

# 鎮痒外用剤ムヒアルファ EX の薬効評価法の検討

中村知矢, 宮本隆行, 八十島満枝, 吉秋洋子, 中村幸子, 中屋里美,  
小川和男, 奥野吉秀, 中橋孝, 西井正廣

(株式会社池田模範堂)

## 緒言

一般に虫刺症（いわゆる虫刺され）の皮膚反応は、昆虫由来成分に対する即時型アレルギー反応および遅延型アレルギー反応、虫毒成分による急性皮膚炎生じることが知られている。そのため、家庭用の虫刺症の治療薬は、即時型アレルギー反応を抑制する抗ヒスタミン剤や、急性炎症や遅延型アレルギーを抑制するステロイド抗炎症剤が配合されている。しかしながら、通常家庭薬に配合されるステロイド剤は、効力によって5段階に分類される医療用ステロイド剤として低ランクに属するものであり、カやダニによる一般的な虫刺症には治療効果を示すが、近年増加傾向にある、犬や猫などのペットに寄生するノミ、植木につく毛虫（チャドクガ）やムカデなど、炎症症状が強い虫刺症に対して治療が困難な場合があった。

そこで、当社では、チャドクガなど様々な毒虫による虫刺症に対する新たな家庭薬として、ムヒアルファ EX (MaEX) を開発した。本製剤は、5段階に分類される医療用ステロイド剤では3番目のランクに属する吉草酸酢酸プレドニゾロンと抗ヒスタミン剤の塩酸ジフェンヒドラミンを配合し、かゆみ、虫さされ、かぶれ、湿疹、じんま疹等の効能を有する一般用医薬品である。同一効能の弊社従来品ムヒアルファ S (MaS) は、最も弱いランクに属するステロイド剤の酢酸デキサメタゾンと塩酸ジフェンヒドラミンを配合する。したがって MaEX は、MaS より炎症症状が強い虫刺症に有効性を示すことが期待でき、皮膚炎症モデルによる評価が一般的と考え検討を行った。

虫刺症で生じる皮膚の炎症反応をモデル化して薬効評価を行う場合、即時型アレルギー反応には、各種抗原と高 IgE 抗血清による抗原抗体反応や、ヒスタミンを皮内に直接投与することによって皮膚反応を生じさせる実験系が用いられる。また、皮膚の急性炎症にはクロトン油等を塗布することによって生じる皮膚炎症が、遅延型アレルギー反応にはハプテン抗原による接触皮膚炎が、それぞれモデル実験系として用いられることが多い。しかしながら、これらの実験系では、MaEX と MaS による抑制効果はほぼ同等であった。この結果は、従来より実施されている標準的な評価法では、ステロイド剤の効果を捉えていないか、あるいはステロイド剤はランクに関係なく最大級の抑制効果を発揮してしまうことによるものと推定された。したがってステロイド剤の差による効力差を実証するには、これらの実験系とは異なる、実際に高ランクのステロイド剤が適用されるような炎症症状が強い虫刺症に類似するモデル実験系が必要と推定された。

そこで本研究では、異なるランクのステロイド剤を配合する MaEX と MaS の効力差を実証するために、虫刺症の新たなモデル実験系として、虫毒成分に類似する起炎物質による皮膚炎症モデルの作出を試みた。

## 実験材料及び実験方法

起炎物質は、虫毒成分の類縁物質としてセロトニン (5HT)、キニン類縁物質 (ブラジキニン: BK)、プロテアーゼ類 (豚由来プロテアーゼ: PRO) およびホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) を用いた<sup>1)</sup>。

これらの起炎物質により、ラットの皮膚血管透過性亢進モデルおよびマウスの耳介浮腫モデルを作出した。

### 1. 実験動物

皮膚血管透過性亢進モデルは雄性 Wistar/ST 系ラット、耳介浮腫モデルは雄性 ICR 系マウスを三協ラボサービス (株) より購入し実験に供した。実験期間を通じての飼育環境は、室温 22°C±1°C、湿度 50%±10%、12 時間毎の明暗周期 (7 時~19 時) とし、飲料水及び飼料 (CE-2:日本クレア、東京) は自由摂取とした。なお、本実験は動物の保護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日 法律 第 105 号)、並びに実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27 日 総理府告示 第 6 号) の趣旨にのっとり実施した。

### 2. 試薬

セロトニン・クレアチニン塩酸塩 (ICN Biomedicals Inc)、ブラジキニン (シグマ)、プロテアーゼ (シグマ)、ハチ毒由来 ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (ALEXIS CO.) を使用した。

### 3. 被検薬物

株式会社池田模範堂において生産された、ムヒアルファ EX およびムヒアルファ S の製品を使用した。

### 4. 実験方法

#### 1) ラットの皮膚血管透過性亢進モデル

##### (1) 血管透過性亢進の惹起

0.1mL の 2% エバンスブルー生理食塩水溶液 (色素) を尾静脈内投与し、次いで、ラットの背部に 5HT、BK、PRO あるいは PLA<sub>2</sub> を皮内投与 (0.1mL/site) し、血管透過性亢進反応を惹起した。惹起 30 分後にラットを断頭、放血後、皮膚を剥離した。剥離した皮膚は、1 規定水酸化カリウム液に一晚浸漬させ溶解させた。

##### (2) 被検薬物適用

被検薬剤は、実験前日に電気バリカンにて除毛したラットの背部に 30mg 経皮適用した。適用時間は、血管透過性亢進の惹起の 1 時間前に実施した。

##### (3) 血管外漏出色素の定量

一晚皮膚を溶解した試料は、リン酸:アセトン混液 (5:13) を加え中和および色素抽出を行った。抽出した色素は、透過率を分光光度計 (U-1100、日立製作所) にて測定した<sup>2)</sup>。試料中の色素量は、測定された透過率から検量線により算出した。

#### 2) マウスの耳介浮腫モデル

##### (1) 耳介浮腫の惹起

マウス耳介に、エーテル軽麻酔下で、BK あるいは PRO を 10 $\mu$ L 皮内投与した。

(2) 被検薬物適用

被検薬剤は、マウス耳介に 10mg 経皮適用した。適用時間は、耳介浮腫の惹起の 1 時間前に実施した。

(3) 耳介浮腫の定量

惹起された耳介浮腫は、ダイヤルシクネスゲージ (PEACOCK G 型 尾崎製作所) により測定した。浮腫は耳厚の増加値で評価した。

5. 統計処理

実験の成績は、一元配置分散分析後、Tukey の多重比較検定により解析した。

結 果

1. ラットの皮膚血管透過性亢進モデル

ラットの皮膚血管透過性亢進モデルは、5HT、BK、PLA2 および PRO について条件を検討した。

5HT は、0.5 $\mu$ g (0.1mL)、BK は、1 $\mu$ g (0.1mL)、PRO は、0.1unit (0.1mL)、PLA2 は、1 unit (0.1mL) の皮内投与が適切な条件と判断した。

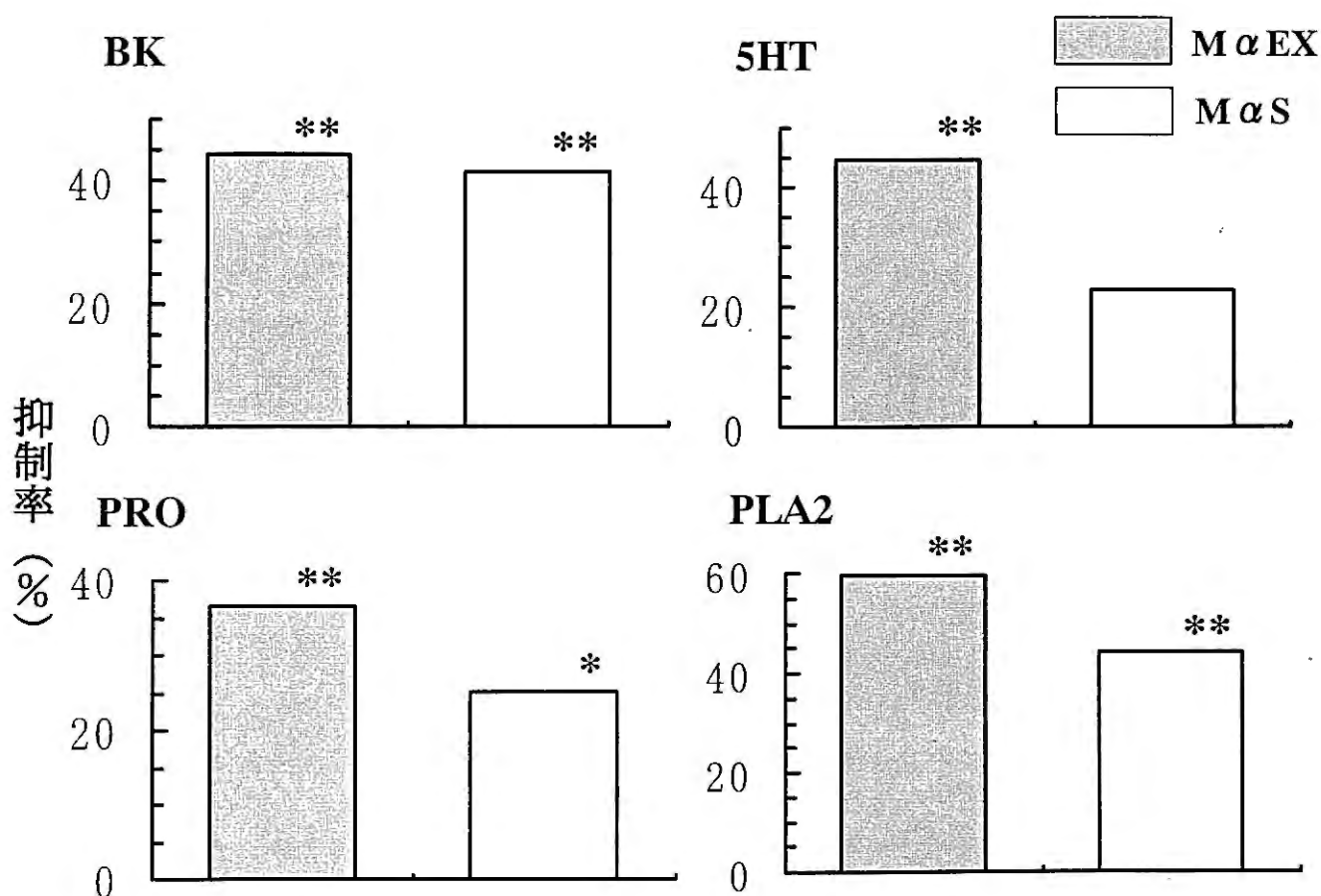


図1 ラットの血管透過性亢進モデルでの薬効評価

5HT、BK、PRO、PLA2 を用いたラット血管透過性亢進モデルにより、MαEX と MαS の効力を比較した。 \*\* p<0.01 \* p<0.05 (Tukey's test)

以上の条件で、MaEX と MaS の効力を比較した結果、BK を用いたモデルは、抑制効果に差は認められなかったが、5HT、PRO および PLA2 を用いたモデルは、MaEX が MaS に比べ高い抑制効果を示した。したがって、5HT、PLA2 および PRO によるラットの皮膚血管透過性亢進モデルは、高ランクのステロイド剤が適用されるような虫刺症の新たなモデル実験系として有用と考えられた。

## 2.マウスの耳介浮腫モデル

マウスの耳介浮腫モデルは、BK および PRO について条件を検討した。

BK は、1~10 $\mu$ g (10 $\mu$ L) を皮内投与したが、いずれの条件においても腫脹は持続しなかった。そのため、BK による腫脹は、即時型の血管透過性亢進によるものと推定され、本モデルには不適と判断した。PRO は、0.03unit (10 $\mu$ L) を適切な条件と判断した。

