

平成27年度富山県受託研究

和漢薬・バイオテクノロジー研究

研究成果報告書

国立大学法人

富 山 大 学

研究代表者 細 谷 健 一

目 次

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部長
まえがき 細 谷 健 一

I. テーラーメイド医療に資する抗体医薬・T細胞医薬 創出のための基盤技術の開発	1
I-1 T細胞ISAACの開発	3
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 教授 村 口 篤	
I-2 がん特異的T細胞検出システムの改良	6
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 助教 浜 名 洋	
I-3 T細胞抗原探索システムの開発	9
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸	
I-4 ウサギISAACを用いた抗体開発	11
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 助教 小 澤 龍 彦	
II. 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果と ペオニフロリン含有外用薬の開発	15
II-1 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害 改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験	17
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学) 応用薬理学 准教授 安 東 嗣 修	
II-2 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに 芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験	22
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 産婦人科学 教授 齋 藤 滋	

Ⅲ. 「富山県ブランド芍薬」の基盤・臨床研究	25
Ⅲ-1 腓返り（有痛性筋痙攣）に対する富山県ブランド芍薬含有芍薬 甘草湯の効果に関する臨床研究	28
富山大学・和漢医薬学総合研究所 漢方診断学分野 教授 柴原直利	
Ⅲ-2 シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究	33
富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野 教授 小松かつ子	

平成27年度

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部長 細谷 健一

まえがき

富山県からの受託研究「和漢薬・バイオテクノロジー」において、本年度は3つの研究課題に取り組みました。本報告書には、これら3つの研究課題に取り組んだ3研究班（村口研究班，安東研究班，柴原研究班）の平成27年度の研究成果が述べられています。

以下，その研究内容と研究者を紹介します。

村口研究班の研究テーマは、「テーラーメイド医療に資する抗体医薬・T細胞医薬創出のための基盤技術の開発」であり，本年度は，①T細胞ISAACの開発（村口篤氏），②がん特異的T細胞検出システムの改良（浜名洋氏），③T細胞抗原探索システムの開発（岸裕幸氏），④ウサギISAACを用いた抗体開発（小澤龍彦氏）について，各氏の研究成果を報告しています。

安東研究班の研究テーマは，「芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果とペオニフロリン含有外用薬の開発」であり，本年度は，①動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験（安東嗣修氏），②抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験（齋藤滋氏）について，各氏の研究成果を報告しています。

柴原研究班の研究テーマは，「『富山県ブランド芍薬』の基盤・臨床研究」であり，本年度は，①富山県産芍薬の品質評価にかかる臨床研究（柴原直利氏），②シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究（小松かつ子氏）について，各氏の研究成果を紹介しています。

これらの成果が，現場において活かされるまでには時間が必要と考えられますが，これらの基礎的研究における大学の知の創造と蓄積の成果が，現場の方々に学問的立場からの示唆を与え，やがて応用されていくことを，長い目で見守りたいと思います。そして，このような幅広い和漢薬やバイオテクノロジーの研究成果が，広く県薬業界にも還元され，その活性化につながることを期待します。

最後になりましたが，本研究の実施にあたり，絶大なご支援を頂いた富山県関係機関に深く感謝申し上げます。

平成27年度受託研究課題

班	研究者	研究課題
I T細胞医薬創出のための基盤技術の開発・ T細胞医薬創出のための基盤技術の開発・	I-1 村口 篤	T細胞 ISAAC の開発
	I-2 浜名 洋	がん特異的 T 細胞検出システムの改良
	I-3 岸 裕 幸	T 細胞抗原探索システムの開発
	I-4 小澤 龍彦	ウサギ ISAAC を用いた抗体開発
II 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果とペオニフロリン含有外用薬の開発	II-1 安東 嗣 修	動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験
	II-2 齋藤 滋	抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験
III 「富山県ブランド芍薬」の基盤・ 臨床研究	III-1 柴原 直 利	腓返り（有痛性筋痙攣）に対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の効果に関する臨床研究
	III-2 小松 かつ子	シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究

I. テーラーメイド医療に資する抗体医薬・ T細胞医薬創出のための基盤技術の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 教授 村口 篤

【背景・目的】

がんの治療法として、外科的手術、放射線治療、抗ガン剤治療などが一般的である。しかし、これらの治療に効果がみられない場合、免疫システムを用いた治療（ペプチドワクチン療法、抗体医薬、免疫細胞療法など）が試みられている。免疫システムは個々の患者により異なること、さらに、がんの性質も個々の患者で様々であることから、免疫学的治療は個々の患者に応じた治療、すなわち、テーラーメイド医療として行われることが望ましい。しかし、従来、がん患者のリンパ球を使って、がんの特異的な抗体やTリンパ球を取得するためには、2~3ヶ月を要していたことから、せっかくがんの特異的な抗体やTCRが取得できても、がんが進行してしまうため、元の患者の治療に応用することは困難であった。

我々は、近年、ヒトのBリンパ球から抗原特異的ヒト抗体を1週間弱で取得するシステム（ISAAC法）（図1）（Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012）を開発した。さらに、最近、抗原特異的T細胞受容体（TCR）を最短10日以内に検出・取得するシステム（hTEC10法）（図2）（Kobayashi E et al, 2013; Kobayashi E et al, 2014）を開発した。それぞれの技術は、世界的に権威のある科学雑誌Nature Medicineに発表し、大きな反響を生んだ。本研究では、これらの技術の事業への応用を視野に入れながら、これらの技術をさらに最適化することにより、個々の患者に最適な抗体医薬やTCR遺伝子を短期間で、しかも確実に取得・提供できるシステムを作り出すことを目的とする。

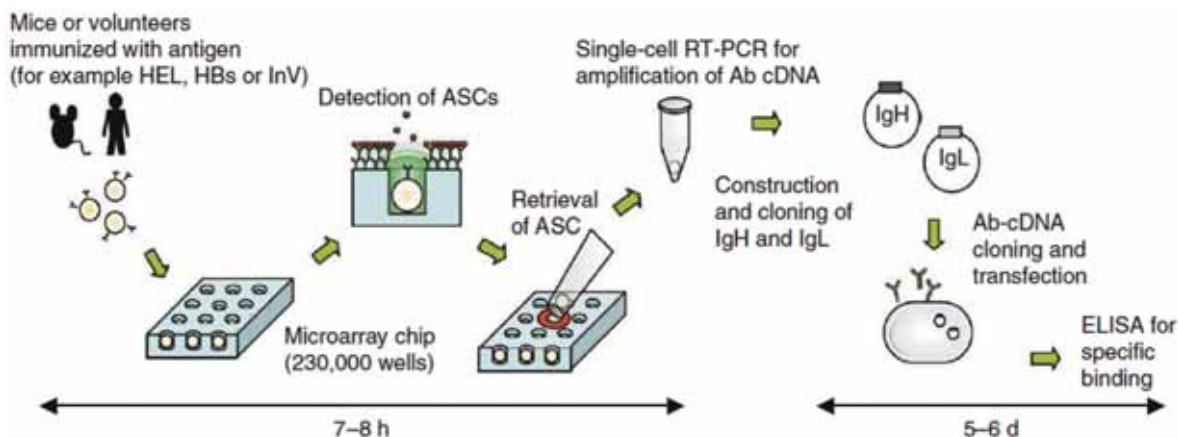


図1 ISAAC法（Jin A et al, Nature Medicine, 2009より転載）

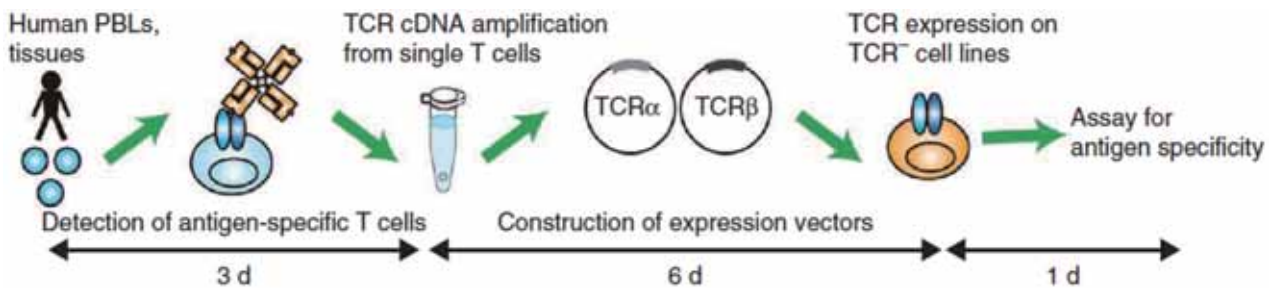


図2 hTEC10法 (Kobayashi E et al, Nature Medicine, 2013より転載)

【各班の概要】

村口は、ヒト末梢血T細胞を用いて、抗原ペプチドに特異的に反応し、サイトカインを産生する細胞を、細胞チップを用いて検出できることを示した。

浜名は、がん特異的 TCR を取得するために用いる hTEC10 法をさらに使いやすくするために、改良を施した。その結果、従来の hTEC10 法に較べて、さらに高率に TCR を増幅でき、取得した TCR が抗原に反応するかを、従来法では10日かかったのに比較して、改良した方法では、最短 4 日間で抗原特異性を検証できるようになった。

岸は、昨年度構築した抗原が未知の TCR の抗原を同定するためのレポータ細胞を用いて、モデルシステムで抗原が同定できる可能性を示した。

小澤は、ウサギ ISAAC システムを用いて、がんの増殖に関与する ErbB2, 特にリン酸化された ErbB2 分子に対する抗体を作製するために、ウサギを免疫し、ISAAC システムを用いてリン酸化 ErbB2 分子に対するウサギモノクローナル抗体を取得した。

【結論】

以上、各研究班は計画に沿って順調に成果を挙げている。本研究をさらに進めていくことで、がん患者のリンパ球から、がん治療のための TCR 遺伝子を迅速・確実に取得・作製することができるようになり、がん治療用の抗体医薬の作製も進展すると期待される。これらの医療材料を元の患者の治療に応用することができるようになれば、がんの免疫学的テーラーメイド治療が可能になると期待される。

I - 1 T細胞 ISAAC の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 教授 村口 篤

【目的】

我々が最近開発した、hTEC10法は、フローサイトメータを用いて、ペプチド刺激に反応してサイトカインを産生するTリンパ球を検出することにより、抗原ペプチド特異的Tリンパ球を検出することができる (Kobayashi E et al, 2013)。しかし、その感度は高くなく、頻度の低いウイルス等の抗原に特異的なTリンパ球はバックグラウンドノイズの中に埋もれてしまい、ヒト末梢血リンパ球中において、抗原特異的Tリンパ球を直接検出することは困難であった。そのため、抗原ペプチド特異的Tリンパ球を検出するためには、2週間程度リンパ球をウイルス等の抗原で刺激しながら培養し、抗原特異的Tリンパ球を増殖させてから、検出する必要があった。我々は、最近、予備的検討にて、Bリンパ球に応用していたISAAC法 (Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012) で用いた細胞チップをT細胞に応用すると、*in vitro*での培養を必要とせずに、ヒトより調製した末梢血Tリンパ球から直接ウイルス等の抗原に特異的なT細胞を検出できることを示唆するデータを得ている。今後、細胞チップを用いて抗原特異的T細胞を検出する方法をT細胞ISAAC法と呼ぶこととする。本研究では、hTEC10法とT細胞ISAAC法の良い点を組み合わせて、より感度の高い、抗原特異的Tリンパ球の検出する方法を確立することを目的とする。今年度は、ヒト末梢血リンパ球の中から、細胞チップを用いて、抗原特異的Tリンパ球を検出できるか検証することを目的に研究を行った。

【方法】

1) 細胞チップ

図1に示すように、ちょうどリンパ球が1個入る大きさ・形状の微小ウェルが規則正しく約4.5万个から23万個、1×2cm四方の範囲に配置されたチップ (マイクロウェルアレイチップ) を用いた。

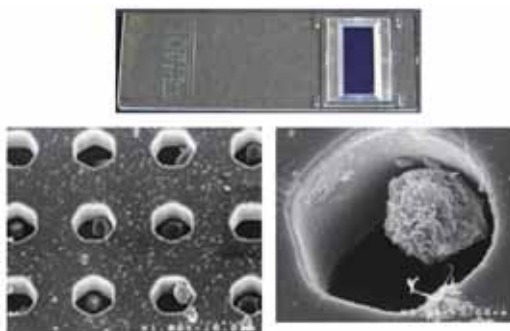


図1 マイクロウェルアレイチップ

(上) マイクロウェルアレイチップの全体像。

(下左) 拡大したマイクロウェルの電子顕微鏡像。

(下右) 1リンパ球が1ウェルに入っている電子顕微鏡像。

2) ヒト末梢血リンパ球由来 T 細胞

ポジティブコントロールとして、これまでに EB ウイルスの BRLF-1 由来 T 細胞の存在をフローサイトメトリーにて確認している HLA-A24 陽性の健常人ボランティア B の末梢血リンパ球を用いた。末梢血リンパ球は、ヒト CD8+ T リンパ球分離キット (EasySep, Stemcell 社) 用いて CD8 陽性 T 細胞を分離し、T 細胞 ISAAC に用いた。

3) T 細胞-ISAAC

細胞チップの表面にヒト IFN- γ 特異的抗体をコートし、その後、余分なタンパク質が非特異的に結合しないようにブロッキングを施した。このように前処理した細胞チップに、生きたヒト末梢血由来 CD8 陽性 T 細胞を播種し、ウェルに入らなかった余分な細胞を洗い去り、生きた T 細胞を各ウェルに 1 個ずつ配置させた。その後、チップ上に抗原である BRLF-1 由来ペプチドを加え、約 6 時間培養した。この 6 時間の間に T 細胞が抗原で刺激され、IFN- γ を分泌する。分泌された IFN- γ はウェルからチップ表面へ拡散していき、チップ表面にコートされた IFN- γ 特異的抗体にトラップされる。次に、蛍光標識した別の IFN- γ 特異的抗体を加え、チップ表面にトラップされている IFN- γ に結合させた。その蛍光標識 IFN- γ 特異的抗体の結合を蛍光顕微鏡で観察した。

