日本薬学会北陸支部第126回例会, 2014, 11, 16, 金沢.

「Roles of IL-5-producing ILC2 in vascular pathogenesis」

Ikutani M., Tsuneyama K., Nagai Y., Takatsu K.
第43回日本免疫学会学術集会, 2014, 12, 10, 京都.

「Adipocyte-derived free fatty acids trigger IL-1 β production by neutrophils in mouse adipose tissue」

Watanabe Y., Nagai Y., Tsuneyama K., Takatsu K.
第43回日本免疫学会学術集会, 2014, 12, 10, 京都.

「Isoliquiritigenin Is a Potent Inhibitor of NLRP 3 Inflammasome Activation and Diet-induced Adipose Tissue Inflammation」

Honda H., Nagai Y., Takatsu K.
第43回日本免疫学会学術集会, 2014, 12, 10, 京都.

「An antibiotics funiculosin derivative is a novel agonist of Toll-like receptor 4」

Okamoto N., Honda H., Nagai Y., Takatsu K.
第43回日本免疫学会学術集会, 2014, 12, 11, 京都.

「HPLC法の分析時間短縮化に関する検討（第7報）」—無コウイ大建中湯エキスの [6]-ショーガオール定量法の基礎的検討—

堀井 周文, 田中 啓介, 大根谷 章浩, 古寺 篤子, 竹脇 奈々子, 奥野 康之, 永井 喜美, 菊池 菜々香,
横田 洋一
第34回家庭薬開発シンポジウム, 2015, 2, 13, 富山市

「医薬品試験の効率化に関する検討」—UHPLCによる省力化・低コスト化の検証及び親水性相互作用 クロマトグラフィー（HILIC）による分離分析検討—

山本 豊巖, 岩城 有里, 野坂 宜宏, 野本 有沙, 高崎 純一, 梶川 敬雄, 松任 宏子, 北原 一治,
小泉テシャワリー, 藤野 彬仁, 飯村 和也, 池崎 富子, 横田 洋一
第34回家庭薬開発シンポジウム, 2015, 2, 13, 富山市

「乾式造粒法における圧縮・整粒条件が顆粒物性に与える影響の検討」

重倉 好博, 二谷 章大, 山下 成彬, 杉窪 克哉, 吉田 朗, 生川 雄一, 渡辺 雅彦, 霜鳥 武司, 栗山 武大,
斉藤 充広, 八島 淳, 八木 清, 福田 大輔, 西野 諭, 池田 久尚, 宮田 慶亮, 明官 勇雄, 永井 秀昌
第34回家庭薬開発シンポジウム, 2015, 2, 13, 富山市

3. 共同研究論文リスト

Hikosaka K., Ikutani M., Shito M., Kazuma K., Gulshan M., Nagai Y., **Takatsu K.**, Konno K., Tobe K., Kanno H., and Nakagawa T.: Deficiency of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 3 (Nmnat3) Causes Hemolytic Anemia by Altering the Glycolytic Flow in Mature Erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 289:14796-811, 2014.

Katayama H., Mori T., Seki Y., Anraku M., Iseki M., Ikutani M., Iwasaki Y., Yoshida N., **Takatsu K.**, and Takaki S.: Lnk prevents inflammatory CD8+ T-cell proliferation and contributes to intestinal homeostasis. *Eur. J. Immunol.*, 44 (6) :1622-32, 2014.

Mori T., Iwasaki Y., Seki Y., Iseki M., Katayama H., Yamamoto K., **Takatsu K.**, and Takaki S.: Lnk/Sh2b3 controls the production and function of dendritic cells, regulates the induction of IFN-gamma-producing T cells. *J. Immunol.*, Aug 15;193 (4) :1728-36, 2014.

Tamura K., Ikutani M., Yoshida T., Tanaka-Hayashi A., **Yanagibashi T.**, Inoue R., Nagai Y., Adachi Y., Miyawaki T., **Takatsu K.**, and Mori H.: Increased production of intestinal immunoglobulins in Syntenin-1-deficient mice. *Immunobiology*. in press, 2015.

Yamamoto S., Niida S., Azuma E., **Yanagibashi T.**, Muramatsu M., Ting H.T., Sagara H., Higaki S., Ikutani M., Nagai Y., **Takatsu K.**, Miyazaki K., Hamashima T., Mori H., Matsuda N., Ishii Y., and Sasahara M.: Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Sci. Rep.*, 5, Article number:8505, 2015.

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

(2) 特許出願

名 称	出 願 ・ 公 開 番 号
抗齶蝕性口腔用組成物及び飲食品	特開2009-221191
抗歯周病性口腔用組成物及び飲食品	特開2009-219484
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	特願2012-43815
インフラマソーム活性制御剤	特開2014-94917
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)