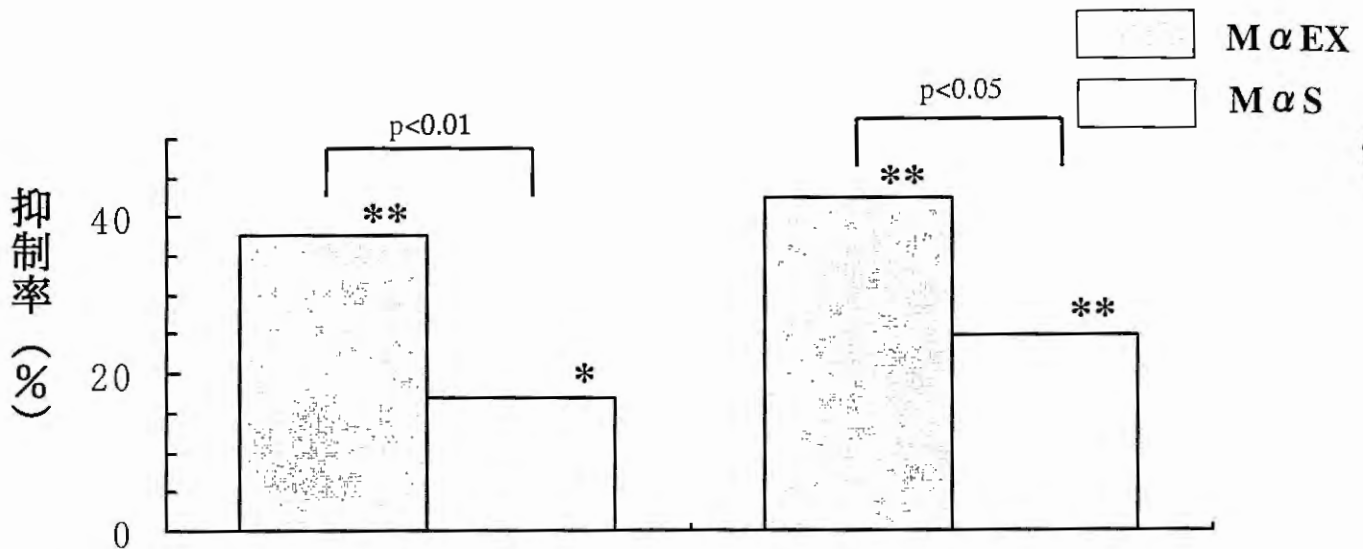


図2 マウスの耳介浮腫モデルでの薬効評価

PRO を用いたマウスの耳介浮腫モデルにより、MaEX と MaS の効力を比較した。

\*\* p < 0.01 \* p < 0.05 (Tukey's test)

以上の条件で MaEX と MaS の効力を比較した結果、PRO を用いたモデルは、MaEX が MaS に比べ有意に高い抑制効果を示した。したがって、PRO を用いたマウスの耳介浮腫モデルは、高ランクのステロイド剤が適用されるような虫刺症の新たなモデル実験系として有用と考えられた。

## まとめ

本研究において、我々は、炎症症状が強い虫刺症に類似するモデル実験系として、5HT、BK、PRO および PLA2 による、ラットの皮膚血管透過性亢進モデルおよび、マウスの耳介浮腫モデルの作出を試み、その条件を設定した。

そして、これらのモデルに対する、MaEX と MaS の効力を比較した結果、MaEX は、5HT、PRO および PLA2 によるラットの皮膚血管透過性亢進モデル、PRO によるマウスの耳介浮腫モデルにおいて、MaS に対し高い抑制効果を示した。したがって、これらの実験モデルは、高ランクのステロイド剤が適用されるような虫刺症の新たなモデル実験系として有用と考えられた。

## 文 献

- 1)加納六郎：皮膚病診療, 22 (増) , 40-48, (2000)
- 2)Katayama S, Shionoya H, Ohtake S. : Microbiol Immunol, 22, 89-101 (1978)

# HPLCにおける移動相溶媒削減について (第1報)

## —各種 ODS カラムを用いた基礎的検討—

Economizing on the solvents of the mobile phase in high performance liquid chromatography (Part 1)

- The fundamental studies with various ODS columns -

富山県薬事研究会分析部会 —環境にやさしい分析法分科会 (HPLC) —

Division of Analytical Chemistry

Toyama Pharmaceutical Research Association

種岡 剛太	アステラス富山株式会社
Gouta TANEOKA	Astellas Toyama Co., Ltd.
砂河 茂樹	アステラス富山株式会社
Shigeki SUNAKAWA	Astellas Toyama Co., Ltd.
勝部 祐至	カネボウ株式会社
Yuji KATSUBE	Kanebo, Ltd.
○秋元 住江	株式会社廣貫堂
Sumie AKIMOTO	Kokando Co., Ltd.
山室 芳樹	共栄製薬株式会社
Yoshiki YAMAMURO	Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.
小嶋 玲子	第一薬品工業株式会社
Reiko KOJIMA	Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.
林 智子	大協薬品工業株式会社
Tomoko HAYASHI	Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
椿原 多恵子	テイカ製薬株式会社
Taeko TSUBAKIHARA	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
廣田 貴文	東亜薬品株式会社
Takafumi HIROTA	Toa Medicine Co., Ltd.
安田 幸代	東洋ファルマー株式会社
Sachiyo YASUDA	Toyo Pharmar Co., Ltd.
沼田 幸子	富山化学工業株式会社
Sachiko NUMATA	Toyama Chemical Co., Ltd.
村田 恵美子	日医工株式会社
Emiko MURATA	Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.
海老原 ひと美	株式会社富士薬品
Hitomi EBIHARA	Fuji Medicine Co., Ltd.
中坪 彰子	明治薬品株式会社
Akiko NAKATSUBO	Meiji Yakuhin Co., Ltd.
入江 秀和	株式会社陽進堂
Hidekazu IRIE	Yoshindo Inc.
横田 洋一	富山県薬事研究所
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

## 緒 言

医薬品の品質管理における理化学分析法としては、各種クロマトグラフィー、原子吸光光度法、紫外可視吸光度測定法、キャピラリー電気泳動法等があるが、その中でも、HPLC (High Performance Liquid Chromatography) が広く使用される。現在では、粒子径  $5\mu\text{m}$  のオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) を充填した内径  $4.6\text{mm}$ 、長さ  $15\text{cm}$  のカラムが主流で、通常、約  $1\text{mL}/\text{min}$  の移動相流量で用いられる。しかし、本条件では、日常の医薬品品質管理やバリデーションの実施により、アセトニトリル等の有機溶媒を含む移動相を大量に使用し、事業所から排出する。PRTR (Pollutant Release and Transfer Register) 制度の実施などにより環境問題への意識が高まる今日においては、必ずしも環境に配慮したものとはいえない。また、溶媒・試薬の購入及び廃棄両面のコストも考慮に入れると、可能な限り移動相の使用量を削減するのが望ましい。そこで今回、使用溶媒量の削減を目的として、上記に替わるカラム条件を考案した。モデル試験法において、参加各社所有の HPLC 装置を使用し、その有用性及び問題点について種々検討したので報告する。

## 方 法

### 1. 試 料

ウラシル (U)、アセトアミノフェン (A)、カフェイン (C)、グアイフェネシン (IS)、エテンザミド (E) のそれぞれ  $15$ 、 $75$ 、 $17$ 、 $125$ 、 $90\mu\text{g}/\text{mL}$  のメタノール溶液。

### 2. 分析条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長： $276\text{nm}$ )

カラム及び流量：

(1) 粒子径  $5\mu\text{m}$  の ODS カラム (内径  $4.6\text{mm}$ 、長さ  $15\text{cm}$ )、流量  $1.0\text{mL}/\text{min}$

(2) 粒子径  $5\mu\text{m}$  の ODS カラム (内径  $3.0\text{mm}$ 、長さ  $15\text{cm}$ )、流量  $0.42\text{mL}/\text{min}$

(3) 粒子径  $3\mu\text{m}$  の ODS カラム (内径  $4.6\text{mm}$ 、長さ  $7.5\text{cm}$ )、流量  $1.0\text{mL}/\text{min}$

カラム温度： $40^\circ\text{C}$  付近の一定温度

移動相：水/メタノール混液 (7 : 3)

注入量： $10\mu\text{L}$

注入回数：6 回

### 3. 方 法

参加各社の使用機器に、同一銘柄のカラム(1)、(2)、(3)をそれぞれ接続し、分析条件の流量で各パラメータを測定した。同一銘柄のカラムとして Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス)、CAPCELL PAK  $\text{C}_{18}$  MG (資生堂) 及び YMC-Pack Pro  $\text{C}_{18}$  (ワイエムシィ) を使用した。また、別に(3)としてインタクト社製 Cadenza CD- $\text{C}_{18}$  及び Unison UK- $\text{C}_{18}$  も使用したが、同一銘柄の  $5\mu\text{m}$  カラムがないため、製法が類似しているとされる L-column (化学物質評価研究機構、 $4.6\times 150\text{mm}$ ) を(1)として用いた。そして、銘柄毎に 3~4 社のグループで共同実験することで、使用機器の相違が分離に及ぼす情報も収集した。

## 結 果

Fig. 1 に CAPCELL PAK  $\text{C}_{18}$  MG のカラムを用いて分析を行ったときのクロマトグラムを示した。また、Fig. 2~7 に各カラムの分析条件(1)、(2)、(3)における主なパラメータ値について(1)を 100 に換算して表したものを示す。いずれのカラムにおいても同様の傾向を示した。また、デッドボリュームの異なる HPLC に接続した Cadenza CD- $\text{C}_{18}$  の理論段数について、L-column の理論段数を 100 に換算して表わしたものを示す (Fig. 8)。さらに、今回の分析条件下で各種カラムを用いたときの圧力を Table 1 に示す。



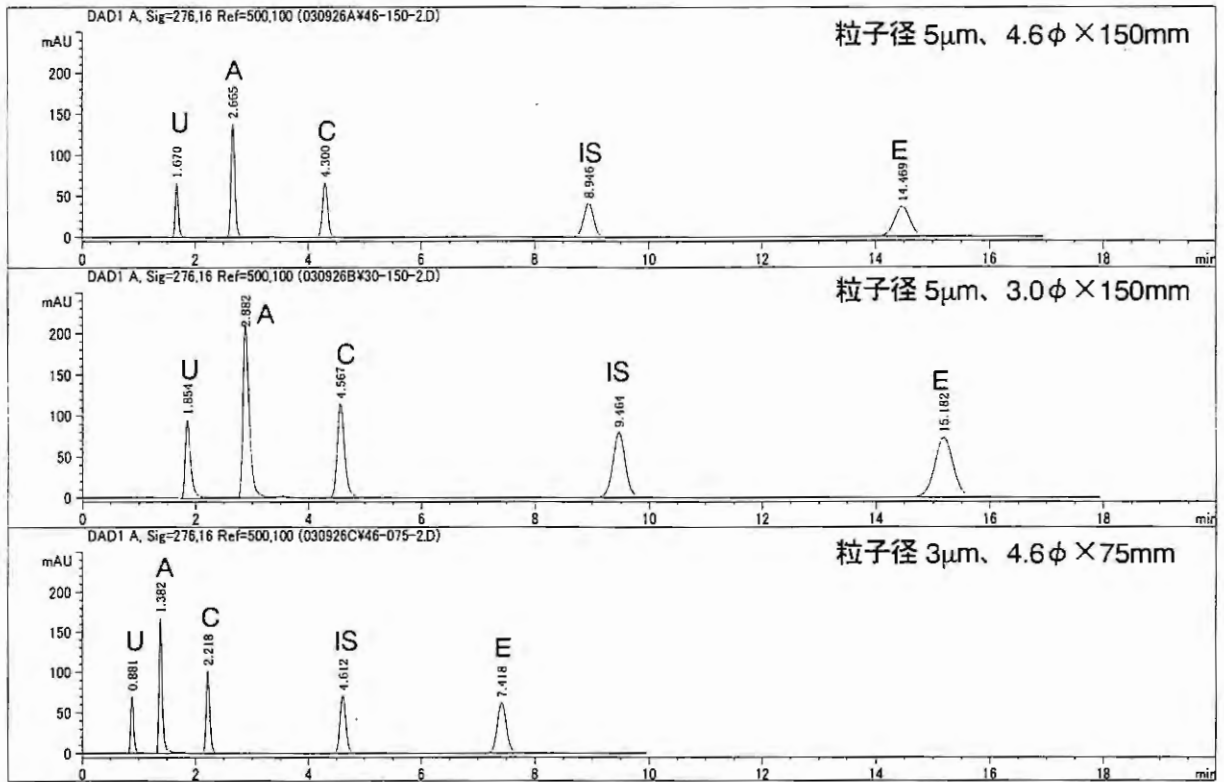


Fig. 1. クロマトグラム (CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG)