【結果と考察】

1) T 細胞 ISAAC 法による BRLF-1 特異的 T 細胞の検出

健常人ボランティア B の末梢血リンパ球より分離した CD8 陽性 T 細胞を、IFN- γ 特異的抗体をコートしたマイクロウェルアレイチップに播種した。次に、チップ上の細胞に EB ウイルス由来 BRLF-1 ペプチドあるいは LMP2 ペプチドを添加し、6 時間培養した。培養後、IFN- γ を分泌した細胞のスポットを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。図 2 に示すように、未刺激あるいは LMP2 ペプチドによる刺激では IFN- γ 分泌のスポットは観察されなかった。一方、BRLF-1 ペプチドで刺激した細胞では IFN- γ

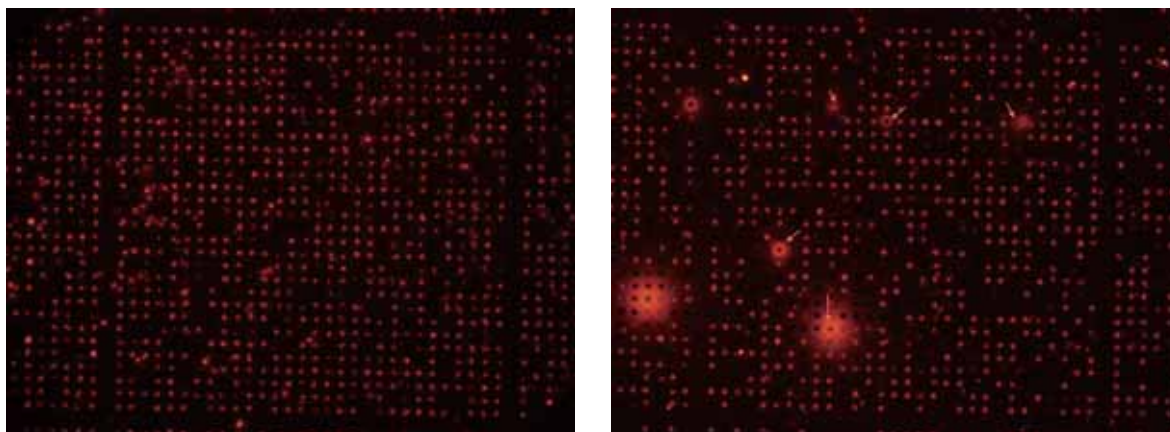


図 2 抗原に応答してサイトカインを分泌するヒト T リンパ球の、T 細胞 ISAAC 法を用いた検出。
左：LMP2 ペプチド刺激。右：BRLF-1 ペプチド刺激。

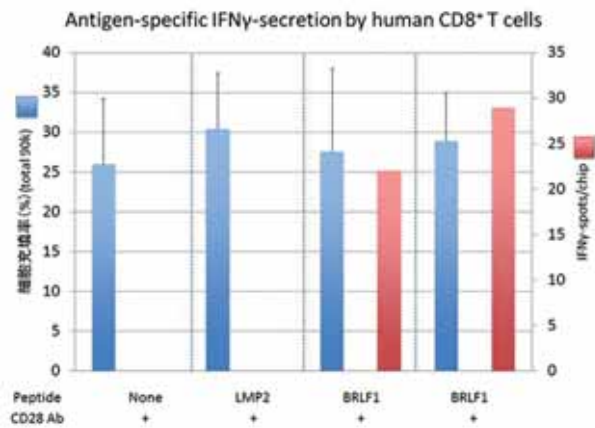


図3 抗原特異的サイトカイン分泌ヒト T 細胞の T 細胞 ISAAC 法による検出

マイクロウェルアレイチップ上に播種したヒト CD8+ T 細胞を LMP2 ペプチドあるいは BRLF-1 ペプチドで刺激し、IFN- γ 分泌のスポットを観察・計数した。

青色カラム：細胞充填率。赤色カラム：IFN- γ 分泌スポット数。

分泌のスポットが観察された。スポットを計数した結果を図3に示す。これまでに、ペプチド/HLA-A24分子複合体のテトラマーを用いて、フローサイトメトリーにて解析した結果では、健常人ボランティア B の CD8 陽性 T 細胞では、BRLF-1 特異的 T 細胞は検出されたが、LMP2 特異的 T 細胞は検出されていなかった。したがって、T 細胞 ISAAC を用いて抗原特異的 T 細胞を検出した結果と、フローサイトメトリーを使って抗原特異的 T 細胞を検出した結果は、同様であることがわかった。

【結論と今後の展望】

以上の結果より、ヒト T リンパ球を用いて、抗原に特異的に反応する CD8 陽性 T 細胞を、T 細胞 ISAAC 法にて検出できることが明らかになった。

フローサイトメータを用いたサイトカイン分泌細胞の検出では、バックグラウンドノイズが観察され、抗原ペプチドに反応する細胞の頻度が低い場合、特異的なシグナルがバックグラウンドノイズに埋もれてしまう。そのため、生体から単離したリンパ球を直接用いた解析では、抗原特異的 T 細胞をフローサイトメトリーを用いて検出することは困難であり、抗原特異的 T 細胞をフローサイトメトリーを用いて検出するためには、T 細胞を2週間ほど抗原ペプチドで刺激し増殖させる必要があった。T 細胞 ISAAC 法による解析では、抗原非特異的なスポットは全く観察されなかったことから、フローサイトメータによる解析に比べて、T 細胞 ISAAC 法のバックグラウンドノイズはほとんど0に近く、存在頻度の低い抗原特異的 T 細胞も検出できる。今後は、T 細胞 ISAAC 法を用いて、抗原特異的 T 細胞を検出し、その TCR を取得することができるか、検証していく予定である。

I - 2 がん特異的T細胞検出システムの改良

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 助教 浜 名 洋

【目的】

我々が、最近 Nature Medicine に報告した hTEC10 法は、既知の抗原ペプチドに反応する T 細胞を同定し、その T 細胞受容体 (TCR) を取得する方法である (Kobayashi E et al, 2013)。T 細胞の抗原ペプチドは、抗原提示細胞上に発現している human leukocyte antigen (HLA) 分子の上に結合して、細胞表面に提示される。現在の研究・臨床試験の主流は、既知の抗原ペプチド特異的 T 細胞を用いたがん免疫療法が主体である。

HLA 分子は多型性に富んだ分子であり、各個人により、そのアミノ酸配列 (ハプロタイプ) が異なる。特に、ペプチドが結合する部分および TCR と相互作用する部分のアミノ酸配列が異なる。その結果、ハプロタイプが異なると、HLA 分子上に結合するペプチドも異なってくる。HLA のハプロタイプは民族によっても偏りがある。その結果、日本なら日本、欧米なら欧米で多いハプロタイプに研究が偏る傾向がみられる。すなわち、日本では、HLA-A24 分子に結合するペプチドおよびそれに反応する T 細胞の解析が主であり、欧米では、HLA-A2 分子に結合するペプチドおよびそれに反応する T 細胞の解析が主である。従って、がんの免疫療法においても、HLA-A24 あるいは HLA-A2 以外のハプロタイプを持つ患者はがん免疫療法の恩恵に与ることができない。

一方で、現在、がん抗原ペプチドが特定されていないがんが多数存在し、そのようながんに反応する TCR を取得し、治療に応用したいという高いニーズがある。本研究では、hTEC10 法を改良し、抗原が未知のがんに反応する TCR を取得できるシステムを構築することを目的とする。

今年度は、TCR cDNA を増幅するための RT-PCR 法の改良、およびクローニングした TCR の抗原特異性を迅速・簡便に検証するシステムの開発を行うことを研究目的とした。

【方法と結果】

1) TCR cDNA を増幅するための RT-PCR 法の改良

従来の hTEC10 法では、5'-RACE 法を用いて TCR cDNA の増幅を行っていたが、逆転写反応が不完全な cDNA の増幅も起きるため、それを取り除く作業が必要となり、煩雑となっていた。そこで、TCR の Leader 配列を基に作製した Primer (Leader primer) を用いた Multiplex PCR 法による TCR cDNA の増幅を検討した。primer の配列は IMGT (www.imgt.org) より取得した TCR α および TCR β の Leader

配列を基に設計した。Leader primer として、ヒト TCR α および β に対して、それぞれ41種類および39種類を作成し、これら全ての primer と TCR の定常領域の primer の混合 primer を用いて単一 T 細胞の RT-PCR を行った。その結果、不完全な cDNA の増幅が無くなり、PCR 産物をダイレクトに解析することが可能となった (図 1)。マウスの TCR に関しても同様に Leader primer を作成し、TCR cDNA の増幅が単一長の PCR 産物として可能となっている。

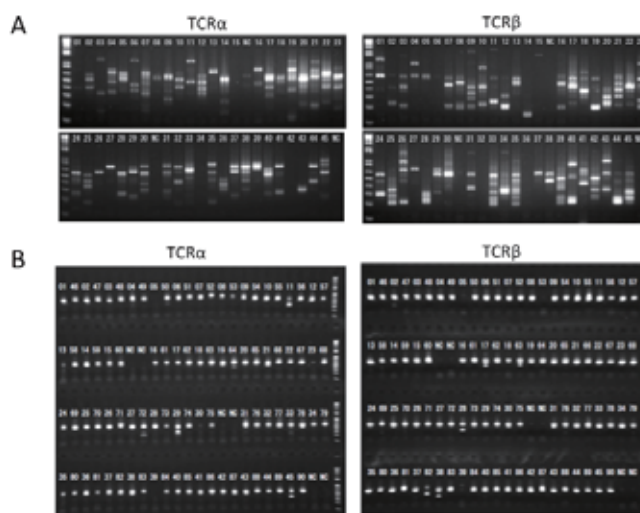


図1. ヒトTCR cDNAの増幅例

A: 従来のhTEC10の5'-RACE法により得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果。
 B: Leader primerを用いたMultiplex PCR法により得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果。改良した方法では、完全なcDNAが単一バンドとして得られる。

2) TCR の抗原特異性を検証するシステムの開発

従来の hTEC10 法では、T 細胞株にレトロウイルスベクターを用いてクローニングした TCR 遺伝子を導入して発現させ、その抗原特異性を解析していた。レトロウイルスの作製は工程数が多く、手間と時間を要するため、より迅速で簡便に TCR の抗原特異性を検証できるシステムが必要となっていた。そこで新しい方法として、遺伝子導入が容易な HEK293T 細胞 (ヒト胎児腎由来細胞) を用いて TCR の抗原特異性を検証できるシステムを作製した。

まず、TCR の活性化をルシフェラーゼの発現誘導でアッセイ可能な 293T-Luc 細胞を作製した。この細胞は、HEK293T 細胞に NFAT-Luciferase, ヒト CD3 ($\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ の 4 種類), ヒト SYK, ヒト NFAT-C2, ヒト CD8 α , マウス CD8 α およびマウス CD8 β の遺伝子を導入した細胞である (図 2)。TCR 遺伝子の導入には Transcriptionally active PCR (TAP) で作製した TAP Fragment を用いた。TAP fragment は、5' 端に CMV の promoter, 3' 端に TK polyA 付加シグナルを PCR により付加した直鎖 DNA で、プラスミドベクターと同様に cDNA からタンパク質を発現させる事が可能である。

ヒト末梢血リンパ球より、EB ウィルス由来ペプチド BRLF-1 と HLA-A24 分子の複合体テトラマーを用い

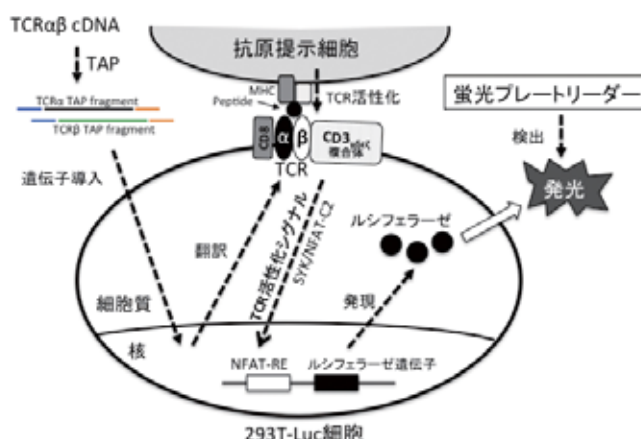


図2 293T-Luc mCD8を用いたTCRの抗原特異性の検証

TCR α およびTCR β のTAP fragmentを遺伝子導入試薬で細胞にTransfectionしてTCRを発現させ、抗原提示細胞と共培養する。TCRが活性化されるとルシフェラーゼの発現が誘導され、細胞内にルシフェラーゼが産生される。細胞を溶解し基質を加え、発光を測定しTCRの活性化の有無を判定することで、TCR抗原特異性を検証する。

て回収した T 細胞より、TCR cDNA を単一細胞レベルで回収し、今回作製したシステムを用いて、取得した TCR の抗原特異性を検証した。

その結果、図 3 に示すように、抗原特異的な反応が観察された。また、メラノーマ関連抗原 TRP2 ペプチドで刺激したマウスの脾臓リンパ球より TCR cDNA を回収し、同様に今回作製したシステムを用いて、取得した TCR の抗原特異性を検証した。図 4 に示すように、TRP2 特異的 TCR を取得することができた。以上、TAP fragment を用いることで、TCR を発現可能な DNA を、PCR 産物から大腸菌を用いずにダイレクトに調整することが可能になり、より簡便で迅速な解析が可能となった。

【考察と今後の展望】

本年度は、hTEC10 の RT-PCR およびクローニングした TCR の抗原特異性を検証する方法の改良を行った。RT-PCR 法の改良により、作業の工程数が半分以下になり、一度に扱えるサンプル数は 2 倍以上になった。また、活性化されていない T 細胞からも増幅が可能となり、増幅効率の向上も認められた。そして、新たに作製した 293T-Luc 細胞と TAP fragment を用いた抗原特異性の検証システムを用いることで、迅速に（最短 4 日間）、そして簡便に抗原特異的なヒトおよびマウスの TCR 遺伝子の取得が可能となった。

今後は、複数のマウスから取得した TRP2 特異的 T 細胞から、抗原特異的な TCR 遺伝子の取得を行い、プロトコルの最適化と実用性を検証していく予定である。

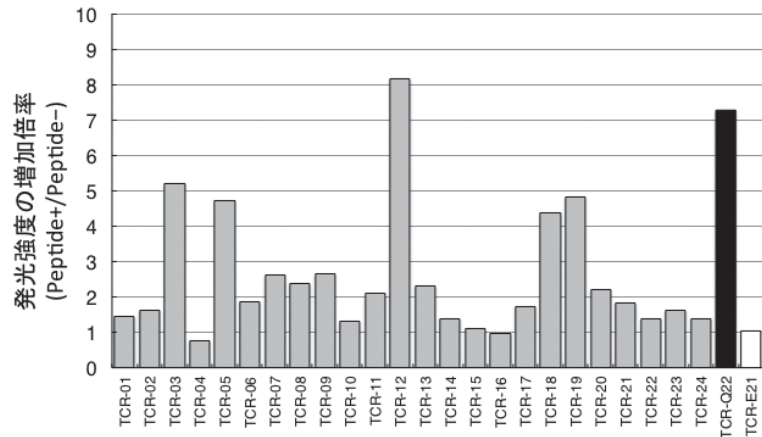


図3 ヒトTCRの抗原特異性の検証

健康人の末梢血リンパ球からEBV BRLF1 peptide/HLA-A24複合体テトラマーを用いてFACSで得たT細胞サンプルを用いて解析を行った。24個のT細胞からRT-PCRによって得られたPCR産物からTAP fragmentを作成し、293T-LucへFuGENE 6で遺伝子導入した。TCR遺伝子を導入した293T-Lucを抗原提示細胞(BRLF1 peptideをパルスしたT2-A24細胞)と共培養した後、ルシフェラーゼアッセイを行った。TCR-Q22はポジティブコントロール、TCR-E21はネガティブコントロール。発光強度の増加倍率が2以上であれば抗原特異的なTCR遺伝子が得られている。

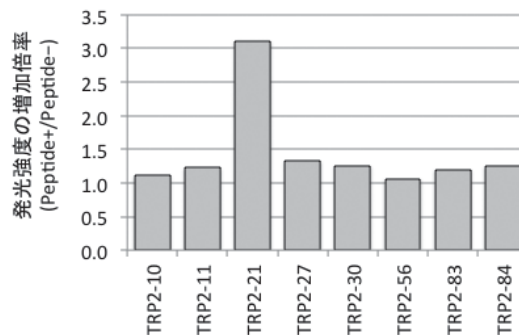


図4 マウスTCRの抗原特異性の検証

マウス脾臓細胞をメラノーマ関連抗原TRP2のpeptideで刺激後、TRP2 peptide/H2Kb複合体テトラマー陽性細胞をFACSでソーティングして得られたT細胞を用いて解析した。8個のT細胞から作製したTCRαおよびTCRβのTAP fragmentを293T-LucへTransIT-293を用いて遺伝子導入し、TRP2 peptideおよびEL4細胞で刺激して、ルシフェラーゼアッセイを行った。TRP2-21がTRP2特異的なTCRであることが確認された。

I - 3 T細胞抗原探索システムの開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸

【目的】

がんの免疫学的治療において、新規がん抗原の同定が喫緊の課題である。いかに良い標的を選択するかが、がんの免疫学的治療の成否を握っているからである。現在、用いられている T 細胞の抗原の同定法は非常に複雑な方法で、その時々で、トライアンドエラーで、最適な方法を探しながら行う必要がある。我々は、本研究において、非常にシンプルで確実に機能する「T 細胞抗原探索システム」を開発する。この新規システムの開発により、がん抗原をシンプルに再現性良く同定できれば、新たながんワクチンの開発やがんのテーラーメイド医療にも貢献できる。

今年度は、モデルシステムとして、EB ウイルス由来ペプチドに反応する T 細胞受容体を用い、抗原 cDNA をコントロール cDNA で希釈し、どの程度の頻度の cDNA 由来の抗原を同定できるかを検証する。

【方法と結果】

図1に示すように、HLA-A24 cDNA の細胞質部分を CD3 ζ 鎖の細胞質部分と置換した、HLA-A24/ ζ キメラ遺伝子を作製し、TG40 細胞に遺伝子移入した細胞をレポーター細胞として使用した。

次に、BRLF-1 ペプチドを発現するレトロウイルスベクターを作製した。そのベクターを空のウイルスベクターで希釈し、1倍、10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍の希釈系列を作り、レポーター細胞に導入した。

導入したレポーター細胞を、BRLF-1 特異的 TCRを発現した T 細胞株と共に一晩培養し、活性化マーカー (CD137) の発現を解析した。

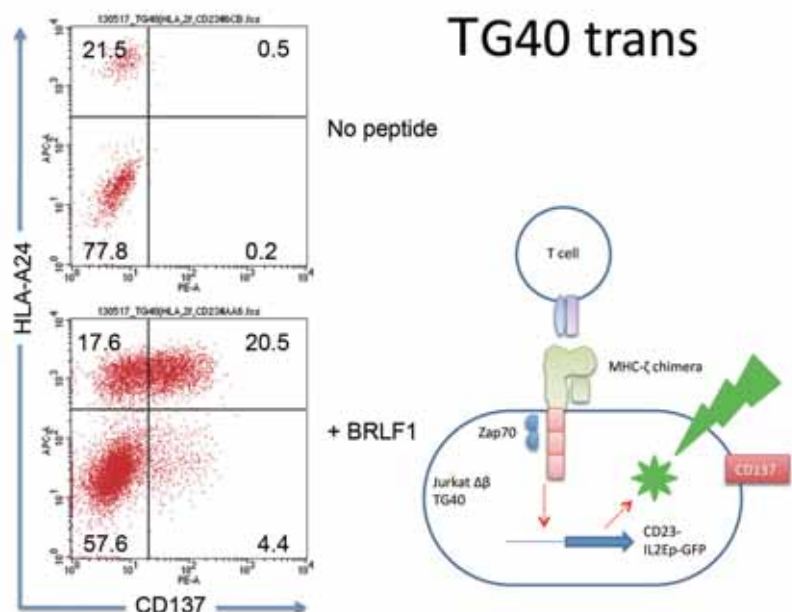


図1 抗原特異的 T 細胞によるレポーター細胞の活性化

その結果、図2に示すように、 10^4 分の1の頻度で抗原ペプチド発現ベクターがレポーター細胞に導入された場合にも、CD137の発現が特異的に増強することが確認された。

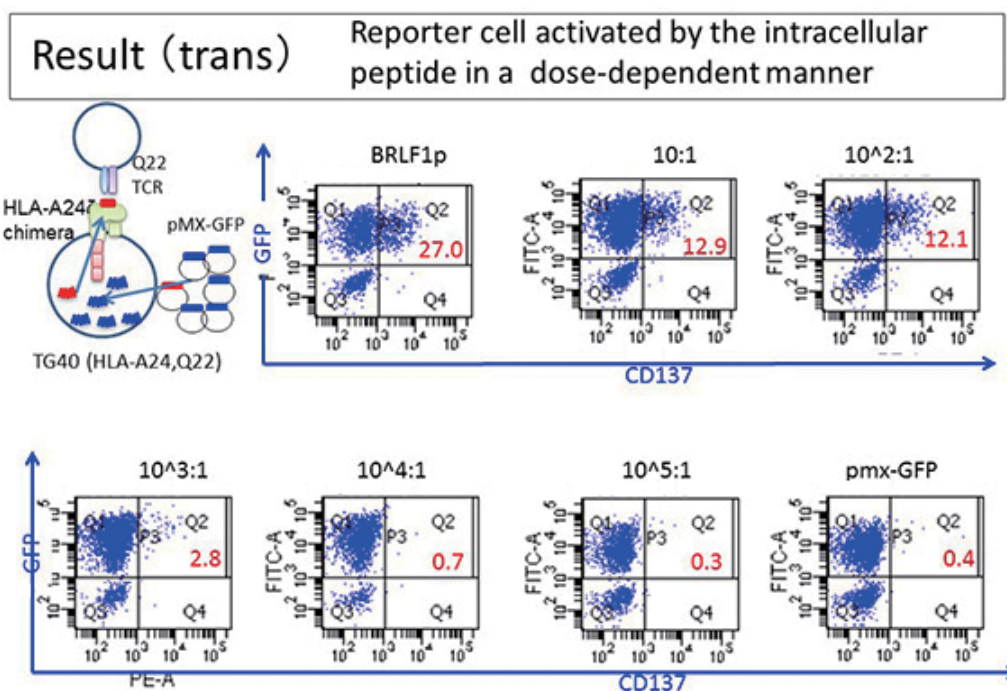


図2 抗原ペプチドベクターの希釈系列に対するレポーター細胞の反応

【考察と今後の展望】

実際に、cDNA発現型ライブラリーを作製して抗原のスクリーニングを行う時には、 10^5 程度の独立したクローンを含むライブラリーを作製する必要があることが明らかとなった。今回の結果は、 10^4 個に1個の割合で目的のクローンが存在していれば、レポーター細胞を用いて目的の抗原cDNAを検出できることを示している。従って、 10^5 個のライブラリーを、 10^4 個を1グループとして10グループに分け、それらを解析すれば、目的の抗原が同定できる可能性があるということであり、十分実現可能なシステムが構築できたと考えられる。

今回の結果より、作製したレポーター細胞を用いることで、ペプチド発現ライブラリーより、目的のTCRの抗原ペプチドが同定される可能性が示された。今後、実際のライブラリーを作製して、抗原cDNAが取得できるか、検証していきたい。本研究により、シンプルで信頼性の高い抗原探索システムを作製することができれば、新規がん抗原を同定し、より効果の高いがんワクチンを製造することが可能になる。さらに、個々の患者におけるがん抗原を同定することにより、がんのテーラーメイド医療にも貢献すると期待される。

I - 4 ウサギ ISAAC を用いた抗体開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 助教 小澤 龍彦

【目的】

ウサギの抗体はマウスなどの抗体に較べて、抗原に非常に特異的かつ強力に結合することが知られている。がんの治療においても、がんの特異的に、かつ強力に結合する抗体の開発が必要とされている。我々は、最近、細胞チップを用いて、ウサギ由来モノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に取得する「ウサギ ISAAC 法」を開発した (Ozawa T et al, 2012)。本研究では、「ウサギ ISAAC 法」を用いて、がん抗原に対するウサギモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いてがん細胞の傷害や検出法などに応用可能か検証する。

チロシンキナーゼ型受容体である ErbB2 は乳がん細胞などのがん細胞で過剰に発現し、がん細胞の増殖に関与している。そのため、ErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、ErbB2 の活性調節機構の解明は、分子標的薬に対する感受性や耐性獲得などに関する重要な知見となる。中でも677番目のスレオニン残基 (ErbB2-Thr677) のリン酸化は、ErbB2 シグナルの下流のERK活性に関与している可能性が示唆されており、このErbB2-Thr677のリン酸化を測定することは、ErbB2 の活性評価につながる。

そこで今回我々は、ErbB2-Thr677のリン酸化を特異的に認識できるウサギモノクローナル抗体を作製し、本抗体を用いた乳がん患者の組織染色などから、がん細胞分子標的薬に対する感受性や悪性化の予測プロトコルの確立を目指す。

【方法】

平成26年度までに、ErbB2 由来リン酸化ペプチド (p-ErbB2pep) をウサギに免疫し、その血漿を用いた解析より p-ErbB2pep 特異的抗体が誘導されていることが示唆されていた。そのウサギ由来末梢血リンパ球を用いて ISAAC 法による ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体産生細胞の検出を行った。ISAAC 法は Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている方法に従って行った。まず、保存していた末梢血リンパ球より、抗ウサギ IgG マイクロビーズ (ミルテニーバイオテク社) と AutoMACS Pro separator (ミルテニーバイオテク社) を用いて IgG 陽性細胞を濃縮した。リンパ球チップ (立山科学) の表面に 1 µg/ml の抗ウサギ IgG Fc抗体 (MP Biomedicals) を乗せ 4°Cで一晩インキュベーションし固相化させた。翌日リンパ球チップの表面をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、0.01%のり

ピディア（日本油脂）を乗せ、室温で1時間インキュベーションし、ブロッキングした。濃縮したIgG陽性細胞をリンパ球チップに播種し、10% FCSを含むRPMI1640培地にて37°C、5% CO₂の条件下で3時間培養した。培養後、細胞チップをPBSで緩やかに洗浄し、10μg/mlの非リン酸化ErbB2由来ペプチド（ErbB2pep, オペロンバイオテクノロジーズ, 配列：EPLTPSGAMP）を加えて室温で30分インキュベーションし、ErbB2pepに結合する抗体をブロッキングした。その後PBSで軽く洗浄し、ビオチン標識したp-ErbB2pep（オペロンバイオテクノロジーズ, 配列：EPLpTPSGAMP, pTはリン酸化スレオニン）を加えて室温で30分インキュベーションした。その後PBSで軽く洗浄し、1μg/mlのCy3標識ストレプトアビジン（シグマ-アルドリッチ）を加えて室温で30分インキュベーションし、p-ErbB2pep抗体産生細胞の検出を行った。その後PBSで洗浄し、1μMのCell Trace Oregon Green（モレキュラープローブ）を加えて室温で5分インキュベートし、細胞を染色した。染色したリンパ球チップを蛍光顕微鏡（BX51WI, オリンパス）で観察し、マイクロマニピュレーター（TransferMan NK2, エッペンドルフ）を用いて細胞の回収を行った。回収した個々の細胞由来の抗体遺伝子の増幅は、Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている single-cell RT-PCR 法に従った。