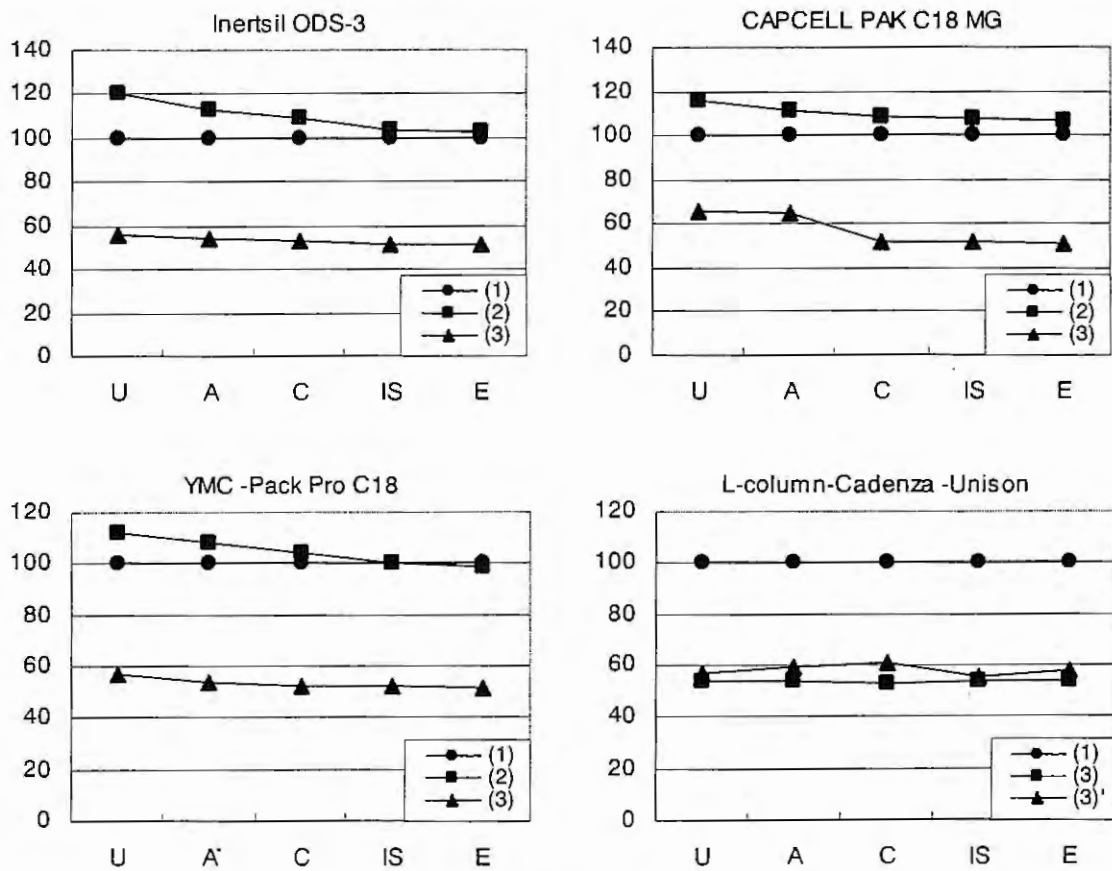


Fig. 2. 保持時間 (1)を100とした)



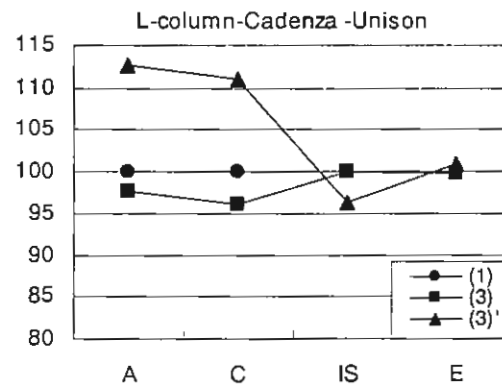
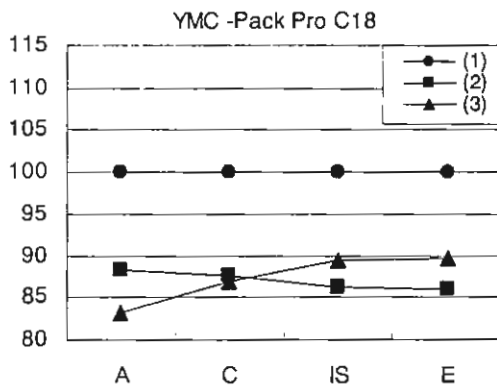
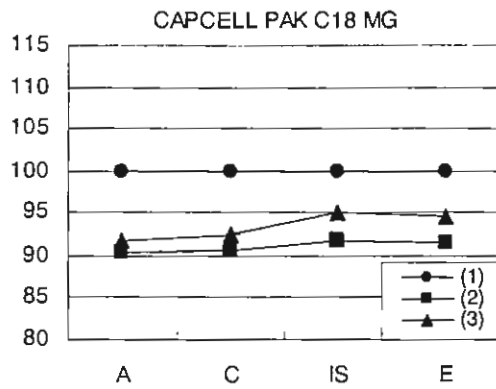
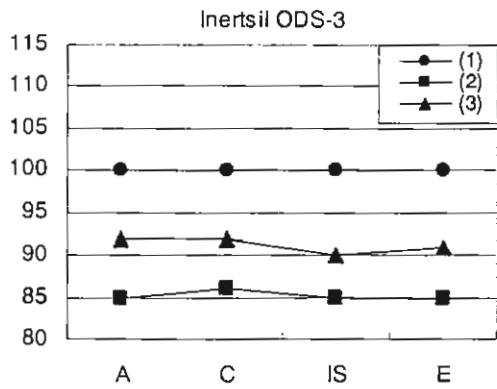


Fig. 3. 保持容量 ((1)を100とした)

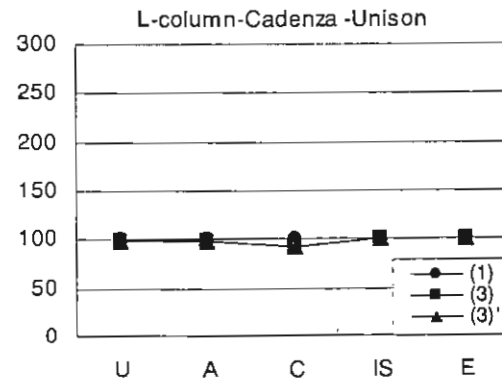
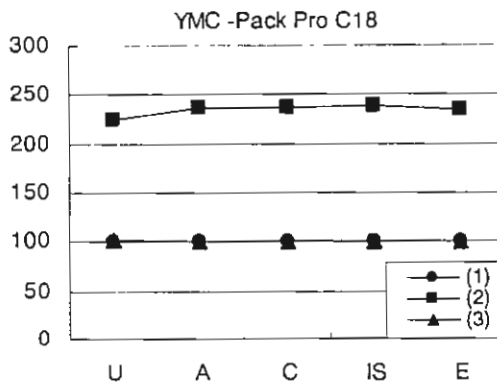
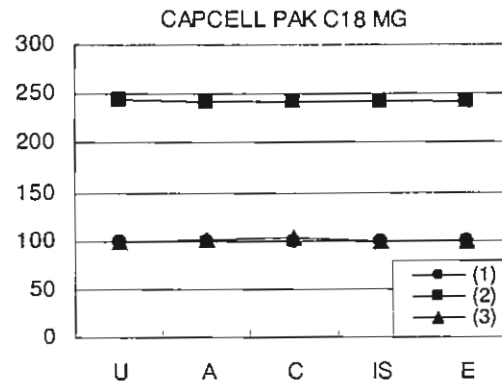
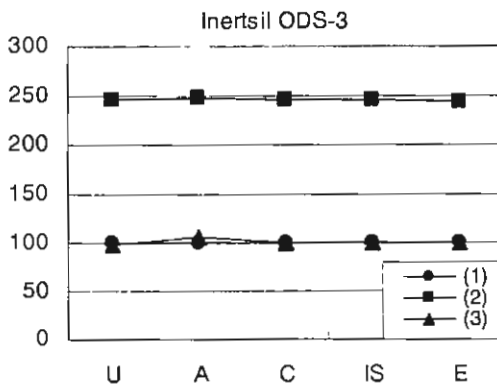


Fig. 4. ピーク面積 ((1)を100とした)

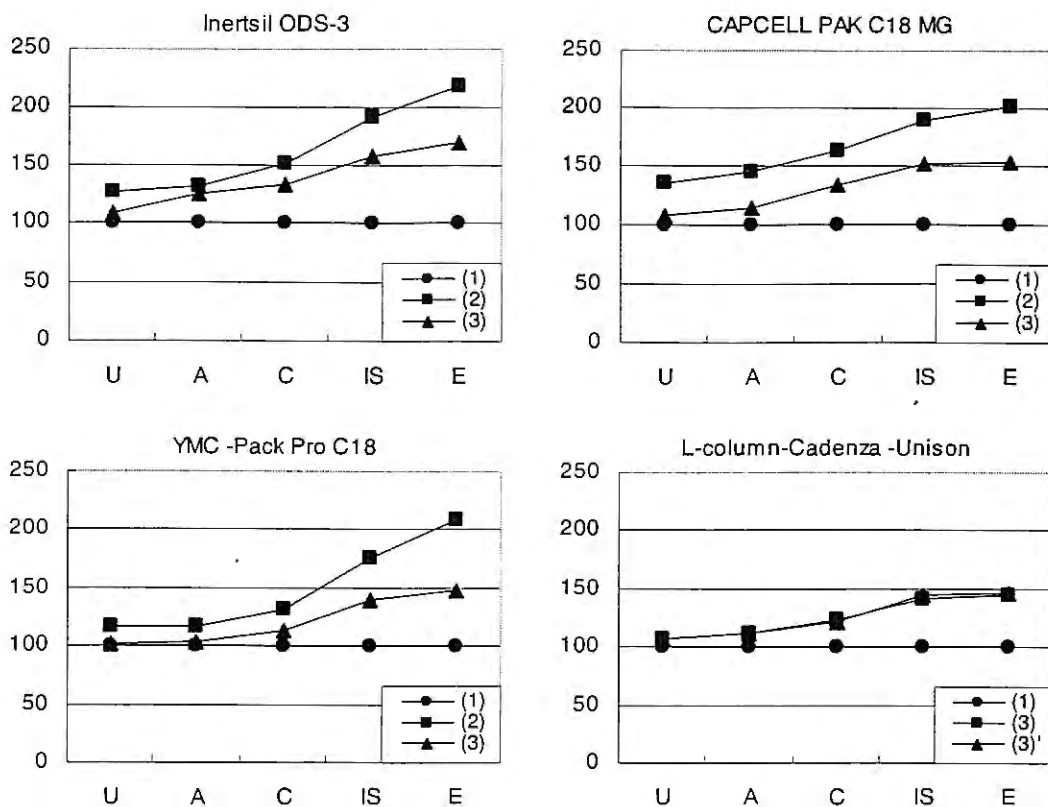


Fig. 5. ピーク高さ ((1) を 100 とした)