【結果及び考察】

2.8 x 10⁶ 個の末梢血リンパ球より9.4 x 10⁵ 個のIgG陽性細胞を集めた。ISAAC法を用いて抗p-ErbB2pep抗体産生細胞の検出を行った結果、細胞チップに充填できたおおよそ3万個のIgG陽性細胞より50個（0.15%）の細胞でスポットが観察され、これらスポットより29個の細胞を回収した（図1）。これら細胞の抗体遺伝子の増幅を行った結果、20個の細胞より抗体遺伝子のH鎖とL鎖の両方の可変領域を得た（図2）。

【結論と今後の展望】

p-ErbB2-pepを免疫したウサギ由来末梢血リンパ球より、多数のp-ErbB2pep特異的スポットが観察され、これらの細胞から多くの抗体遺伝子を得る事ができた。今後この遺伝子をクローニングして抗体を作製し、抗原であるp-ErbB2pepと結合するかの検証を行う。

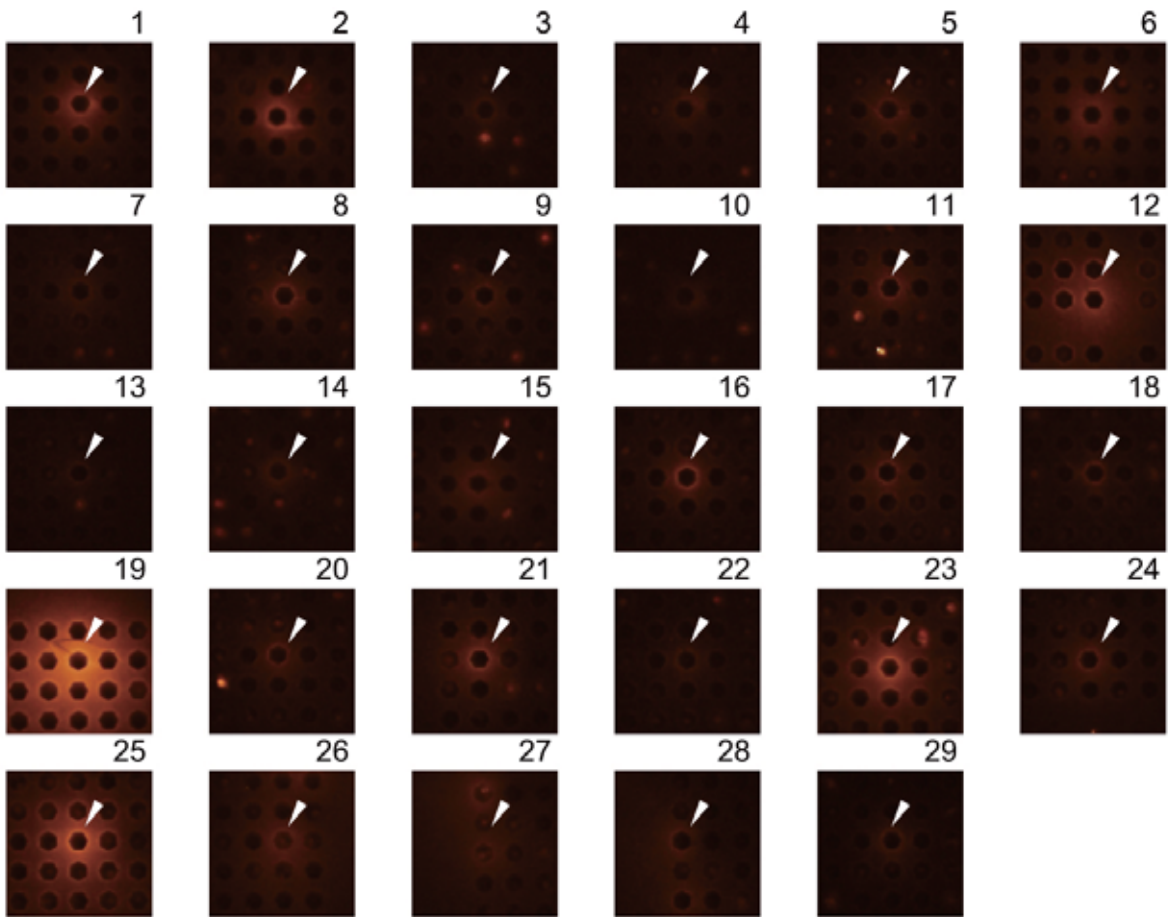


図 1 ISAAC にて検出し、細胞が回収できたスポット

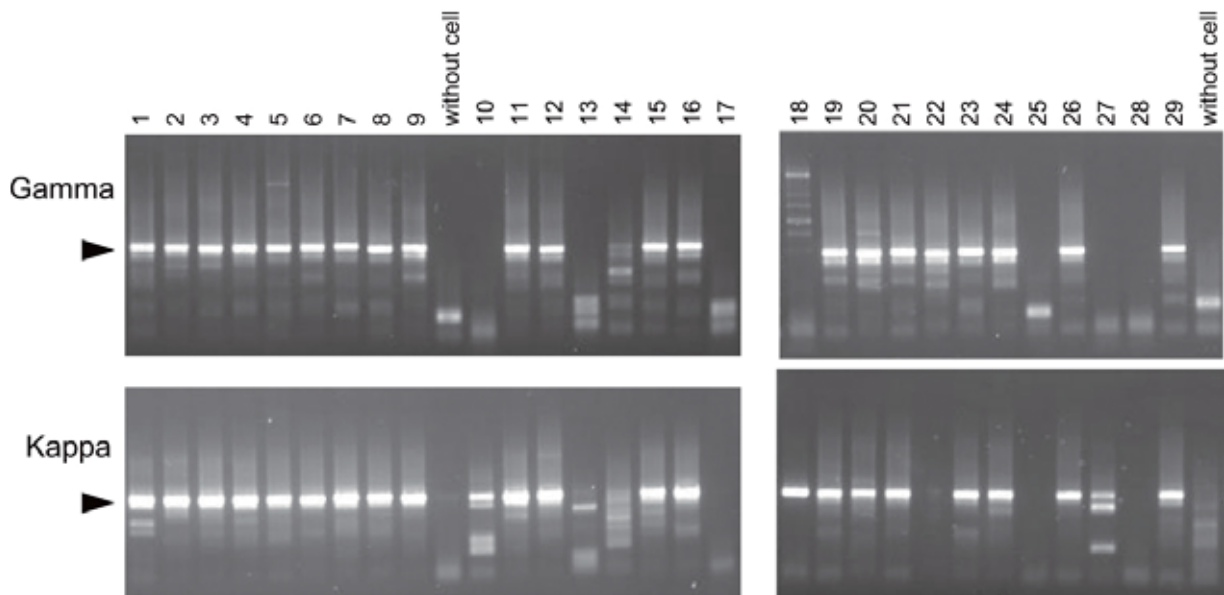


図 2 回収した細胞を用いた抗体遺伝子の増幅

【参考文献】

- 1 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., *Kishi H. and Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nature Medicine*, 15:1088-1092, 2009.
- 2 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kishi H., Muraguchi A. Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nature Protocol* 6:668-676, 2011.
- 3 Kishi H., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Muraguchi A. Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. *Methods Mol Biol.* 853:141-150, 2012.
- 4 Ozawa T., Piao X., Kobayashi E., Zhou Y., Sakurai H., Andoh T., Jin A., Kishi H., Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. *PLoS One.* 7:e52383, 2012.
- 5 Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nature Medicine*, 19:1542-1546, 2013.
- 6 Kobayashi E., Kishi H., Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology.* 3:e27258, 2014.
- 7 Kobayashi E., Kishi H.*, Ozawa T., Horii M., Hamana H., Nagai T., Muraguchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444: 319-324, 2014.
- 8 Mou Z, Li J, Boussoffara T, Kishi H, Hamana H, Ezzati P, Hu C, Yi W, Liu D, Khadem F, Okwor I, Jia P, Shitaoka K, Wang S, Ndao M, Petersen C, Chen J, Rafati S, Louzir H, Muraguchi A, Wilkins JA, Uzonna JE. Identification of broadly conserved cross-species protective Leishmania antigen and its responding CD4⁺ T cells. *Science Translational Medicine.* 7: pp. 310ra167, 2015.

II. 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果と ペオニフロリン含有外用薬の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）

応用薬理学 安東 嗣 修

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）

産婦人科学 齋藤 滋

抗がん薬投与による生じる非常に耐えがたく、投薬中止あるいは終了後も引き続き症状が継続する副作用に末梢神経障害【痛みやしびれなど耐え難い不快感覚など】がある。この末梢神経障害をコントロールできる予防・治療薬が無いのが現状である。これまでに漢方方剤 芍薬甘草湯が、臨床及び動物実験において抗がん薬の末梢神経障害のコントロールへの有用性が見出されてきた。抗がん薬による末梢神経障害は、「手袋一靴下型」の形成分布を示す。つまり、四肢末端で認められることを特徴とする。漢方方剤は、毎日の服用に難色を示す患者や嚥下困難な患者もいることから、その継続使用は患者本人や介助者にとって負担が大きい。そこで、末梢神経障害が、四肢末端で起こることに着目し、外用薬開発を目指している。その中で、芍薬成分のペオニフロリンに着目し、本研究では、その外用効果を検討してきた。また、臨床においては、芍薬成分の外用を目指し、がん患者における抗がん薬による末梢神経障害への芍薬甘草湯の効果の評価法の確立を含め検証してきた。

【各班のまとめ】

1. 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討と ペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験（応用薬理学：安東嗣修）

マウスを用いて抗がん薬パクリタキセル投与により機械的アロディニア（健常状態において非侵害性である刺激に対して、過敏に反応する状態）を形成する動物モデルを作製した。これまでに、芍薬成分のペオニフロリンをパクリタキセル投与翌日より繰り返し塗布することで、機械的アロディニアの形成を抑制することを見出した。そこで、既に機械的アロディニアが形成された状態でのペオニフロリンの単回外用の効果を検討したところ、アロディニアの抑制効果は認められなかった。このことは、ペオニフロリンの外用の急性効果は期待できないことが分かった。次に、ペオニフロリンの繰り返し外用の局所効果を検討した。パクリタキセル誘発の機械的アロディニアは、アロディニアの評価部位である両後肢足蹠で観察される。ペオニフロリン塗布側では、パクリタキセルによる機械的アロ

ディニアの形成は抑制されたが、反対側では抑制効果が認められなかった。このことは、ペオニフロリンの効果が塗布部局所のみ認められることを示唆する。更に本研究では、臨床で用いられる芍薬甘草湯の甘草の役割についても検討した。甘草成分のグリチルリチン酸は、単独の繰り返し塗布ではパクリタキセル誘発機械的アロディニアを抑制しなかったが、ペオニフロリンの効果を増強することを見出した。従って、甘草との構成は疼痛抑制に意義あると考えられる。

今回の研究では、ペオニフロリンの含有量の多い富山県産芍薬を用いて、これまで用いてきた他県産の芍薬との比較研究を行った。それぞれのエタノール抽出エキスの繰り返し塗布により、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成は抑制されたが、富山県産の方がより効果が大きかった。

以上本研究により、ペオニフロリンの外用は、塗布局所で効果を発揮することが明らかにし、甘草成分のグリチルリチン酸との併用によりその効果が増大することを見出した。この成果は今後製剤開発にとって重要な情報となると考えられる。また、ペオニフロリン含有量の多い富山県産芍薬は、これまで使用してきた市販の他県産の芍薬より有用であることが明らかとなった。

2. 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験（産婦人科学：齋藤 滋）

富山大学臨床研究倫理審査に筋電計による神経伝達速度測定およびサーモグラフィーによる末梢温度測定を症例患者に対して行う研究承認を得ることができ、測定を開始した。本年度は症例9名に対して、神経伝達速度ならびに手の末梢温度測定を行い、運動神経伝導速度と手の末梢温度に正の相関が認められた。タキソール投与により、投与前後（投与前と投与後7日目）で、運動神経伝導速度にはタキソールの影響は認められなかったが、末梢温度の低下が認められた。芍薬甘草湯の評価ができた症例5名では、投与前後で（投与前と投与後7日目）、運動神経伝導速度には芍薬甘草湯は影響しなかったが、末梢温度のタキソール投与による低下は芍薬甘草湯の投与により改善された。現在、症例数をさらに増やすべく、測定を行っているが、今回の結果らは芍薬甘草湯がタキソールの副作用に由来する末梢温度低下を改善することを見出した。

3. その他（応用薬理学：安東嗣修）

本製剤開発に向け、

- ①富山県くすり政策課職員（担当：藤岡）、本学リエゾンオフィス職員（担当：金田、今川）と共に富山県内製薬関連企業と面談を行った。
- ②日本薬理学会年会にて「創薬オープンイノベーション企画」にて、製薬企業との個別面談を行った。
- ③富山県くすり政策課、富山県薬事研究所、富山大学薬学部（応用薬理学）・医学部（産婦人科学）、和漢薬研究所（生物資源科学）、富山大学リエゾンオフィスの合同会議を行った。

Ⅱ－１ 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる 末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有 外用薬の開発の前臨床試験

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学） 応用薬理学
准教授 安 東 嗣 修

【研究目的】

抗がん薬は、がん患者の治療にとって必要不可欠なものである。しかし、抗がん薬の副作用は、がん患者の闘病に対する意識の減弱につながる。特に、QOL（生活の質）に関わる重大な副作用の代表に嘔吐や末梢神経障害があげられる。嘔吐に関しては、セロトニン 5-HT₃ 受容体やニューロキニン 1 受容体の拮抗薬が顕著な予防・治療効果を示す。一方、末梢神経障害【異常感覚(痛みや痺れなど)】は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬ではそのコントロールが難しく、抗がん薬投与中止後も 1 年以上その症状が続く。従って、新規治療薬および予防薬の開発が必要となっている。

芍薬甘草湯は、芍薬と甘草から構成された漢方方剤であり、筋肉痛等様々な疼痛に用いられている。近年では、糖尿病性末梢神経障害にも有効であることが報告されている。また、抗がん薬投与患者の末梢神経障害にもその有用性が認められてきている。抗がん薬誘発の末梢神経障害は、「手袋一靴下型」の発症分布を示し、つまり、四肢末端でその障害が認められる。我々は、これまでに、抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛のマウスモデルを作出し、芍薬甘草湯の抗がん薬投与翌日からの 1 日 1 回経口投与で抗がん薬誘発機械的アロディニア（機械的アロディニア：健常では全く感じない外部刺激＜本実験では細いフィラメントによる触刺激＞）に対して、病態時に非常に激しい過敏状態になること）の発生を抑制すること、更に、この抑制効果が電気生理学的解析により末梢レベルで行われていることを明らかにしてきた。また、芍薬及び甘草のエタノールエキスをそれぞれマウスの機械的アロディニアの評価部位である後肢に抗がん薬投与翌日からの 1 日 2 回塗付すると芍薬のエタノールエキスの塗布において抗がん薬誘発の機械的アロディニアの発生が抑制された。一方、甘草のエタノールエキスではその効果は認められなかった。そこで、我々は、昨年、芍薬の主要成分であるペオニフロリンに着目し、ペオニフロリンの繰り返し外用が抗がん薬誘発の機械的アロディニアの発生を抑制することをみいだした。そこで、本年は、更に単回投与ならびに、塗布局所作用に関して検討し、また昨年効果が認められなかった芍薬甘草湯の甘草の役割に関しても調べた。更に、ペオニフロリンの含有量の多い富山県産の芍薬のエタノールエキスを用いてこれまで使用していた他県の芍薬のエタノールエキスと効果の比較を行った。

【研究方法】

(実験動物)

実験には、雄性 C57BL/6 マウスを使用した。

(抗がん薬)

抗がん薬パクリタキセル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、Cremophor EL, 100% エタノール及び生理食塩水を 1:1:8 の割合で調製した溶媒にて溶解し、5 mg/kgの用量で単回腹腔内注射した。

(芍薬エキス, ペオニフロリン, グリチルリチン酸)

芍薬刻み生薬 (富山県産芍薬, 富山; 栃本天海堂, 大阪) を用いエタノール抽出を行い, 抽出エキスをエタノールに溶解し塗布した。また, ペオニフロリン (和光純薬工業, 大阪) 或いはグリチルリチン酸 (東京化成工業, 東京) は, エタノールに溶解し塗布した。これらエタノール溶液は, 1日2回マウスの後肢の足首より指先側 (足掌, 足背, 指) に塗布した。

(行動評価: 機械的アロディニア)

マウス後肢足蹠に von Frey フィラメント (0.69mN) を適用し, この機械的刺激に対する後肢の反応を3段階のスコア化しアロディニアを評価した。

0: 反応なしまたは後肢を横にずらす行動

1: 後肢の引き上げ行動 (lifting)

2: 後肢の振り動作 (flinching) または刺激部位へのなめ行動 (licking)

【結果】

(1) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのペオニフロリンの単回外用による効果

昨年度, パクリタキセル投与マウスへ, パクリタキセル投与翌日からペオニフロリンのエタノール溶液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体 (足掌, 足背, 指) に塗布すると, パクリタキセル誘発機械的アロディニアの発生は抑制されることを報告した。そこで, 今回, パクリタキセル投与後, 機械的アロディニアの形成がピークとなる14日目にペオニフロリンエタノール溶液を単回塗布した。その結果, ペオニフロリンエタノール溶液の塗布は, パクリタキセル誘発機械的アロディニアを抑制しなかった。

(2) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのペオニフロリンの繰り返し外用による局所効果

パクリタキセル投与翌日よりペオニフロリンエタノール溶液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首

より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。機械的アロディニアの評価は，ペオニフロリンエタノール溶液塗布足及び反対足の両方を評価した。その結果，ペオニフロリンエタノール溶液塗布足のみ，パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成が抑制された。

(3) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのグリチルリチン酸の繰り返し外用による効果

パクリタキセル投与翌日よりグリチルリチン酸を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。その結果，グリチルリチン酸エタノール溶液の繰り返し塗布は，パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成を抑制しなかった。

(4) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのペオニフロリンとグリチルリチン酸混液の繰り返し外用による効果

パクリタキセル投与翌日よりペオニフロリン単独及びグリチルリチン酸との混液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。その結果，殆ど抑制効果を示さない用量のペオニフロリンの繰り返し塗布の効果にグリチルリチン酸を加えることで，ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成の抑制効果が増強された。

(5) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへの芍薬エタノール抽出物の繰り返し外用の効果（富山県産芍薬と栃本天海堂より購入した日本産芍薬との比較）

富山県では，ペオニフロリンの含有量が多い芍薬栽培を行っている。本研究では，富山県産芍薬及び，これまで使用してきた栃本天海堂より購入した日本産芍薬よりエタノール抽出を行い，パクリタキセル投与翌日よりこれらエタノール抽出物のエタノール再溶解液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。その結果，両芍薬エタノール抽出物の塗布によりパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成が抑制された。その抑制効果は，富山県産芍薬の方が栃本天海堂より購入した日本産芍薬より有意に抑制効果が大きかった。

【考察と今後の展望】

ペオニフロリンのパクリタキセル投与翌日からの繰り返し塗布ではパクリタキセル誘発機械的アロディニアの発生が抑制されるが，パクリタキセル誘発機械的アロディニアが形成された時点でのペオニフロリンの単回塗布では機械的アロディニアは抑制されなかった。従って，末梢に塗布されたペオニフロリンは，パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成過程を抑制（例えば，神経保護作用など）するが，すでに形成されたアロディニアにはペオニフロリンの外用では制御できないことが示唆される。

今回の実験では，ペオニフロリンは，外用局所でのみ効果を示すことが明らかとなった。このことは，全身作用への影響がないということで，今後製剤開発にとって有用な情報となると期待される。

現在、臨床では、抗がん薬投与患者の末梢神経障害への芍薬甘草湯が有用である可能性のある報告が少しずつ出てきている。これまでに芍薬のエタノールエキスの繰り返し塗布がパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成を抑制し、一方で、甘草のエタノールエキスの繰り返し塗布ではこのアロディニアの形成を抑制することができなかった。本研究では、甘草の主成分であるグリチルリチン酸を用いてその役割に関して検討したところ、グリチルリチン酸がペオニフロリンの効果を増強することを見出した。その増強作用機序の詳細は不明であるが、ペオニフロリンがP糖タンパク質の基質であること、皮膚にはP糖タンパク質があり、グリチルリチン酸がP糖タンパク質の発現を増加することが知られていることから、機序の1つとしてP糖タンパク質の発現増加によるペオニフロリンの吸収増大が関与しているかもしれない。

芍薬成分のペオニフロリンが、抗がん薬誘発の末梢神経障害の形成抑制に効果を示すことが明らかとなってきた。本年は、このペオニフロリンの含有量が現在市販されている芍薬より多い富山県産芍薬を用いても評価した。その結果、日本国内の他県の芍薬より抽出したエタノールエキスより、富山県産芍薬のエタノールエキスの方がパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成抑制効果が大きかった。この結果は、ペオニフロリンが有効成分の一つあることを更に証明し、富山県産芍薬がより有用であることが明らかとなった。

本研究成果を基に、今後、臨床応用に向け、作用機序の解明と安全性の確認、製剤化を検討していく予定である。また、臨床試験実施への倫理委員会への審査請求も行っていく予定である。

【その他活動】

臨床への応用を目指し、臨床試験で使用可能な製剤作製に関して、

- ①富山県くすり政策課職員（担当：藤岡）、本学リエゾンオフィス職員（担当：金田、今川）と共に富山県内製薬関連企業と面談を行った（2015年3月及び12月）
- ②日本薬理学会年会にて「創薬オープンイノベーション企画」にて、製薬企業との個別面談を行った。（2015年3月）
- ③富山県くすり政策課、富山県薬事研究所、富山大学薬学部（応用薬理学）・医学部（産婦人科学）、和漢薬研究所（生物資源科学）、富山大学リエゾンオフィスの合同会議を行った（2015年12月）

【学会発表】

安東嗣修. 下行性疼痛抑制系を介した抗がん薬による末梢神経障害性疼痛制御. 日本臨床腫瘍薬学会 学術大会2015; 2015 Mar 14-15: 京都. (招待講演)

小林奈央, 安東嗣修, 北村 亮, 李 峰, 倉石 泰. マウスにおける抗がん薬 paclitaxel 誘発機械的アロディニアへの芍薬甘草湯の効果. フォーラム創薬富山 第41回研究会; 2015 May 28; 富山.

安東嗣修, 小林奈央, 北村 亮, 李 峰, 倉石 泰. マウスにおける paclitaxel 誘発機械的アロディニアへの芍薬甘草湯による末梢作用性抑制効果. 第32回和漢医薬学会学術大会; 2015 Aug 22-23; 富山.

安東嗣修. 抗がん剤による末梢神経障害とその予防対策. 第16回がん化学療法・緩和ケア研修会; 2015 Nov 7; 富山. (招待講演)

小林奈央, 安東嗣修, 北村 亮, 李 峰, 倉石 泰. マウスにおける抗がん薬 paclitaxel 誘発末梢神経障害性疼痛への芍薬甘草湯とその活性成分の効果. 日本薬学会北陸支部会127回例会; 2015 Nov. 15; 富山.

【その他発表】

安東嗣修. 糖尿病や薬剤によって起る「末梢神経障害」～異常感覚（痛みやしびれ）はどうやって起こるの？～. 平成27年度 富山大学サテライト講座; 2015 Aug 8; 富山.

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学

小林奈央, 倉石 泰

富山大学和漢医学総合研究所和漢薬の科学基盤形成拠点 拠点推進室

李 峰

Ⅱ－２ 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯 並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 産婦人科学

教授 齋藤 滋
准教授 吉野 修
助教 島 友子
助教 鮫島 梓

【研究目的】

抗がん剤使用によりがんの治療成績が向上しており、がんサバイバーも増加している。その一方で、抗がん剤による嘔吐、血液毒性、易感染性、脱毛、肝機能障害などの副作用があるため、種々の対策がなされてきた。一方、抗がん剤による末梢神経障害（痛みや痺れなど）は、生命予後を悪化させないが、治療終了後の患者のQOLを著しく低下させる。これまで抗がん剤による末梢神経障害の発症の詳細な機序が判っておらず、臨床的に大きな問題点となっている。我々は芍薬甘草湯の芍薬がパクリタキセル誘導の末梢性の痛みに対して有用であることを報告し（Eur. J Pain ; 13 : 22-27, 2009）、臨床例においても芍薬甘草湯がパクリタキセルによる筋肉痛に有用であることを報告している（産婦人科漢方のあゆみ ; 28 : 40-45, 2011）。しかし、これまでの報告は患者による主観的評価法に頼っており、客観的な評価法が求められている。申請代表者である安東 嗣修は、電気生理学的手法を用いた検討から、抗がん剤投与マウスの末梢神経において痺れた相当する自家発火が増加していること、ならびに抗がん剤使用後に末梢循環障害が生じ、このことが痛み、痺れにつながることを、世界で初めて見出した。そこで、今回、婦人科がん患者でタキソール製剤を使用する症例に筋電計（T&Tメディカル社ニューロスタディー）および末梢温度を評価するサーモグラフィー（Fluku社Ti-32）を用いて、末梢神経障害を評価し、芍薬甘草湯による末梢神経障害を客観的に評価する方法の確立を目的とした。

【研究方法】

富山大学臨床研究倫理審査に筋電計による神経伝達速度測定およびサーモグラフィーによる末梢温度測定を症例患者に対して行う研究承認を得た。対象は富山大学附属病院産婦人科で外来、入院管理し、タキソールを含む抗がん剤投与症例100例を目標症例とし、今年度より測定を開始した。

同意を得られた患者に抗がん剤投与前（day 1）、7日後（day 8）に筋電計による電気生理学的方法で、電極を2カ所に装着し軽微な電流を流すことで電極間の神経伝達速度を計測した。また手背および足背にサーモグラフィーにかざすことで、非侵襲的に表面体温評価を行なった（図1）。