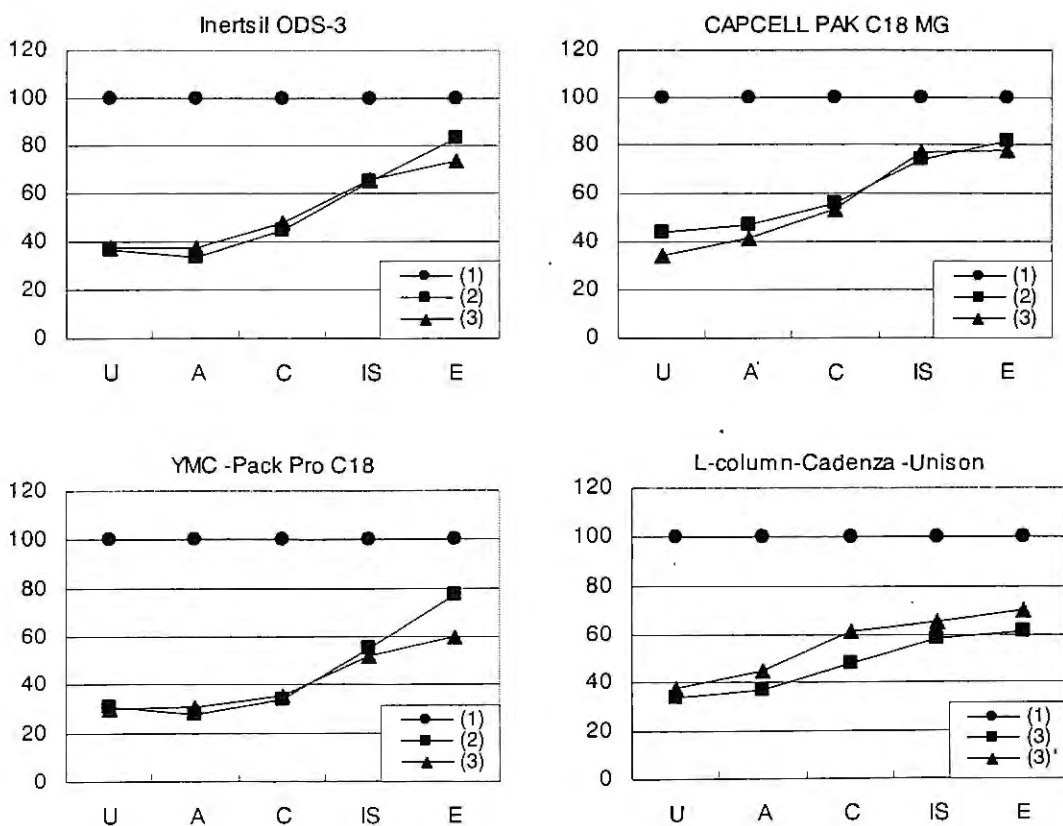


Fig. 6. 理論段数 ((1) を 100 とした)

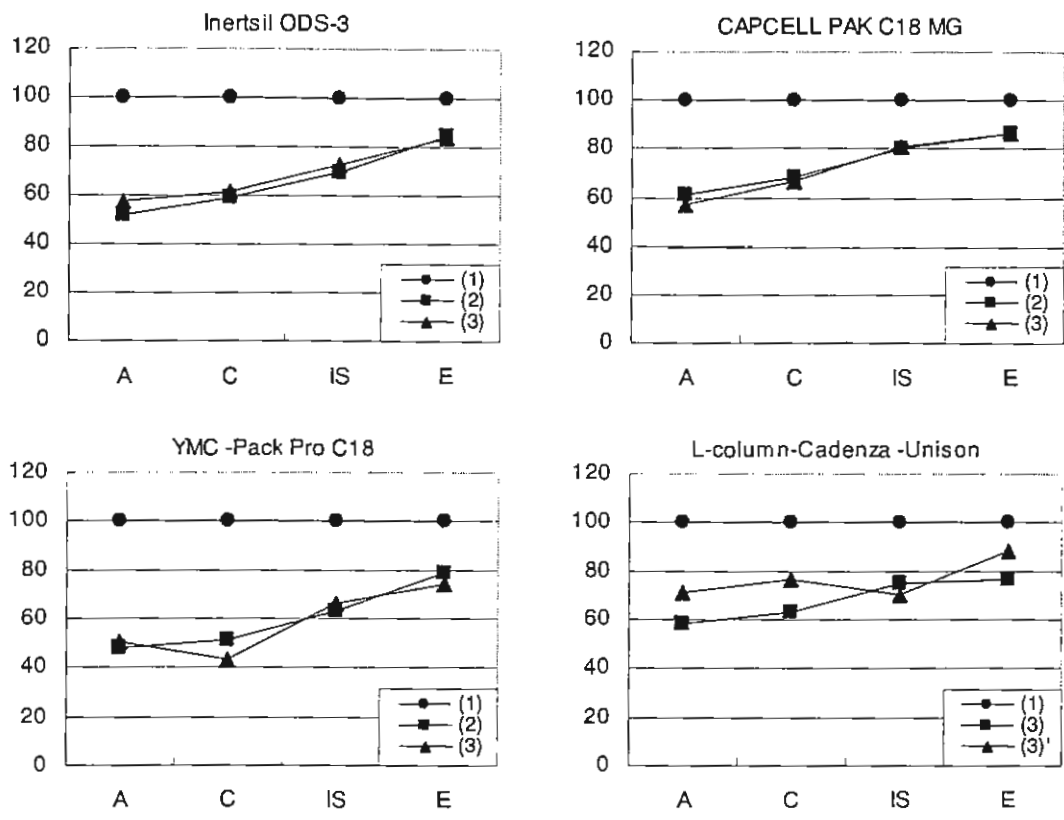


Fig. 7. 分離度 (1) を 100 とした

Table 1. 各種カラムを用いたときの圧力 (kgf/cm<sup>2</sup>)

	4.6φ × 150mm, 5μm	3.0φ × 150mm, 5μm	4.6φ × 75mm, 3μm
Inertsil ODS-3	54.3	48.3	83.0
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> MG	90.7	75.3	121.0
YMC-Pack Pro C18	113.0	96.3	113.0
L-column	67.9	—	—
Cadenza CD-C18	—	—	82.4
Unison UK-C18	—	—	85.9

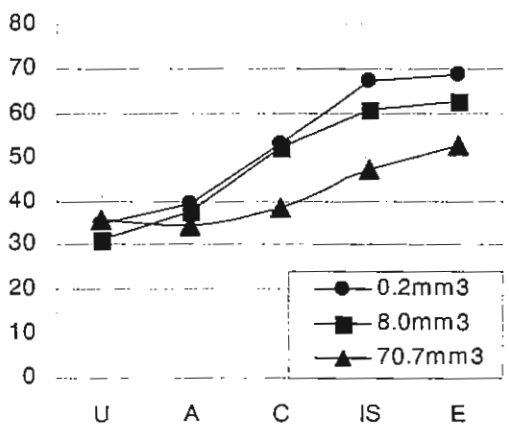


Fig. 8. デッドボリュームと理論段数の関係 (L-column の理論段数を 100 とした)

## 考 察

1. 移動相溶媒にメタノールを用いると、アセトニトリルの場合よりも圧力は高くなるが、いずれもカラムや装置の耐圧以下であり、それらへの負担は少ないものと思われる。(3) の場合、特に Inertsil ODS-3、Cadenza CD-C18、Unison UK-C18 は  $100\text{kgf/cm}^2$  未満で使用しやすいものとする。
2. RT (保持時間) は、(2)は(1)とそれほど変わらないが、流量が  $0.42\text{mL/min}$  であるので、使用溶媒は(1)の半分以下となった。(3)は(1)のほぼ 50%近い値が得られ、使用溶媒及び分析時間とも(1)の約半分となり、両方の削減効果が得られた。
3.  $k'$  (保持容量) は(2)、(3)とも(1)より若干低い値を示したことから、いずれも保持の低下の可能性が示唆された。
4. ピーク面積は(3)は(1)と同じであったが、(2)は約 2.4 倍となり、これは内径の二乗に反比例して増大したものと考えられた。ピーク高さでは(3)も(1)より若干増大する傾向であった。
5.  $N$  (理論段数) は(2)、(3)とも(1)より減少し、RT の小さなものほど減少したが、オートサンプラーからカラムまでの配管の容積、即ちデッドボリュームが小さい機器ほど、その減少度は小さい傾向を示した。 $R_s$  (分離度) も同様の傾向を示した。 $N$  や  $R_s$  については(2)、(3)による溶出の早い物質の分析には課題を残した。

以上のモデル実験から、粒子径  $3\mu\text{m}$ 、 $4.6\times 75\text{mm}$  のカラムでは、溶出の早い物質では従来のカラムより理論段数は低下するものの、分析時間と使用溶媒の両方の削減効果を得られることが分かった。今後は実際の医薬品分析に応用し、その効果を確かめる予定である。

# HPLC における移動相溶媒削減について (第2報)

## —3 $\mu$ m ODS カラムの使用実例—

Economizing on the solvents of the mobile phase in high performance liquid chromatography (Part 2)

- The applied cases of using 3 $\mu$ m ODS columns -

富山県薬事研究会分析部会 —環境にやさしい分析法分科会 (HPLC) —

Division of Analytical Chemistry

Toyama Pharmaceutical Research Association

種岡 剛太	アステラス富山株式会社
Gouta TANEOKA	Astellas Toyama Co., Ltd.
砂河 茂樹	アステラス富山株式会社
Shigeki SUNAKAWA	Astellas Toyama Co., Ltd.
中田 ひとみ	アステラス富山株式会社
Hitomi NAKATA	Astellas Toyama Co., Ltd.
○勝部 祐至	カネボウ株式会社
Yuji KATSUBE	Kanebo, Ltd.
秋元 住江	株式会社廣貫堂
Sumie AKIMOTO	Kokando Co., Ltd.
山室 芳樹	共栄製薬株式会社
Yoshiki YAMAMURO	Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.
林 智子	大協薬品工業株式会社
Tomoko HAYASHI	Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
椿原 多恵子	テイカ製薬株式会社
Taeko TSUBAKIHARA	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
新田 香織	東亜薬品株式会社
Kaori NITTA	Toa Medicine Co., Ltd.
平井 雄一郎	東洋ファルマー株式会社
Yuichiro HIRAI	Toyo Pharmar Co., Ltd.
沼田 幸子	富山化学工業株式会社
Sachiko NUMATA	Toyama Chemical Co., Ltd.
金山 隆秀	日東メディック株式会社
Takahide KANAYAMA	Nitto Medic Co., Ltd.
花木 千穂	株式会社富士薬品
Chiho HANAOKI	Fuji Medicine Co., Ltd.
中坪 彰子	明治薬品株式会社
Akiko NAKATSUBO	Meiji Yakuin Co., Ltd.
入江 秀和	株式会社陽進堂
Hidekazu IRIE	Yoshindo Inc.
横田 洋一	富山県薬事研究所
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

## 緒 言

第1報の結果より、粒子径3 $\mu\text{m}$ 、4.6 $\phi$ ×75mmのオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)カラムは粒子径5 $\mu\text{m}$ 、4.6 $\phi$ ×150mmのODSカラムに比べ、約50%の分析時間及び移動相溶媒の削減効果が得られることが分かった。そこで、各カラムの分離特性を示すパラメーターを調べ、品質評価を行うとともに、種々の製剤及び医薬品原料への応用を検討したので報告する。

## 方 法

### 1. ODSカラムの品質評価

大津らの方法<sup>1)</sup>に準じてTable 1の分析条件で行った場合の各成分について、ウラシル(U)を基準とした保持係数( $k'$ )及び理論段数(N)を計算し、分離特性を示す次の分離係数 $\alpha(k'/k')$ 及び理論段数比 $N(N_1/N_2)$ のパラメーターを求めた。①疎水性相互作用を示す $\alpha(T/B)$ 、②表面極性を示す $\alpha(MB/T)$ 、③水素結合性を示す $\alpha(CF/PH)$ 、④イオン交換性を示す $\alpha(EP/B)$ 、⑤配位結合性を示す $N(PA/T)$ 、⑥平面認識能 $\alpha(TP/OT)$ 及び $\alpha(TS/CS)$ 。なお、これらのパラメーターは3回求めたものの平均値で表した。

評価したODSカラムは、①Inertsil ODS-3(ジーエルサイエンス)、②CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG(資生堂)、③YMC-Pack Pro C18(ワイエムシィ)、④Cadenza CD-18(インタクト)、⑤Unison UK-C18(インタクト)、⑥Atlantis dC<sub>18</sub>(ウォータース)で、サイズは全て粒子径3 $\mu\text{m}$ 、内径4.6mm長さ75mmで、それぞれ2ロット評価した。

Table 1. ODSカラムの品質評価法

操作条件	1		2	
検出器	紫外吸光光度計(測定波長:254nm)			
カラム	粒子径3 $\mu\text{m}$ 、4.6 $\phi$ ×75mm ODSカラム			
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$ 付近の一定温度			
移動相	メタノール/水混液(1:1)		メタノール/水混液(4:1)	
流量	1.0mL/min			
注入量	5 $\mu\text{L}$			
注入回数	3回			
試料溶液	ウラシル(U)	12.6 $\mu\text{g/mL}$	ウラシル(U)	12.5 $\mu\text{g/mL}$
	カフェイン(CF)	31.5	cis-スチルベン(CS)	25.8
	フェノール(PH)	147.5	trans-スチルベン(TS)	56.3
	2-エチルピリジン(EP)	38.8	o-テルフェニル(OT)	27.0
	安息香酸メチル(MB)	245.8	トリフェニレン(TP)	5.0
	ベンゼン(B)	1250.2	のメタノール溶液	
	N,N-ジメチルアニリン(DA)	40.1		
	トルエン(T)	725.3		
	フェニルアセチルアセトン(PA)	122.6		
	のメタノール溶液			