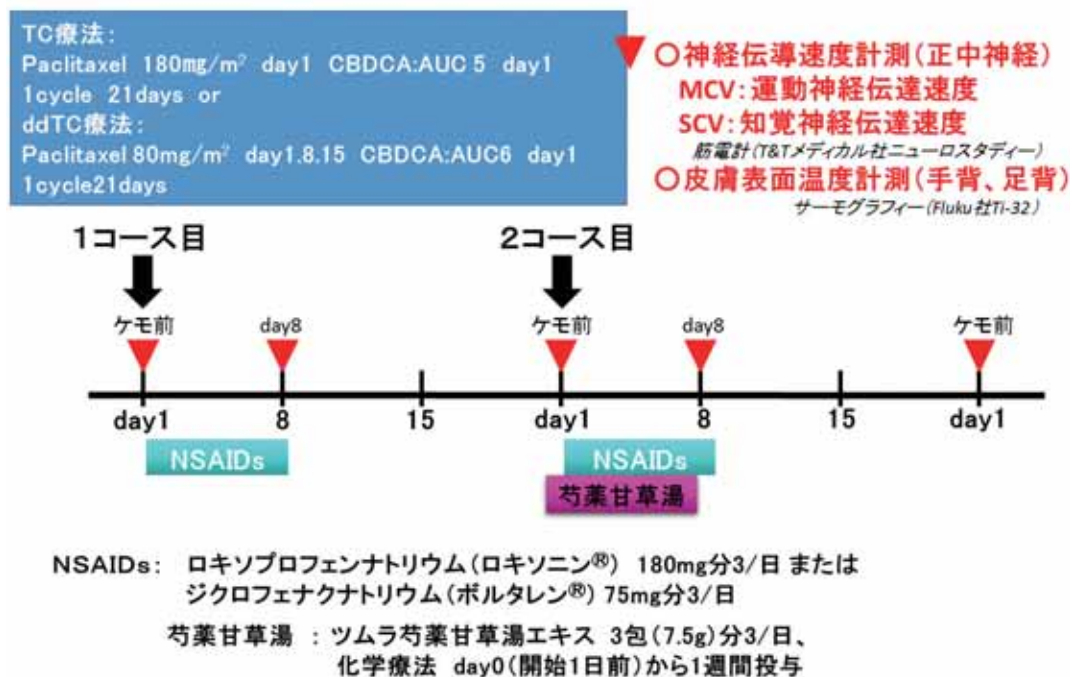


図1. 方法

これらを芍薬甘草湯非投与時(初回)と芍薬甘草湯投与時(2回目以降)とで比較し、自覚症状の改善度とあわせて評価した。今年度は以下の実験計画を立て、検討を開始した。

実験① 婦人科患者に対し、神経伝達速度および末梢(手および足)温度測定を複数回行い、データの集積を行った。

実験② タキソールを含む化学療法の初回治療症例9名のタキソール投与前(day1)および投与7日後(day8)の神経伝達速度および末梢温度を測定し、比較検討した。

実験③ 実験②の被験者のうち、化学療法2回目から、芍薬甘草湯内服を開始した症例に対して、同漢方の効果を検討するため、初回化学療法day8と2回目化学療法day8における神経伝達速度および末梢温度を測定し、比較検討した。

【結果】

実験① 今年度、9名の婦人科患者に対し、のべ48回の神経伝達速度および末梢温度測定を行った。神経伝達速度(運動神経:MCVおよび感覚神経:SCV)と末梢温度の分布を解析し、両者の関係を解析したところ、運動神経伝達速度と手の皮膚温度には有意な正の相関関係を認めた($P<0.05$)。一方、感覚神経伝達速度と手の皮膚温度には相関性は認められなかった。

実験② 初回化学療法を受ける9名の婦人科患者に対し、化学療法前後のデータを解析した。Day1とday8での比較において、神経伝達速度に関しては運動神経(MCV)および感覚神経(SCV)に差を

認めなかった。一方、末梢温度に関しては化学療法後に低下を認め ($P<0.08$)、特に手よりも足においてその傾向を強く認めた。

実験③ 芍薬甘草湯の評価を行うことができた症例は5例であった。芍薬甘草湯投与前後における化学療法 day 8 に得られたデータを解析した。神経伝達速度に関しては運動神経 (MCV) および感覚神経 (SCV) に差を認めなかった。末梢温度に関しては手では特に芍薬甘草湯投与前後で差を認めなかった。一方、足において、統計学的有意差はないものの改善傾向を認めた。

【考察と今後の展望】

これまで、抗がん剤による痛みや末梢神経障害の評価法は主観的であったが、客観的な評価法を確立し、また芍薬甘草湯による効果が客観的な評価でも証明されれば、臨床的に極めて大きな意義がある。今年度、実際に婦人科患者を対象に神経伝達速度および末梢温度の測定を開始した。化学療法および芍薬甘草湯の介入効果に関して、神経伝達速度測定では差を認めなかった。症例数が9例と少なく、データの蓄積が必要である。

一方、末梢温度に関しては化学療法による末梢温度の低下および、芍薬甘草湯投与によるその改善傾向を特に足背で認めた。来年度以降データの蓄積により、有意差が出る可能性がある。来年度は患者本人の自覚症状と神経速度および末梢温度評価という、客観的他覚所見が一致するかも含め検討を行う予定である。

本法は手技が容易であることから、本評価法を確立すれば早めの医療介入も可能となる。また、芍薬甘草湯や牛車腎気丸による抗がん剤の副作用軽減が臨床的に証明されれば、多くの癌症例にとって有益となる。

【学会発表】

1) 島友子 産婦人科漢方研究会 (2015年9月13日) シンポジウム, 東京

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 産婦人科学

吉野 修, 島 友子, 鮫島 梓

Ⅲ. 「富山県ブランド芍薬」の基盤・臨床研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所

漢方診断学分野 教授 柴原直利

生薬資源科学分野 教授 小松かつ子

漢方薬医薬品全体の2%程度の市場規模ではあるものの、直近10年の市場の伸びで見ると、医薬品全体が7%程度であるのに対して、漢方薬は37%程度と大きい(注2)。今後さらに、少子高齢化による医療費の高騰、慢性疾患患者の増大などの影響も受け、漢方薬に対するニーズの増加が予想される。

高齢化や健康意識の高まりの影響もあり、漢方薬は医療用あるいは一般用医薬品として非常に幅広く用いられ、その市場規模はこの10年で34%増加したとされている。一方、漢方薬に配合される生薬の約87.8%は国外からの輸入に依存している。自然環境の変化などによって生薬の供給が滞る事態も危惧されており、漢方医学の永続性を担保する意味からも、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を図る必要がある。「芍薬」はボタン科のシャクヤク *Paeonia lactiflora* の根を修治したものであり、漢方方剤を構成する生薬として頻用されているが、その自給率は3.52%程度とされている。そのような状況下で、富山県は付加価値の高い「富山県ブランド芍薬」を開発する目的で優良品種を選抜し、栽培化を進めてきた。そこで本研究では、富山において栽培可能な薬用植物の有用性を、基礎及び臨床研究の視点から明らかとすることを目的とした。

研究担当者の本年度研究成果の概要を以下にまとめる。

1. シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究

芍薬に付加価値を与えるためには、薬用及び園芸用の双方に用いることができること、薬用途に特徴があること、安定した品質であることなどが考えられる。特にブランド芍薬を富山県で生産するためには、シャクヤク品種の栽培拡充とともに、収穫した根の加工調製法の開発が不可欠である。

これまで富山県で広く栽培されてきた薬用品種の「梵天」は、富山県の多湿な気候が根の乾燥に不向きであったため、4年間栽培された後に新鮮なまま奈良県の生薬業者に出荷するという状況であった。それらは富山県産であっても「大和芍薬」の名称で国内に流通することから、いかに富山県で加工調製し、「富山芍薬」の名称を付すかが課題であった。そこで、優良品種の選抜と並行して、優れた品質を担保するための根の加工調製法の最適化を行う目的で、昨年度は「梵天」の根について15通りの加工調製法を行い、8成分の含量の変動を調べ、新鮮な根を約1ヶ月間低温貯蔵し、水洗後に

湯通しして周皮を竹べらで除き、乾燥機（30℃）で乾燥する方法が最も良い成分含量を示すことを明らかにした。この結果に基づき、「富山ブランド芍薬」の候補品種として選抜した品種Aの新鮮根について、上記の方法に準じた方法で加工して局方試験並びに重金属試験を実施し、日本薬局方の規格に適合したものであることを示した。しかし、上記の加工調製法を実施する際に根の周皮を取り除くか否かが問題になったことから、今年度は周皮付きの根も材料に加え、品種Aの新鮮根を約1ヶ月間低温貯蔵した後に8通りの加工調製法を行い、成分含量の変動を検討した。

その結果、新鮮根の低温貯蔵により Paeoniflorin 含量が安定し、湯通し処理により 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) 及び Gallic acid 含量が顕著に増加することが明らかになった。また、低温貯蔵した根を湯通し処理し、周皮を付けたまま乾燥した場合の方が PGG 含量は高く、乾燥法も室温での自然乾燥より30℃で乾燥した方が高含量であった。さらに、品種Aの加工調製品は「梵天」の加工調製品に比較して Paeoniflorin, Albiflorin, (+)-Catechin の含量が高く、本品種の特徴が加工調製法を整えて比較することにより明瞭になった。

2. 富山県産芍薬の品質評価に係る臨床研究

生薬である芍薬は医療用医薬品として用いられている漢方エキス製剤146方剤中の54方剤の構成生薬に含まれている非常に重要な生薬である。この芍薬の品質を臨床的に評価するには、漢方方剤を構成する生薬数がより少ない方剤を用いる必要があり、本研究では芍薬と甘草のみから構成される芍薬甘草湯を用いることとした。芍薬甘草湯は、古くから筋痙攣や痙攣性疼痛に対して用いられ、近年では腓返りや月経困難症などに頻用されている。本研究では、ボランティアを対象とした腓返りおよび月経困難症に対する「富山県ブランド芍薬」、あるいは「梵天芍薬」含有芍薬甘草湯による比較研究を計画しているが、安全性を考慮した使用薬剤量、服用期間、評価法などを決定する必要がある。そこで、富山大学附属病院和漢診療科に通院中で芍薬甘草湯服用歴があり、腓返りを有する患者を対象とした後方視的研究を実施した。

富山県ブランド芍薬を構成生薬とする芍薬甘草湯を用いて腓返りに対する効果を評価したところ、芍薬甘草湯により腓返り発生回数・持続時間が減少しており、有効と判断された。また、評価に用いた臨床症状日誌に記載洩れはみられなかった。以前に服用した一般流通芍薬を構成生薬とする芍薬甘草湯との比較では、2人が富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の方がやや有用としたが、1人が一般流通芍薬含有芍薬甘草湯の方がやや有用としており、差はみられなかった。副作用については、肝機能及び腎機能に影響はみられなかったが、血圧が上昇傾向を示し、血清カリウムに有意な低下がみられた。高齢者においては甘草に起因する偽性アルドステロン症が発生しやすいとされており、ボランティアを用いた臨床研究では、より一層の注意が必要であると考えられた。また、服用回数及び服用時間については、腓返りはほとんどが就眠後に発生していたことから、1日1回の眠前投与でも評価

可能であると考えられた。また、服用期間については、14日間の服用では3人が規定通りに服薬できておらず、前方視的研究では脱落例と評価される状態であった。効果自体は服用開始1週間以内に発現しており、副作用も考え合わせると、1日1回(2.5g/日)を7日間とすべきであると考えられた。

Ⅲ－１ 腓返り（有痛性筋痙攣）に対する富山県ブランド芍薬 含有芍薬甘草湯の効果に関する臨床研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所 漢方診断学分野 教授 柴原直利

1. 緒言

漢方医学の治療において使用される漢方方剤は一定比率の複数生薬により構成されるものである。本邦で使用される漢方方剤に配合される生薬は約83%を中国に依存しており、中国の自然環境の変化や国家政策によっては生薬の供給が滞る事態も危惧されている。漢方医学の永続性を担保するためには、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を促進する必要がある。本邦で使用される生薬の中でも非常に使用頻度が高い生薬として「芍薬」があり、医療用医薬品として用いられている漢方エキス製剤の146方剤中54方剤の構成生薬に含まれている。「芍薬」はボタン科のシャクヤク *Paeonia lactiflora* の根を修治したものであり、しかし、そのほとんどは中国から輸入されている。そのような状況の下で、富山県は付加価値の高い「富山県ブランド芍薬」を開発する目的で、園芸用シャクヤクの中から抗炎症、抗酸化作用が優れている優良品種を選抜し、栽培化してきた。そこで本研究では、本県で栽培される芍薬について、「富山県ブランド芍薬」として確立するための科学基盤を与える目的で、富山県ブランド芍薬を配合した漢方方剤について臨床研究を実施している。

前述のように、生薬である芍薬は非常に多くの漢方方剤の構成生薬である。その中で、芍薬として日本薬局方に適合する「富山県ブランド芍薬」の効果を経験的に評価するには、芍薬のみの品質の相違が臨床効果に反映される必要があり、そのためには漢方方剤を構成する生薬数が出来るだけ少ないものとする必要がある。そこで、芍薬と甘草のみから構成される芍薬甘草湯を臨床研究に使用する漢方方剤とした。

芍薬甘草湯は傷寒論に記載される漢方方剤であり、「傷寒脈浮、自汗出で、小便数、心煩し、微悪寒し、脚攣急するに…若し厥癒えて足温なる者は、更に芍薬甘草湯を作り之を與うれば、其の脚即ち伸ぶ」とあり、古来、筋痙攣や痙攣性疼痛に対して用いられてきた。近年では、腓返り（＝有痛性筋痙攣）を中心に頻用されている。そこで本研究では、ボランティアを対象とした臨床研究における使用薬剂量、期間などを決定するため、富山大学附属病院和漢診療科に通院中で、芍薬甘草湯を服用中の有痛性筋痙攣患者を対象とした後方視的研究を実施した。

2. 目的

有痛性筋痙攣（腓返り）とは「単一筋または複数の筋群にみられる有痛性の不随意的筋収縮」であり、電気生理学的には300Hzの高頻度運動単位放電として表される。その発生機序には脊髄前角細胞の自发放電による運動単位の収縮、あるいは運動ニューロンの筋へ至る神経末梢の過剰興奮性などが関連するとされているが、明確な発生機序は不明であり、腓返りの発症機序は単一のものではなく、複数の病態が混在すると考えられている。腓返りに対する西洋医学的治療としては、キニジンやプロカインアミド、フェニトイン、カルバマゼピンといった抗痙攣薬、あるいは塩酸工ペリゾンや塩酸トルペリゾンなどの中枢性筋弛緩剤、ダントロレンなどの末梢性筋弛緩剤などが用いられているが、その奏効率は高いものではない。