### 2. モデル実験

1より得られた結果に基づき、3種のカラム(YMC-Pack Pro C18、Cadenza CD-C18、Unison UK-C18)を選び、以下のモデル実験を行った。

#### 1) 脂溶性ビタミン類分析法の検討

Table 2に示す脂溶性ビタミン類を含有する試料溶液(移動相溶液)を作製し、次の分析条件で分析を行った。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：254nm）  
 カラム温度：40℃付近の一定温度  
 移動相：アセトニトリル/メタノール混液（4：1）  
 流量：1.0mL/min  
 注入量：5μL

Table 2. 脂溶性ビタミン類試料溶液（移動相溶液）

成分	濃度 (μg/mL)
ビタミン K <sub>3</sub> (K3)	2.0
酢酸レチノール (A acetate)	40.0
ビタミン D <sub>2</sub> (D2)	22.0
ビタミン D <sub>3</sub> (D3)	24.0
酢酸トコフェロール (E acetate)	130.0
ビタミン K <sub>1</sub> (K1)	40.0
パルミチン酸レチノール (A palmitate)	20.0

## 2) 水溶性ビタミン類分析法の検討

モデル製剤（液剤）中の水溶性ビタミン類の定量を行った。モデル製剤は 50mL 中、硝酸チアミン（B1）20mg、リン酸リボフラビナトリウム（B2）12mg、塩酸ピリドキシン（B6）50mg、ニコチン酸アミド（NA）60mg 含有するように調製し、D-ソルビトール、白糖、クエン酸、安息香酸ナトリウムを添加した。本製剤について、次の分析条件で分析を行った。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：270nm）  
 カラム温度：40℃付近の一定温度  
 移動相：0.2%リン酸含有 5mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液/アセトニトリル混液（9：1）  
 流量：1.0mL/min  
 注入量：5μL

## 3) 抗生物質の純度試験に関する検討

日本薬局方第一部収載セフチゾキシムナトリウムの純度試験について検討した。105℃5 日間保存のセフチゾキシム 20mg を pH7.0 の 0.1mol/L リン酸塩緩衝液 20mL に溶かし試料溶液とし、次の条件で試験を行った。また、日局記載の粒子径 10μm、4.6φ×250mm のカラムも使用し、比較を行った。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：254nm）  
 カラム温度：35℃付近の一定温度  
 移動相：リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.31g およびクエン酸一水和物 1.42g を水 1000mL に溶かし、薄めたリン酸（1→10）を加えて pH3.6 に調整し、この液 200mL にアセトニトリル 10mL を加えた。  
 流量：セフチゾキシムの保持時間が約 12 分となるように調整した。  
 面積測定範囲：溶媒のピークの後から、セフチゾキシムの保持時間の約 5 倍の範囲。  
 注入量：50μL

## 4) 生薬配合製剤の分析法に関する検討

ベラドンナエキス配合のモデル製剤（マレイン酸クロルフェニラミン含有鼻炎薬）を作製し、アトロピンの定量を行った。モデル製剤は、薄めたリン酸（1→1000）で抽出し、内標準物質（塩酸ナファゾリン）を加えた後次の操作条件で分析を行った。



検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210nm）

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：薄めたリン酸（1→1000）620mL およびアセトニトリル 380mL の混液にラウリル硫酸ナトリウム 3g を加えたもの。

流量：1.0mL/min

注入量：10 $\mu$ L

## 結 果

### 1. ODS カラムの品質評価

操作条件 1 及び 2 で分析を行ったときのクロマトグラムをそれぞれ Fig.1 及び Fig.2 に示した。クロマトグラムから明らかなように、操作条件 1 における Inertsil ODS-3 では、10～17 分ぐらいでベースラインが盛り上がり、金属と錯体を作るフェニルアセチルアセトンのピークが検出されず、CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG においても、PA のピークがテーリングした。最近のカラムの金属含有量は低くコントロールされているとされており、この原因については検討中である。

各ピークの理論段数は Fig. 3 に示した。Atlantis dC<sub>18</sub> では MB と B のピークが重なり、CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG の 1 ロットは PA のピークを検出することができなかったので、これらの理論段数はグラフには示さなかった。溶出の早いピークの理論段数には第 1 報の結果と同様に課題を残したが、ピークが保持されるにしたがって理論段数は高くなった。但し、Inertsil ODS-3 は溶出の早いピークは理論段数が他のカラムよりも高いが、保持時間の遅いピークになるにしたがって他のものほど理論段数が高くない結果であった。

各パラメーター値を Table 3 に示した。疎水性相互作用を示す  $\alpha(T/B)$  は、一般にカーボン量が多い充填剤ほど高くなる傾向を示す。高極性物質の分離に利用する Atlantis dC<sub>18</sub> や Unison UK-C18 の分析カラムは  $\alpha(T/B)$  が低かった。

水素結合性は残存シラノール基などの水酸基に依存するが、エンドキャップが良好な充填剤ほど小さい値を示す傾向がある。高極性物質の分離に使用される Atlantis dC<sub>18</sub> 及び Unison UK-C18 は高値を示し、エンドキャップが従来法とは違うとされる Cadenza CD-C18 は最小値を示した。

イオン交換性を示す  $\alpha(EP/B)$  の大きい充填剤ほど、塩基性物質を強く吸着したり、保持が遅れたり、テーリングを起こしたりする。Inertsil ODS-3 及び YMC-Pack Pro C18 は、評価したカラムの中では最小値を示した。なお、Cadenza CD-C18 では  $\alpha(EP/B)$  の数値としては、高極性物質分離用カラムと同程度であるものの、EP がややテーリングを起こした。

平面認識能を示す  $\alpha(TP/OP)$  が大きいほど平面認識能が高く、非平面化合物 OT より平面的な TP のほうが保持されやすいことを示している。一般にポリメリック ODS が高い値を示すことが知られているが、今回評価した中では Cadenza CD-C18 が最も高く、立体的なかさ高さの異なる化合物の認識に優れていると思われる。

移動相溶媒にメタノールを用いると圧力が高くなるが、このような移動相条件でも Inertsil ODS-3、Cadenza CD-C18 及び Unison UK-C18 は 100kgf/cm<sup>2</sup> 未満で使用しやすいものと思われた。

以上の結果より、特徴的な性質を示す③YMC-Pack Pro C18、④Cadenza CD-C18、⑤Unison UK-C18 の 3 種のカラムを用いることとした。

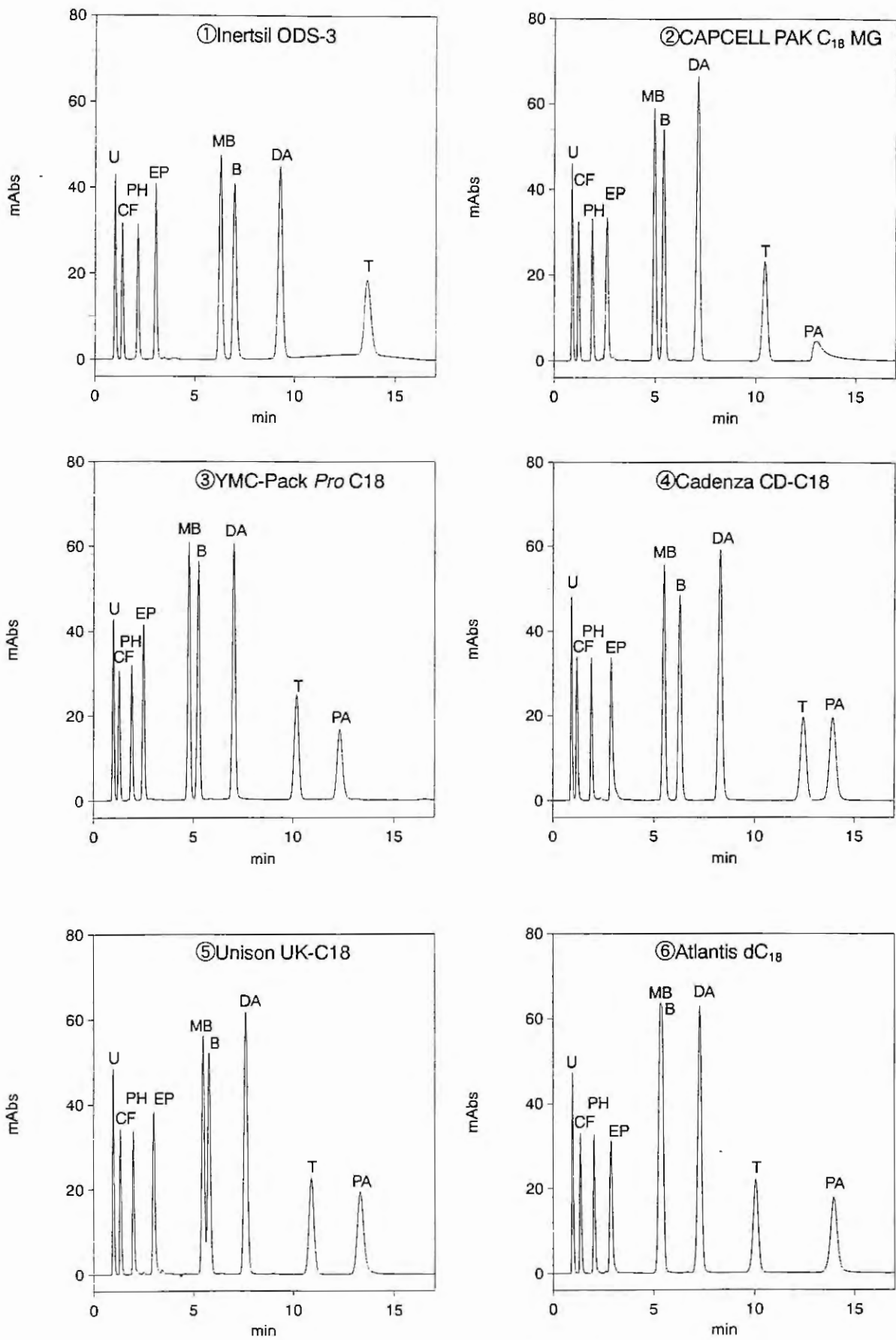


Fig. 1. クロマトグラム (操作条件 1)