一方、古来、筋痙攣や痙攣性疼痛に対して用いられる漢方方剤として芍薬甘草湯があり、近年では肝硬変や血液透析、整形外科疾患に伴う腓返りに芍薬甘草湯が有効であったと報告されている。芍薬甘草湯についても、その鎮痙作用の機序に関わる基礎的研究は少なく、モルモット回腸に対する実験における副交感神経末端における芍薬のアセチルコリン遊離抑制作用や甘草の抗アセチルコリン作用が関与すると報告されている。しかし、作用機序は不明であるが、芍薬甘草湯は臨床的には腓返りに対して第一選択薬として用いられている治療、あるいは予防漢方方剤である。そこで本研究では、芍薬甘草湯の構成生薬である芍薬には富山県ブランド芍薬を用い、甘草には一般に流通する甘草を用いた富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯を服用した有痛性筋痙攣を有する患者を抽出し、後方視的にその効果や副作用について検討した。

3. 対象と方法

(1) 対象

富山大学附属病院和漢診療科へ通院し、有痛性筋痙攣に対して芍薬甘草湯を服用中であり、腓返りの関する臨床症状について日誌で記録している患者の中で、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯を服用した8症例を対象とした。

(2) 薬剤

富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯（1日量：富山県ブランド芍薬 5.0g、甘草 5.0g）を水300mLに入れて30分間加熱して煎出し、茶漉し、あるいはガーゼでろ過して煎液を作製した。

(3) 服用方法

作製した富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯を14日間、1日2回（午前10時、および就寝前）服用することとした。

(4) 臨床効果の評価

臨床症状日誌に記載された1日における腓返り発生回数・持続時間を用い、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯服用前の7日間、服用期間の14日間、服用中止後の7日間について各対象者の平均値を算出して代表値とし、腓返りに対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の効果を検討した。

(5) 副作用の評価

血圧は、臨床症状日誌に記載された朝食前に自己測定された測定値を検討した。浮腫・脱力の発現についても、臨床症状日誌に記載されたものを用いた。また、肝腎機能や結成カリウムなどの血液検査に与える影響については、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯服用前後において施行した血液検査の結果を検討した。

4. 結果

(1) 対象患者背景

対象患者の性差はM/F=3/5であり、平均年齢は72.1±4.9歳であった。富山大学附属病院和漢診療科への通院を要する基礎疾患は、腰痛症2人、変形性膝関節症2人、高血圧症2人、高コレステロール血症1人、糖尿病1人であり、併用薬は、漢方方剤では八味地黄丸2人、牛車腎気丸2人、桂枝茯苓丸2人、七物降下湯2人であり、甘草含有漢方方剤を服用している者はいなかった。西洋薬としては、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（カンデサルタン・ロサルタン）、高脂血症薬（アトルバスタチン・ロスバスタチン）、骨粗鬆症薬（アレンドロン酸ナトリウム水和物）、鎮痛薬（ロキソプロフェンナトリウム・セレコキシブ）が併用されていた。

(2) 芍薬甘草湯服薬状況

対象とした8人中5人は規定通りに14日間服薬していたが、10日目及び11日目で各々1人が服用を中止し、1人が8日目に服用していなかった。

(3) 腓返りに対する臨床効果

1) 腓返り発生回数

富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯を服用する前、服用中、服用中止後における腓返りの平均発生回数は、服用前が0.45±0.12回/日であったのに対し、服薬中は0.24±0.09回/日（1週間目：0.27±0.09回/日、2週間目：0.21±0.11回/日）と減少し、服薬中止により0.36±0.13回/日と増加していた（図1）。

2) 腓返り持続時間

芍薬甘草湯服用前・中・後における腓返り発生時の平均持続時間は、服用前が20.00±2.41分/回であったのに対し、服薬中は13.75±3.21分/回（1週間目：13.96±2.84分/回、2週間目：

13.54±5.15分/回)であり、服薬中止後は15.63±1.46分/回であり、芍薬甘草湯服用により腓返りの持続時間は短縮し、服薬中止により再度延長した。

腓返り発生回数と持続時間を合わせて評価するために、芍薬甘草湯服用前・中・後について、1日当たりの平均腓返り時間を算出したところ、服用前が8.84±2.19分/日であったのに対し、服薬中は3.30±1.52分/回(1週間目:3.75±1.70分/日, 2週間目:2.86±1.57分/日)であり、服薬中止後は5.80±2.04分/日であった(図1)。

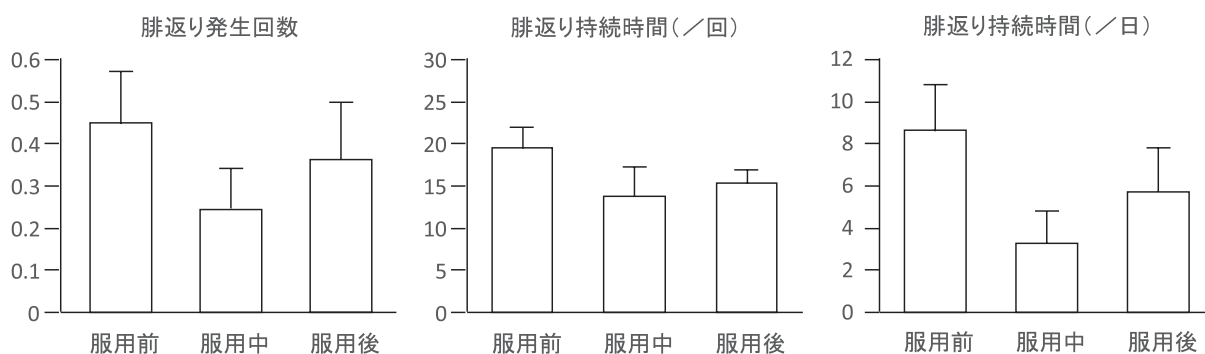


図1 富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の腓返りに対する臨床効果

3) 自覚的有用度

富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯が腓返りに対して有用であったか否かについては、8人中7人より「有用」との回答が得られた。また、これまでに服用経験している一般に流通する芍薬を用いた芍薬甘草湯との比較では、「明らかに富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の方が有用」はなく、「富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の方がやや有用」は2人、「両者は変わらない」は5人、「一般流通芍薬含有芍薬甘草湯の方がやや有用」が1人であった(図2)。

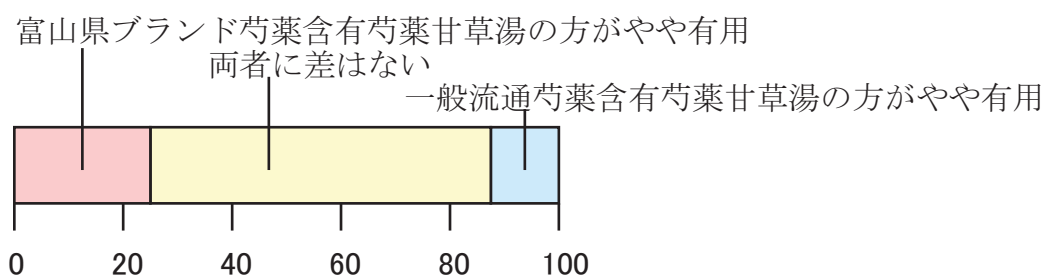


図2 腓返りに対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の有用度

(4) 副作用に関する検討

1) 血圧

富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯を服用する前、服用中、服薬中止後における平均血圧は、服用前が132.4±8.2/74.7±6.5mmHgであったのに対し、服薬中は135.7±9.1/75.6±7.0mmHg(1週間目:134.4±9.7/75.1±7.1mmHg, 2週間目:137.0±9.0/76.1±7.1mmHg)であり、服薬

中止後は $134.6 \pm 9.1/76.1 \pm 5.9$ mmHgであった。芍薬甘草湯服用による血圧の変化は有意な変化ではなかったが、中には収縮期血圧が28mmHg上昇した者もみられた。

2) 浮腫・脱力

芍薬甘草湯服薬後に浮腫の出現、あるいは増強を3人が自覚したが、体重増加を示した者はなかった。一方、脱力を自覚した者はみられなかった。

3) 血液学的検査

芍薬甘草湯服用前・後における血液学的検査の比較では、総蛋白及びアルブミン、肝機能、腎機能に変化はみられなかった。しかし、血清カリウムは服用前の 4.2 ± 0.1 mEq/Lに対し、服用後は 3.9 ± 0.2 mEq/Lと有意に低下し、中には 0.5 mEq/Lも低下した者がみられた(表1)。

表1 芍薬甘草湯服用前・中・後における血液学的検査の変化

	富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯服用前	富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯服用後
TP	7.1 ± 0.5	7.0 ± 0.5
Alb	4.2 ± 0.5	4.1 ± 0.5
AST	18.5 ± 4.6	19.0 ± 3.9
ALT	15.5 ± 5.7	14.6 ± 4.3
ALP	207.5 ± 33.7	211.0 ± 27.2
LDH	185.1 ± 33.4	179.6 ± 32.9
GGT	20.4 ± 10.5	20.4 ± 11.1
BUN	13.6 ± 1.5	13.5 ± 2.6
Crea	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
K	4.2 ± 0.1	3.9 ± 0.2
WBC	6013 ± 1734	5808 ± 2116
RBC	428.5 ± 35.2	417.9 ± 38.3
Hb	13.3 ± 0.9	12.9 ± 1.1
Ht	40.9 ± 2.7	40.4 ± 2.6
PLT	24.6 ± 5.5	24.7 ± 5.5

5. 考察

富山県ブランド芍薬を構成生薬とする芍薬甘草湯を用いて腓返り(有痛性筋痙攣)に対する効果を評価したところ、芍薬甘草湯により腓返り発生回数・持続時間が減少しており、有効と判断された。また、評価に用いた臨床症状日誌に記載洩れはみられなかった。以前に服用した一般流通芍薬を構成生薬とする芍薬甘草湯との比較では、2人が富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の方がやや有用としたが、1人が一般流通芍薬含有芍薬甘草湯の方がやや有用としており、差はみられなかった。

副作用については、肝機能及び腎機能に影響はみられなかったが、血圧が上昇傾向を示し、血清カリウムに有意な低下がみられた。高齢者においては甘草に起因する偽性アルドステロン症が発生しやすいとされており、ボランティアを用いた臨床研究では、より一層の注意が必要であると考えられた。

服用回数及び服用時間については、腓返りはほとんどが就眠後に発生していたことから、1日1回の眠前投与でも評価可能であると考えられた。また、服用期間については、14日間の服用では3人が規定通りに服薬できておらず、前方視的研究では脱落例と評価される状態であった。効果自体は服用開始1週間以内に発現しており、副作用も考え合わせると、1日1回(2.5g/日)を7日間とすべきであると考えられた。

Ⅲ－２ シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野 教授 小松かつ子, 朱 姝

【緒言】

漢方方剤に配合される生薬は約81%を中国に依存している¹⁾。中国の自然環境の変化や国家政策によっては生薬の供給が滞る事態も危惧されており、漢方医学の持続性を担保する意味から、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を図る必要がある。

「芍薬」はボタン科のシャクヤク *Paeonia lactiflora* Pallas の根を基原とする生薬であり、漢方方剤の約1/3に配合され、中国からの輸入量が甘草に次いで多い。日本でも古来、薬用品種「梵天」が開発され、奈良県を中心に栽培され「大和芍薬」と称して流通しているがその量は限られる。日本漢方生薬製剤協会による原料生薬使用量等調査報告書¹⁾によると、平成24年度の芍薬の国内使用量は1,489,161 kgで、その内訳は日本産が81,336 kg、中国産が1,407,825 kgであった。日本に輸入される中国産芍薬は『中華人民共和国薬典』²⁾で規定されている「白芍」に相当するもの、すなわち *P. lactiflora* の根を湯通しした後に外皮を除去するかあるいは外皮を取り除いて湯通しした後に乾燥されたものであるが、多くは日本の生薬関連企業が中国南部の諸省に赴いてその地で栽培されている *P. lactiflora* に対して根の加工法を指示して仕上げられた芍薬である。当然のことながら、日本流通品はすべて『第十六改正日本薬局方』³⁾に規定されている Paconiflorin 含量（2.0%以上）とその他の規格を満足する。これらの中国産芍薬（白芍）及び日本産芍薬は鎮痛、鎮痙、収斂薬として使用される。一方、中国ではこれとは別に駆瘀血薬（血液循環改善、抗炎症薬等）とされる芍薬（赤芍）もある。『中華人民共和国薬典』では「赤芍」は *P. lactiflora* または *P. veitchii* Lynch の根を乾燥したものであると規定されており、赤芍の多くが内蒙古自治区から産出される野生の *P. lactiflora* 由来である。

我々はこれまで、同一種に由来する日本産芍薬及び中国産の白芍と赤芍の違いを明らかにする目的で遺伝子解析及び成分研究を行い、白芍（日本産芍薬も同様）と赤芍を区別する遺伝子マーカーを明らかにするとともに、両者に特徴的な成分組成を見出した⁴⁾。さらに付加価値の高い芍薬を開発する目的で、富山県薬用植物指導センターで栽培されている園芸用シャクヤク約70品種について同様に検討し、各品種を白芍系と赤芍系に分類するとともに、日本及び中国に流通する芍薬、特に赤芍に類似した成分組成を持つものを3品種見出した。

一方、これまで富山県では「梵天」が広く栽培されてきたが、富山県の多湿な気候が根の乾燥に向きであったため、4年間栽培された後に掘り起こされた新鮮な根はすべて奈良県の生薬業者に出荷