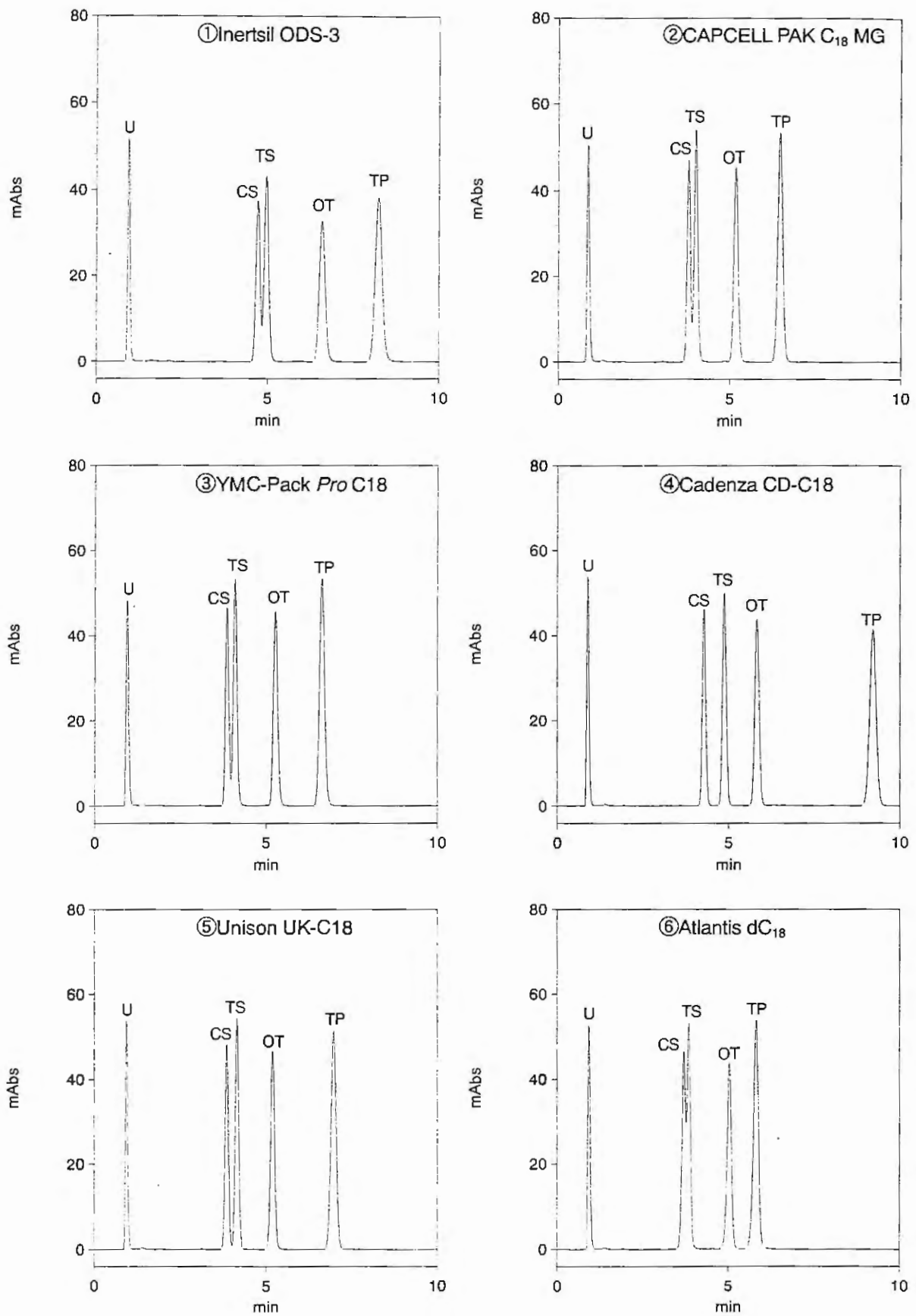


Fig. 2. クロマトグラム (操作条件 2)

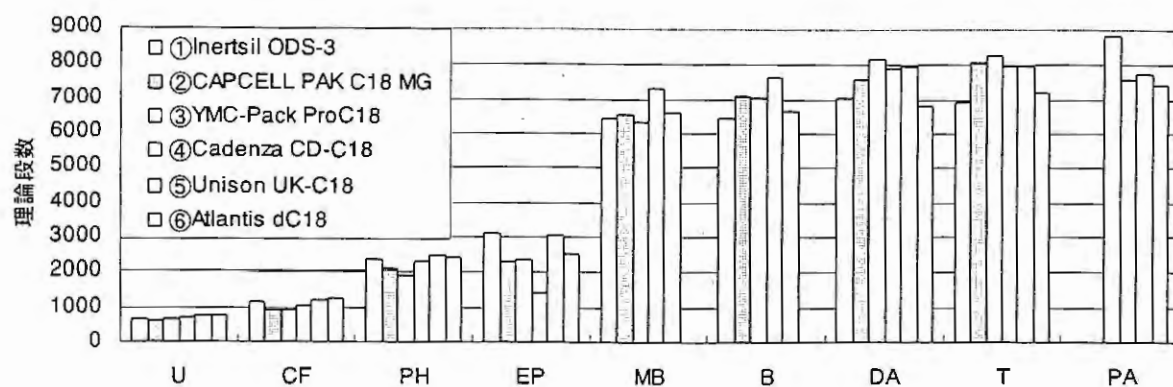


Fig. 3. 各ピークの理論段数

Table 3. 分離特性を示すパラメーター及び圧力

カラム		①	②	③	④	⑤	⑥
疎水性相互作用	$\alpha(T/B)$	2.10	2.11	2.16	2.14	2.07	2.06
表面極性	$\alpha(MB/T)$	0.46	0.48	0.46	0.44	0.50	0.53
水素結合性	$\alpha(CF/PH)$	0.35	0.32	0.32	0.29	0.36	0.38
イオン結合性	$\alpha(EP/B)$	0.35	0.37	0.35	0.43	0.42	0.45
配位結合性	$N(PA/T)$	—	(0.90)	1.06	0.94	0.97	1.03
平面認識能	$\alpha(TP/OT)$	1.30	1.30	1.31	1.69	1.42	1.19
	$\alpha(TS/CS)$	1.07	1.07	1.08	1.18	1.10	1.05
圧力(kgf/cm <sup>2</sup> )	条件 1	95	118	120	91	98	117
	条件 2	72	89	88	66	72	81

( ) : 1 ロットのみの結果、— : 測定不能

## 2. モデル実験結果

### 1) 脂溶性ビタミン類の分析

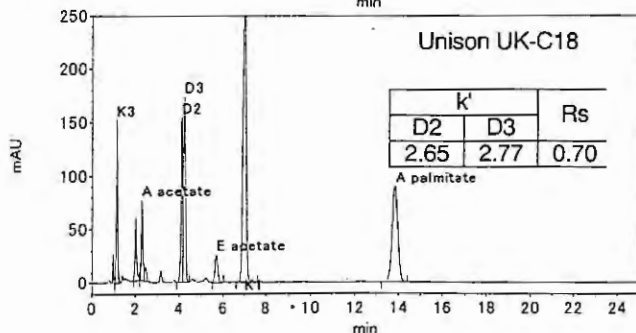
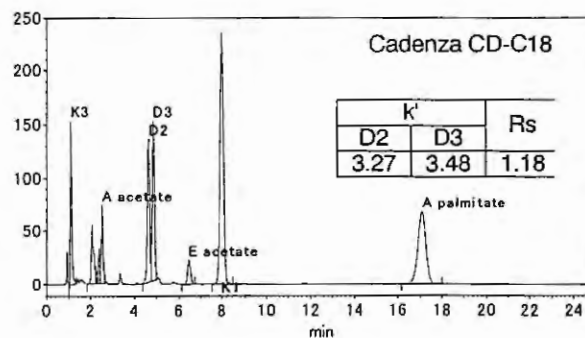
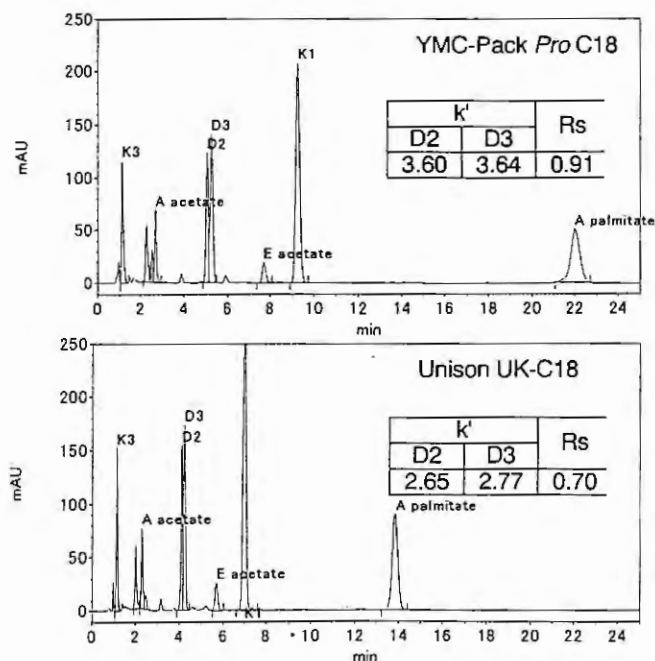


Fig. 4. 脂溶性ビタミン類のクロマトグラム  
クロマトグラム内の表は D2、D3 の保持係数とその分離度を示す。

疎水性相互作用が最も小さい⑤Unison UK-C18 では A palmitate の溶出が最も早く、D2 と D3 の分離度が悪かった。疎水性相互作用の最も大きい③YMC-Pack Pro C18 では、A palmitate の溶出は遅く、D2 と D3 の分離度は 0.90 であった。一方、平面認識能が最も高い④Cadenza CD-C18 については、構造が類似する D2 と D3 の分離度は 1.18 と 3 種のカラムの中では最も良好であり、また A palmitate の溶出は③より速かった。従って、本カラムにより種々の脂溶性ビタミン類を同時分析が可能で、また従来よりも短時間に分析することができ、溶媒使用量の削減につながると考える。

## 2) モデル製剤における水溶性ビタミン類の分析

モデル製剤中の水溶性ビタミン類の定量結果は Table 4 に示すように、YMC-Pack Pro C18、Unison UK-C18 で分析を行ったとき、各社とも良好な結果を得た。Cadenza CD-C18 については、B2、B6 の分離度が 1.64 であった。Unison UK-C18 については Table 5 に示すように、他のカラムに比べ理論段数、分離度がよかった。水溶性ビタミン類のように極性物質については、Unison UK-C18 のような疎水相互作用が小さく、表面極性が大きい充填剤を用いるのがよいと考える。また、粒子径 5 $\mu$ m、4.6  $\phi$  × 150mm と比較したとき、理論段数は劣るものの、溶出が早く約 50%の保持時間であった。

Table 4. モデル製剤の定量結果

		NA		B6		B2		B1	
		含量	CV	含量	CV	含量	CV	含量	CV
③ YMC-Pack Pro C18	A社	100.03	0.43	100.88	0.50	101.55	0.71	98.49	0.41
	B社	100.87	0.11	100.91	0.13	102.64	0.09	100.70	0.07
	C社	99.27	3.27	99.23	3.17	98.33	3.76	98.93	3.54
	D社	99.55	0.10	99.44	0.17	99.76	0.20	100.51	0.07
④ Cadenza CD-C18	A社	100.38	0.48	100.29	0.11	101.30	0.62	101.48	0.24
	B社	99.25	0.37	—	—	—	—	97.30	0.36
	C社	93.42	9.11	—	—	—	—	93.58	8.48
	D社	99.42	0.86	—	—	—	—	100.01	0.09
⑤ Unison UK-C18	A社	99.58	0.41	100.11	0.36	102.01	0.58	100.90	0.22
	B社	99.31	0.77	99.29	0.78	100.45	0.82	98.08	0.83
	C社	100.71	1.78	101.17	1.65	100.49	0.63	100.16	1.22
	D社	98.04	1.74	98.51	0.89	99.83	0.44	100.45	0.16

含量：対仕込量(%), CV：相対標準偏差(%), —：定量不能

Table 5. 各ピークの理論段数及び分離度について

		YMC-Pack Pro C18		Unison UK-C18
		4.6 $\phi$ × 150mm 5 $\mu$ m	4.6 $\phi$ × 75mm 3 $\mu$ m	
理論段数	NA	9387	1915	2452
	B6	7837	2398	4574
	B2	11201	4055	4757
	B1	14129	6259	7152
分離度	NA:B6	8.43	4.52	6.23
	B6:B2	7.98	4.63	4.97
	B2:B1	5.88	4.08	5.24

### 3) 抗生物質の純度試験に関する検討

過酷な保存条件により副生成物及び分解物の生成を促進したセフチゾキシムナトリウムを用いた。クロマトグラムを Fig. 5 に示し、各ピークの理論段数及び分離度をそれぞれ Table 6 及び 7 に示した。検討した 3 種のカラムにおいて、副生成物及び分解物は溶出順、理論段数及び分離度においてほとんど差異は認められなかった。Unison UK-C18 の特徴は、水 100%系溶離液に対応し、高極性化合物の保持・分離特性に優れていると言われ、カラムの持続性等も考慮に入れると、Unison UK-C18 が今回の測定対象物に適しているように思われた。

YMC の粒子径  $3\mu\text{m}$ 、 $4.6\phi \times 75\text{mm}$  のカラムと対照とした日局記載の粒子径  $10\mu\text{m}$ 、 $4.6\phi \times 250\text{mm}$  のカラムを比較すると、測定対象とした A~E 全てのピークで理論段数及び分離度は、粒子径  $3\mu\text{m}$ 、 $4.6\phi \times 75\text{mm}$  のカラムが優れていた。また、ピーク高さも増し、高感度であった。

これらの結果から、日局記載の粒子径  $10\mu\text{m}$ 、 $4.6\phi \times 250\text{mm}$  から粒子径  $3\mu\text{m}$ 、 $4.6\phi \times 75\text{mm}$  のカラムに変更することにより、流量が  $2.8\text{mL}/\text{min}$  から  $0.9\text{mL}/\text{min}$  となるため、溶媒及び試薬（緩衝液など）量は、約  $1/3$  の削減となることがわかった。

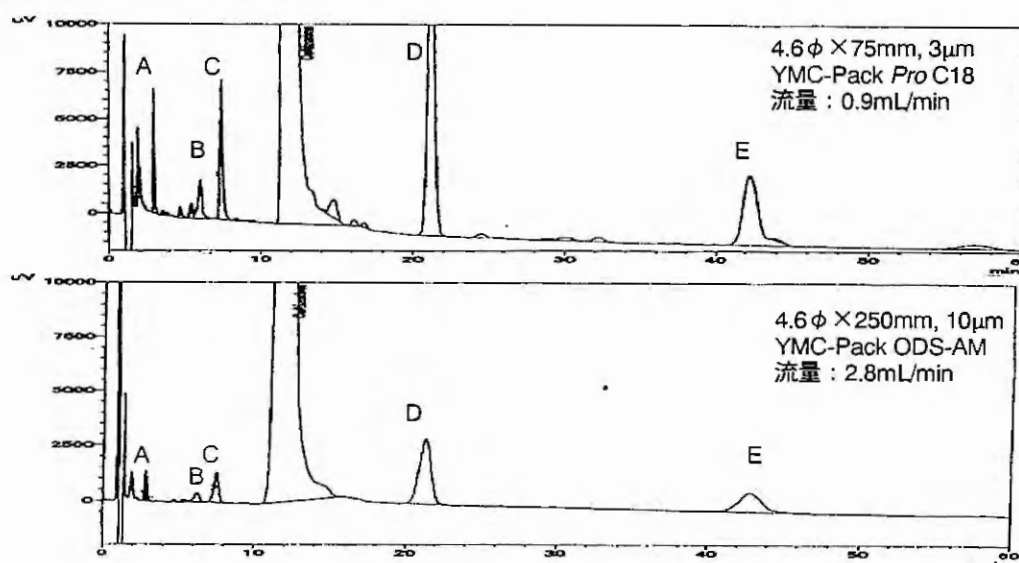


Fig. 5.  $105^{\circ}\text{C}$  5 日間保存したセフチゾキシムナトリウムのクロマトグラム

Table 6. 理論段数

サイズ、粒子径	4.6×250mm 10 $\mu\text{m}$		4.6×75mm 3 $\mu\text{m}$	
カラム名	YMC-Pack ODS-AM	YMC-Pack Pro C18	Cadenza CD-C18	Unison UK-C18
A	2278	5900	5512	6603
B	1415	2370	1656	1517
C	2825	6912	5982	6940
セフチゾキシム	3134	2880	2074	2287
D	3558	10074	9499	10033
E	4054	9274	9474	9479

Table 7. 分離度

サイズ、粒子径	4.6×250mm 10 $\mu\text{m}$		4.6×75mm 3 $\mu\text{m}$	
カラム名	YMC-Pack ODS-AM	YMC-Pack Pro C18	Cadenza CD-C18	Unison UK-C18
A	—	—	—	—
B	7.5	9.5	8.0	7.7
C	2.0	3.2	2.9	3.1
セフチゾキシム	6.3	7.5	6.9	6.9
D	8.2	10.3	9.1	9.2
E	10.5	16.3	16.4	16.8

4) 生薬配合剤の分析法に関する検討

クロマトグラムを Fig. 6 に示した。また、理論段数及び分離度を Table 8 に、定量値の結果を Table 9 に示した。本分析の際、マレイン酸クロルフェニラミンが妨害ピークとして出現し、粒子径 5 $\mu$ m、4.6  $\phi$   $\times$  150mm (YMC-Pack Pro C18) の場合、約 300 分に検出された。これに対し、粒子径 3 $\mu$ m、4.6  $\phi$   $\times$  75mm のカラムでは、妨害ピークの溶出が速やかになり、分析時間が大幅に短縮された。特に、高極性物質分離用カラム Unison UK-C18 では、アトロピンの理論段数は 9920、内標準物質との分離度は 13.35 で 3 種のカラムの中ではいずれも高く、妨害ピークの溶出は約 120 分と対照カラムの約 40% に短縮された。定量値については、Table 8 に示すように、粒子径 5 $\mu$ m、4.6  $\phi$   $\times$  150mm の場合と同等であった。

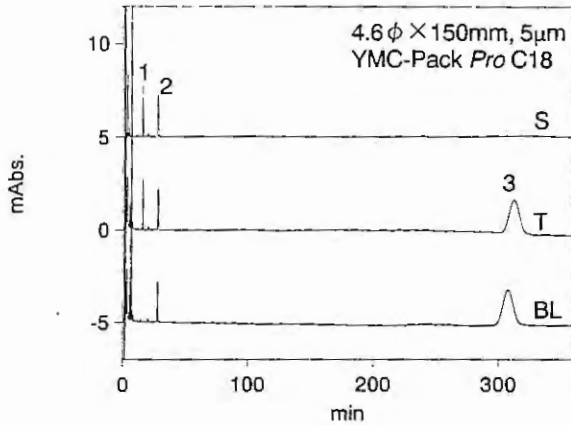


Fig. 6. クロマトグラム

上: YMC-Pack Pro C18(4.6  $\phi$   $\times$  150mm、5 $\mu$ m)

下: Unison UK-C18(4.6  $\phi$   $\times$  75mm、3 $\mu$ m)

左下: 分析時間 140 分まで

右下: 分析時間 20 分まで

1: アトロピン、2: 内標準物質、3: マレイン酸クロルフェニラミン

S: 標準溶液、T: 試料溶液、BL: ブランク溶液

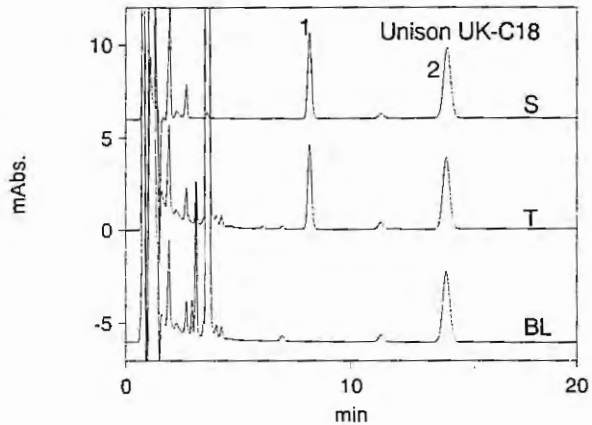
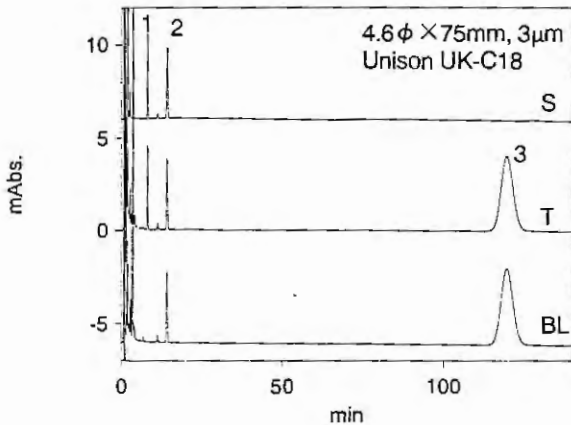


Table 8. 理論段数及び分離度

	粒子径 5 $\mu$ m 4.6 $\phi$ $\times$ 150mm	粒子径 3 $\mu$ m、4.6 $\phi$ $\times$ 75mm		
		YMC-Pack Pro C18	Cadenza CD-C18	Unison UK-C18
理論段数	1	14929	9277	9531
	2	13605	8566	8462
分離度	1:2	15.13	12.76	13.09

1: アトロピン、2: 内標準物質

Table 9. 定量値

	粒子径 5 $\mu$ m 4.6 $\phi$ $\times$ 150mm	粒子径 3 $\mu$ m、4.6 $\phi$ $\times$ 75mm		
		YMC-Pack Pro C18	Cadenza CD-C18	Unison UK-C18
含量(%)	0.263, 0.270, 0.268	0.265, 0.270, 0.268	0.257, 0.272, 0.267	0.264, 0.271, 0.267
平均含量(%)	0.267	0.268	0.265	0.267
標準偏差	0.0036	0.0025	0.0076	0.0035
R.S.D.(%)	1.35	0.93	2.87	1.31

R.S.D.: 相対標準偏差



## まとめ

参加各社が通常 HPLC を行う装置を用いて粒子径 3 $\mu$ m、4.6 $\phi$ ×75mm の ODS カラムの品質評価を行い、それぞれの分離特性を把握した上で、4 つのモデル実験を行った。その結果、移動相にイオン対試薬が配合されても、もとのカラムの特性が分離に影響を与えることが明らかとなった。また、粒子径 5 $\mu$ m、4.6 $\phi$ ×150mm と比較すると、理論段数は劣るものの短時間で分析が可能であった。定量したモデル製剤については、定量値も問題ないものと思われる。

実際の品質管理に応用するには、耐久性、理論段数の改善策の検討、分析バリデーション等の実施が必要であるが、移動相溶媒使用量の削減と分析時間の短縮には十分期待できると考えられた。

## 引用文献

- 1)大津他、クロマトグラフィー、**11**(4)、48-49 (1990)

# 各種抗酸化物質のがん転移抑制効果の比較検討と 作用メカニズムの解析

## Differential Effects of Antioxidants on Tumor Metastasis and Analysis on a Mechanism of Action

小笠原勝                      松永孝之                      鈴木英世  
Masaru OGASAWAR   Takayuki MATSUNAGA   Hideyo SUZUKI

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

### 緒 言

近年の外科手術、放射線療法の進歩によって、がん原発巣の除去技術の発展は目覚ましいものがある。しかし、日本では現在、3人に1人が癌で亡くなっている。この主な原因の一つは、がんの転移を阻止できないことであり、がん転移抑制剤の開発は、がん患者の延命に関わる最重要課題の一つとして位置付けられている。

がんの転移は、原発巣から離脱したがん細胞が血管内に侵入し、免疫細胞の監視から逃れて、血流に乗って他の臓器へと運ばれ、毛細血管に着床した後、血管内から組織内へと浸潤して、新生血管を伴いながら増殖することにより成立する<sup>1)</sup>。したがって、これらのうちいずれかの過程が阻害されるならば、がんの転移は阻止され得ると期待される。

従来、がんの転移および転移したがんの治療には殺細胞作用を作用メカニズムとする抗がん剤が主に使用されてきた。しかし、それは同時に骨髄毒性をはじめとする種々の副作用を引き起こすとともに有効性の点でも満足できる薬剤ではなかった。他方、比較的副作用が少なくがん転移抑制効果が期待される薬剤として、がん細胞の血管壁への接着に対する阻害剤<sup>2)</sup>、がん細胞の浸潤に関わる酵素の阻害剤<sup>3)</sup>、免疫賦活剤<sup>4)</sup>、などが報告されているが、十分な薬効が確立されているものはなく、より有効性が高く長期投与においても安全な薬剤の開発が切望されているのが現状である。

抗酸化物質は植物等に含まれる機能性成分の一つであり、近年、活性酸素種が関与する様々な病態の発症・進展予防に有効である可能性が示唆されている。とりわけ、がん研究においては、これまで発がん予防に有効であるとする報告が多数なされてきた<sup>5)</sup>。さらに最近では、動物を用いた基礎実験において数種の抗酸化物質にがん転移抑制作用が示され<sup>6-18)</sup>、また、臨床的にもビタミンCと抗癌剤の併用に有用性が報告されるなど<sup>19)</sup>、がん転移の予防・治療における抗酸化物質の有用性が示唆されている。しかし、どの抗酸化物質に最も高い有用性が期待できるのか、また、作用メカニズムについても十分には明らかにされていない。

本研究では、マウス結腸がん細胞の実験的肺転移モデルを用いて、既に機能性成分として利用されている抗酸化物質を中心に18種の天然由来抗酸化物質について、がん転移抑制効果を比較検討した。