するという状況であった。それらは「大和芍薬」の名称で国内に流通することから、いかに富山県で加工調製し、「富山芍薬」の名称を付すかが課題であった。そこで本研究では、優良品種の選抜と並行して、優れた品質を担保するための加工調製法の最適化を行う。

【目的】

富山県で栽培されるシャクヤクの根について、高品質を保つための加工調製法を開発する目的で、様々な貯蔵・加工・乾燥法を行った根の成分分析を行う。昨年度、栽培4年目の薬用品種「梵天」の根を用いて15通りの貯蔵・加工・乾燥法を行い、加工調製法の違いによる主要8成分(図1)の含量の変化を検討した結果、新鮮な根を約1ヶ月間低温貯蔵し、水洗後、湯通しして、周皮を竹べらで除き、乾燥機(30℃)で乾燥する方法が最も良い成分含量を示した。すなわち、新鮮な根を低温貯蔵することにより、Paeoniflorin含量が安定し、結果として高含量に繋がった。また、湯通し加工により、1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG), Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が顕著に増加した。この結果を受けて、「富山ブランド芍薬」の候補品種として選抜した品種Aの新鮮根について、上記の方法に準じた方法での加工を某企業に依頼し、その後加工品について局方試験並びに重金属試験を行っていただいた。これらは日本薬局方の規格を満足したことから日本薬局方「シャクヤク」(富山芍薬)として、柴原直利先生による臨床研究に供した。企業に上記の加工調製法を依頼する際、根の周皮を除くか否かが問題になったことから、今年度は周皮付きの根も材料に加え、新鮮な根を1ヶ月以上低温貯蔵した後に8通りの加工調製法を行い、昨年度と同様に成分含量の変動を調べた。材料には品種Aを用いた。

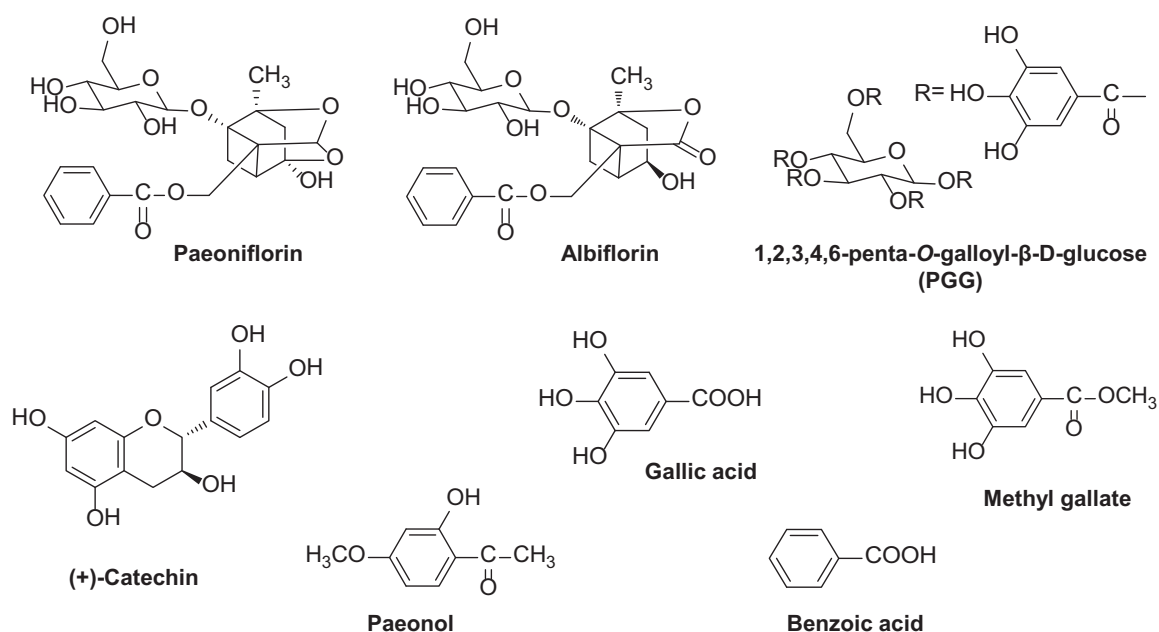


図1 定量分析に用いた成分の構造式

【実験材料及び加工調製法】

富山市八尾町で収穫された栽培5年目の栽培品種Aの根を材料とした（平成26年10月21日入手）。収穫後の根をビニール袋に入れ、冷蔵庫（4℃）に保管した。58日後、冷蔵庫から取り出し、直径1.5～2.0 cmの根を選別し、それらを均等に8グループに分けた（5個体／グループ）。8グループの根に対してそれぞれ、図2に示す8通りの加工・乾燥法を行った。昨年度より新たに、水洗後湯通しして周皮を除去せずにそのまま乾燥するA-IV、B-IVの2通りの方法を増やした。加工終了後、各グループ5個体の根についてそれぞれ8成分の含量を測定した。さらに、臨床研究に供した局方「シャクヤク」（富山芍薬）についても同様に定量した。

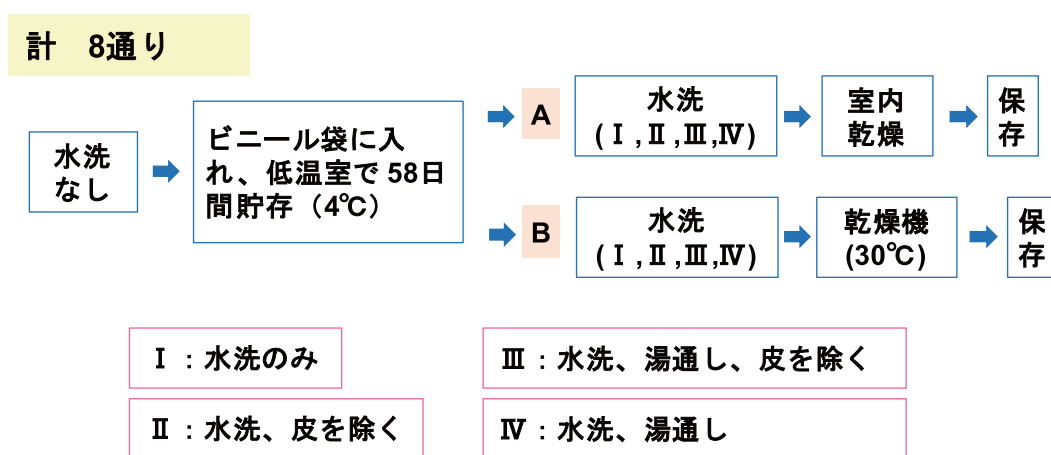


図2 収穫した新鮮な根について行った加工・乾燥法

【定量分析】

標準品：Paeoniflorin (Wako Pure Chem. Inc.), Albiflorin (Wako Pure Chem. Inc.), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG) (Toronto Research Chem. Inc.), (+)-Catechin (Cayman Chem. Inc.), Paeonol (Wako Pure Chem. Inc.), Gallic acid (Nacalai Tesque Inc.), Methyl gallate (ChromaDex.), Benzoic acid (Nacalai Tesque Inc.) を用いた。

試薬：HPLC 用移動相は、LC/MS グレードのアセトニトリル及び超純水 (Wako Pure Chem. Inc.), LC グレードのリン酸 (Wako Pure Chem. Inc.) を用いた。

測定装置：Jasco HPLC システム (Pump: PU-1580, Gradient unit: LC1580-02 ternary gradient unit, Auto sampler: AS-2057 Plus, Detector: MD-1510 Multiwavelength Detector)；カラム：YMC-Pack ODS-AQ, 250×4.6 mm, i.d., s-5 μ m；移動相：A：アセトニトリル, B：0.1%リン酸水溶液。

HPLC 条件：0-5 min, 10-15% A, 5-40 min, 15-30% A, 40-45 min, 30-70% A, 45-46 min, 70-80% A, 46-50 min, 80% A; for wash, 50-55 min, 80-10% A, 55-65 min, 10% A; for initial stabilization。注入量: 20 μ L；流速: 1 ml/min；カラム温度: 27℃；検出波長: 232 nm。データ処理プログラム: ChromNAV。

検量線の作成：8化合物の標準品 [Paeoniflorin, Albiflorin, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG),

(+)-Catechin, Paeonol, Gallic acid, Methyl gallate, Benzoic acid] を各々正確に量り取り、分析用メタノールに溶解して1.0 mg/ml の標準溶液を調製した。この溶液を5, 10, 50, 100, 500倍と段階的に希釈して調製した1.0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.002 mg/ml の溶液を HPLC で分析し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

試料溶液の調製：乾燥した根を粉碎し、300 μm の篩を通した。得られた粉末300 mgを正確に量り取り、遠心チューブに入れ、75% エタノール9 mlを加えて、30分間超音波抽出を行った。遠心分離した(10 min, 4000 rpm)後、上澄み液を分取した。以上の抽出操作をさらに2回(8 ml, 8 ml)繰り返した後、全上澄み液を合せて25 mLにメスアップした。そのうち約2 mlを DISMIC-13HP disposable syringe filter 0.2 μm (東洋濾紙)でろ過して HPLC 用バイアルに入れ、分析用の試料とした。これらについて、前述した HPLC 条件で8成分の定量を行った。

【結果】

各グループ5個体のそれぞれについて8成分の定量分析を行った。個体間である程度の成分含量のばらつきがあったものの、太さを揃えたことによりばらつきが補正されており、同じ調製法を行った同一グループの5個体においては同じ傾向を示した。すべてのグループで、Paeoniflorin の含量は3.4~4.5%と高い値を示した。Albiflorin 含量は Paeoniflorin 含量の1/3程度であり、周皮を除いたグループの A-II, -III と B-II, -III でわずかに低い傾向が見られた。湯通し処理を行った A-III, -IV 及び B-III, -IV では、処理を行わなかった A-I, -II 及び B-I, -II に比べて、PGG 及び Gallic acid の含量が増加しており、A-IV と B-IV で明瞭であった。特に乾燥機において30°Cで乾燥を行った B-IV で顕著に2成分の含量が高かった。一方、(+)-Catechin の含量は、湯通し処理を行った後、周皮を付けたまま室内で自然乾燥を行った A-IV で比較的高い値を示した。臨床研究に供した日局「シャクヤク」(富山芍薬)は、B-IV と同様な加工調製法で作製されたものであり、成分分析の結果も(+)-Catechin 含量が若干高いこと以外は、B-IV の結果とほぼ同様であった。富山芍薬の成分分析結果は次のとおり；Paeoniflorin: 4.11%, Albiflorin: 1.35%, PGG: 0.38%, (+)-Catechin: 0.36%, Gallic acid: 0.04%, Benzoic acid: 0.01% (平均値)。

【考察】

富山県で栽培可能な品種から、薬用のブランド芍薬を作出するためには、収穫した新鮮な根を富山県で加工調製する最適な方法を見出すことが不可欠である。昨年度は、栽培4年目の薬用品種「梵天」の根を15通りの方法で加工調製し、成分含量の差異を検討した結果、新鮮な根を約1ヶ月間低温貯蔵し、水洗後湯通しして、周皮を竹べらで除き、乾燥機(30°C)で乾燥する方法が最も良い成分含量を示すことを明らかにした。今年度は、ブランド芍薬の候補として選抜した品種Aの新鮮な根を58日

間低温貯蔵したものについて、周皮を除かずそのまま乾燥するという方法を加えて計8通りの加工調製法を行い、成分含量の変動を検討した。その結果、昨年と同様に、新鮮な根を低温貯蔵することにより Paeoniflorin 含量が安定すること、及び湯通し処理を行うことにより PGG 及び Gallic acid の含量が顕著に増加することが明らかになり、これらの方法が品種の別に依らず有効であることを確かめることができた。さらに、低温貯蔵した根を湯通し処理し、周皮を付けたまま乾燥した場合の方が、周皮を除いてから乾燥したものより PGG の含量が高く、乾燥法も室温での自然乾燥より30℃で乾燥した方が高含量を示した。「梵天」と品種 A を比べると、品種 A で Paeoniflorin 含量が1%程度高く、また Albiflorin 含量は約2倍、(+)-Catechin 含量は約5~6倍という結果であり、本品種の特徴が加工調製法を整えて比較することにより明瞭になった。これまで、栽培環境により Paeoniflorin, (+)-Catechin 及び PGG の含量が変動すること、周皮の有無で Albiflorin 含量が変動することを見出してきたが、品種を選抜し加工調製法を最適化することによりこの変動を補うことができると考えられる。

【結論】

富山ブランド芍薬の候補として選抜した品種 A の加工調製法として、新鮮な根を1ヶ月以上低温貯蔵し、水洗後湯通しして、周皮を取らずにそのまま30℃で乾燥する方法が、高品質を担保する上で最適であることを明らかにした。さらにこの方法は、品種の違いに依らず高品質の芍薬を作出するために有効であった。本法は湿度が高く、シャクヤクの乾燥には不向きとされる富山県においても実行できる。今後は、実験室レベルから企業レベルに拡大した方法を確立する必要がある。

引用文献

1. 日本漢方生薬製剤協会生薬委員会編，原料生薬使用量等調査報告書(3)—平成23年度および24年度の使用量，2015，pp.2-9.
2. 国家薬典委員会編，『中華人民共和国薬典』，2010年版，第一部，中国医薬科技出版社，北京，2010，pp.96-97(白芍)，147-148(赤芍)。
3. 厚生労働省編，『第十六改正日本薬局方』，東京，2011，p.1514.
4. Zhu, S., Yu, X. L., Wu, Y. Q., Shiraishi, F., Kawahara, N., Komatsu, K.: Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from *Paeonia lactiflora*, J. Nat. Med., 69(1), 35-45 (2015).