## 実験方法

### 1. 実験試薬

抗酸化物質は和光純薬工業またはシグマ・アルドリッチより購入し、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して実験に用いた。

### 2. 細胞及び細胞培養

マウス結腸がん細胞株: colon26-L5 は 済木育夫 教授(富山大学、和漢医薬学総合研究所)より供与された。細胞は 10%の非働化ウシ胎児血清(FBS)、100 U/ml のペニシリン、0.1 mg/ml のストレプトマイシン及び 55  $\mu$ M の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 培地中にて継代、維持した。

### 3. 実験的癌転移抑制実験

リン酸緩衝生理食塩水(200  $\mu$ l)に懸濁したがん細胞( $4 \times 10^4$ 個)をマウス(Balb/c、7週令、雌)に尾静脈より接種し、13日後に肺を摘出して、肺表面に形成された転移結節の数を实体顕微鏡下にて計測し、がん転移の指標とした。被検体はがん接種3日前から接種1日後まで、一日一回、計5回腹腔内に投与した。対照群にはDMSOを同様にして投与した。実験には一群当たり5匹のマウスを使用した。

### 4. 統計処理

測定値の有意差検定は、ステューデントの *t* 検定により行い、有意水準(P)が5%未満の場合に有意であるとした。

## 結 果

### 1. 各種抗酸化物質の癌転移抑制活性の比較検討

18種の抗酸化物質について、がん転移抑制活性を比較検討した(Fig. 1)。投与量は、1  $\mu$ mol/マウス/日とし、癌接種の前後5日間、腹腔内に連日投与した。その結果、エピガロカテキンガレート(EGCG)及びゲニステインに統計的に有意な抑制活性を認めた。その他、クエルセチンに若干の抑制活性を認めたが有意な差ではなかった。一方、他のカテキン類(エピカテキンガレートおよびプロシアニジン B2)には抑制効果は認められなかった。そこで、EGCGについて、用量を変えてさらに検討した(Fig. 2)。その結果、EGCGは用量に依存した抑制作用を示し、2  $\mu$ molの投与量において98%の極めて強い抑制効果を示した。また、この用量におけるEGCGの抑制効果は、至適用量でのレンチナン(0.03 mg/マウス/日)の抑制効果よりも強かった。

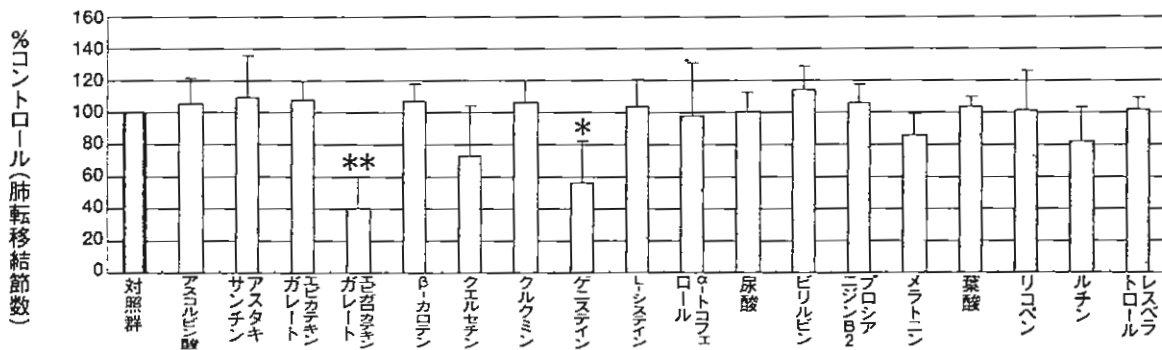


Fig 1 各種抗酸化物質のがん転移抑制効果

## 2. EGCG の抗転移効果における投与タイミングの影響

EGCG の作用点が宿主（マウス）側にあるか否かを明らかにするために、EGCG の投与をがん細胞の接種前と接種後に分けて抗転移効果を比較検討した (Fig. 3)。2  $\mu$  モル/マウスの用量で、EGCG をがん接種前（3 日前～1 日前）に予防的に投与した場合には、約 80% の転移抑制効果が認められた。この効果は、EGCG をがん接種の前後（3 日前～1 日後）で投与した場合の抑制率（約 90%）とほぼ同等であった。一方、EGCG をがん接種後（接種当日および翌日）に投与した場合でも転移は抑制（約 50%）されたが、前投与での効果に比較して弱かった。

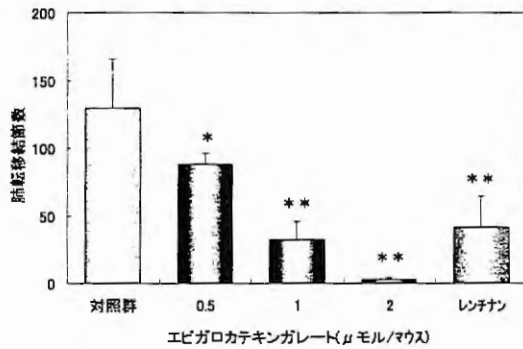


Fig2 エピガロカテキンガレートのがん転移抑制効果

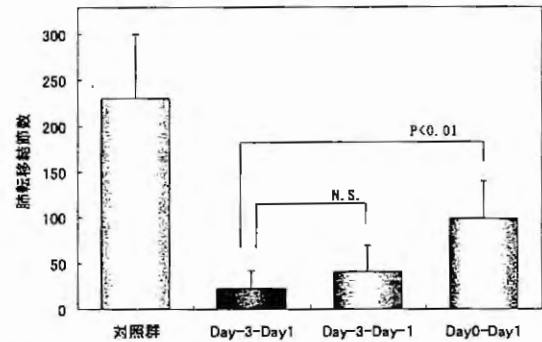


Fig3 エピガロカテキンガレートの抗がん転移効果における投与タイミングの影響

## 考 察

これまでに、抗酸化物質のがん転移抑制作用についてはいくつかの報告がなされていたが、それらは実験ごとに条件が異なるために、どの抗酸化物質に最も高い抑制効果が期待できるのかという、化合物間での作用強度の比較は困難であった。本研究では、これらががん転移抑制作用が報告されている抗酸化物質 10 種 (アスコルビン酸<sup>6)</sup>、アスタキサンチン<sup>7)</sup>、 $\beta$ -カロテン<sup>8)</sup>、クルクミン<sup>9, 10)</sup>、エピガロカテキンガレート<sup>11, 12, 13)</sup>、ゲニステイン<sup>14)</sup>、クエルセチン<sup>15)</sup>、 $\alpha$ -トコフェロール<sup>16)</sup>、ルチン<sup>17)</sup>、レスベラトロール<sup>18)</sup>、その他、内因性抗酸化物質 5 種 (L-システイン、尿酸、ビリルビン、メラトニン、葉酸) など、既に機能性成分として利用されている抗酸化物質を中心に 18 種の抗酸化物質についてがん転移抑制効果を比較検討した。その結果、エピガロカテキンガレート (EGCG) が最も強力な抑制作用を示すことを明らかにした。EGCG のがん転移抑制作用については、既にマウス悪性黒色腫細胞の肺への転移に対して有効であることが報告されている<sup>11, 12, 13)</sup>。本研究の結果は、EGCG がマウス結腸がん細胞の肺への転移に対しても有効であることを示すとともに、既に機能性成分として利用されている抗酸化物質の中では EGCG に比較的高いがん転移抑制効果が期待できることを示唆している。

EGCG の主要な作用メカニズムとしては、我々のこれまでの研究結果<sup>20)</sup>から、従来示されているがん細胞浸潤・増殖の阻害<sup>21, 22)</sup>とは別のメカニズムであることが推察されていた。そこで本研究では、EGCG の作用点が宿主（マウス）側にあるか否かを明らかにするために、EGCG の投与をがん細胞を接種する前後に分けて、抗がん転移効果を検討した。その結果、前投与による効果が前後で投与した際の効果に大きく寄与していることを明らかにした。このことは、EGCG の主な作用点が宿主側にあることを示唆している。宿主において可能性のある作用点としては、免疫系の細胞や血管内皮細胞、血小板などが考えられる。今後はこれらに対する EGCG の影響を詳細に検討していく予定である。

本研究では、既に利用されている抗酸化物質の中では、とりわけ EGCG ながん転移の予防・治療における高い有効性が期待できることを明らかにした。作用メカニズムについては、がん細胞に対する直接的な作用よりも、宿主への影響を介した間接的な作用が重要であると推察された。

文 献

- 1) Poste, G., Fidler, I. J., The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, **283**, 139-146 (1980)
- 2) Saiki, I., Murata, J., Matsuno, K., Ogawa, R., Nishi, N., Tokura, S., Azuma, I., Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly(RGD), and its analogues. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**(6-7), 660-667 (1990)
- 3) Hidalgo, M., Eckhardt, S.G., Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**(3), 178-193 (2001)
- 4) Ishihara, Y., Fujii, T., Iijima, H., Saito, K., Matsunaga, K., The role of neutrophils as cytotoxic cells in lung metastasis: suppression of tumor cell metastasis by a biological response modifier (PSK). *In Vivo*, **12**(2), 175-182 (1998)
- 5) Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*, **21**, 381-406 (2001)
- 6) Taper, H.S., Jamison, J.M., Gilloteaux, J., Summers, J.L., Calderon, P.B., Inhibition of the development of metastases by dietary vitamin C:K3 combination. *Life Sci.*, **75**(8), 955-967 (2004)
- 7) Kurihara, H., Koda, H., Asami, S., Kiso, Y., Tanaka, T., Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.*, **70**(21), 2509-2520 (2002)
- 8) Pradeep, C.R., Kuttan, G., Effect of beta-carotene on the inhibition of lung metastasis in mice. *Phytomedicine*, **10**(2-3), 159-164 (2003)
- 9) Menon, L.G., Kuttan, R., Kuttan, G., Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett.*, **141**(1-2), 159-165 (1999)
- 10) Menon, L.G., Kuttan, R., Kuttan, G., Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett.*, **95**(1-2), 221-225 (1995)
- 11) Liu, J.D., Chen, S.H., Lin, C.L., Tsai, S.H., Liang, Y.C., Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J. Cell. Biochem.*, **83**(4), 631-642 (2001)
- 12) Menon, L.G., Kuttan, R., Kuttan, G., Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compound. *Cancer Lett.*, **95**(1-2), 221-225 (1995)

- 13) Taniguchi, S., Fujiki, H., Kobayashi, H., Go, H., Miyado, K., Sadano, H., Shimokawa, R., Effect of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines. *Cancer Lett.*, 65(1), 51-54 (1992)
- 14) Menon, L.G., Kuttan, R., Nair, M.G., Chang, Y.C., Kuttan, G., Effect of isoflavones genistein and daidzein in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F-10 melanoma cells. *Nutr. Cancer*, 30(1), 74-77 (1998)
- 15) Mouria, M., Gukovskaya, A.S., Jung, Y., Buechler, P., Hines, O.J., Reber, H.A., Pandol S.J. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int. J. Cancer*, 98(5), 761-769 (2002)
- 16) Heukamp, I., Kilian, M., Gregor, J.I., Neumann, A., Jacobi, C.A., Guski, H., Schimke, I., Walz, M.K., Wenger, F.A., Effects of the antioxidative vitamins A, C and E on liver metastasis and intrametastatic lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreatology*, 5(4-5), 403-409 (2005)
- 17) Menon, L.G., Kuttan, R., Kuttan, G., Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compound *Cancer Lett.*, 95(1-2), 221-225 (1995)
- 18) Kimura, Y., Okuda, H., Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J. Nutr.*, 131(6), 1844-1849 (2001)
- 19) Head, K.A., Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Altern. Med. Rev.*, 3(3), 174-186 (1998)
- 20) 小笠原勝, 松永孝之, 鈴木英世, 各種抗酸化物質の癌転移抑制効果の比較検討, 富山県薬事研究所年報, 32, 11-17 (2005)
- 21) Garbisa, S., Sartor, L., Biggin, S., Salvato, B., Benelli, R., Albini, A., Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*, 91(4), 822-832 (2001)
- 22) Huh, S.W., Bae, S.M., Kim, Y.W., Lee, J.M., Namkoong, S.E., Lee, I.P., Kim, S.H., Kim, C.K., Ahn, W.S., Anticancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.*, 94(3), 760-768 (2004)