

# 研 究 業 績

# IV 研究報告

# 膵臓β細胞のリボース誘発細胞死に対する保護効果を有する天然物の探索

松永孝之，小笠原勝，高津聖志

## Screening for natural compounds with protective potency to cell death induced by ribose in pancreatic β cells

Takayuki MATSUNAGA, Masaru OGASAWARA, Kiyoshi TAKATSU

### 要 約

膵臓β細胞由来の培養細胞を用いて、リボース存在下における細胞死に対する保護効果を有する天然物をスクリーニングした。その結果、リボースによる細胞死に対して、フォルスコリンが保護効果を示すことを見出した。フォルスコリンは、細胞内cAMPを産生するアデニレートシクラーゼの活性化物質として知られており、実際に、cAMP分解酵素の阻害剤であるイソブチルメチルキサンチンや細胞膜透過性cAMP誘導体であるクロロフェニルチオcAMPが、同様の保護効果を示した。これらの化合物併用時には、リボースにより低下したインスリン分泌能も改善した。

以上の結果から、フォルスコリンは、細胞内cAMPを上昇させることにより、糖によりもたらされる細胞死を阻止することが示唆された。

### Summary

Natural compounds with the protective potency to cell death induced by ribose were screened using the cell culture derived from the pancreatic β cells. We found that forskolin protected the culture cells from the cell death induced with ribose. Forskolin is well known as an activator of adenylate cyclase, the producing enzyme of intracellular cAMP. Such a protective effect was also observed in the presence of isobutylxanthine, an inhibitor of cAMP degrading enzyme, and chlorophenylthio-cAMP, an analog of cAMP with membrane permeability. Forskolin and other two compounds recovered the reduced secretion of insulin from the pancreatic β cells induced by ribose.

These results suggest that forskolin has the protective potency to β cell death induced by ribose due to the elevation of intracellular cAMP.

キーワード：糖尿病，膵臓β細胞，リボース，フォルスコリン，cAMP

Key words：Diabetes, Pancreatic β cell, Ribose, Forskolin, cAMP

わが国において糖尿病および糖尿病の可能性のある人は、2003年には1,620万人、2007年には2,210万人と増加傾向にある<sup>1)</sup>。わが国では2型糖尿病の患者が大半であるが、その発症過程は次のように考えられている。当初は、肥満などに伴うインスリン抵抗性の増大に対して膵臓β細胞がインスリン分泌能を増大させることにより血糖値を正常に保つ代償機構が働くが、インスリン抵抗性の継続により、この代償機構の不全が徐々に発現し、血糖値が徐々に上昇してくる。最終的に、膵臓β細胞の機能不全及び細胞消失が進行し、糖尿病を発症するものと推測されている<sup>2)</sup>。

糖尿病による高血糖状態においては、酸化ストレスなどの亢進により、血管内皮細胞や膵臓β細胞などが障害を受け、糖尿病合併症や糖尿病の増悪につながっている<sup>3)</sup>。そのため、抗酸化活性などを有する天然物は、糖尿病の予防・治療薬になることが期待される。本研究では、膵臓β細胞

由来の培養細胞を用いて、高血糖培養条件下における細胞死に対する保護効果を有する天然物をスクリーニングし、医薬シーズとしての有用性の可能性を検討した。

### 実験方法

#### 1. 被検試料

本試験で用いた被検試料は、市販化合物ライブラリー(502種、フナコシ)、供与いただいた天然物エキス(154種、クラシエ製薬株)及び化合物(61種、リードケミカル株)、薬事研究所所有化合物(31種)である。被検試料は、ジメチルスルフォキシドまたはリン酸緩衝生理食塩水に溶解して用いた。

#### 2. 細胞培養

ハムスター膵β細胞株HIT-T15は、10%の非働化牛胎児

血清 (FBS), 0.1mg/mLのカナマイシンを含むHam's F12培地中にて継代, 維持した。

### 3. 細胞増殖能の測定

細胞増殖は, WST-1 Cell Counting Kit (和光) を用いて評価した。10%FBSを含むHam's F12培地でHIT-T15細胞を $2.5 \times 10^4$ 個/mLの細胞密度に調製し, 96ウェルプレートの各ウェル当たり $2.5 \times 10^3$ 個を播種した。細胞がプレートに接着後, 被検試料を含む培地に交換し, 5%炭酸ガス培養器 (37°C) で7日間培養した。培養4日目に, 各被検体を含む新しい培地に交換した。培養終了後, 各ウェルの培地を, 10%WST-1を含む10%FBS-Ham's F12培地に交換し, さらに4時間培養した後, 波長450nmにおける吸光度を測定した。なお, インスリン分泌量を測定する場合は, 細胞増殖能測定前に10mMグルコース含むクレブスーリンガー緩衝液に交換して2時間培養し, 培地中に分泌されたインスリン量を測定した。

### 4. インスリン濃度の測定

HIT-T15細胞による培地中へのインスリン分泌量は, マウスインスリン測定キット (モリナガ) を用いてプロトコールに従って測定した。

## 実験結果

### 1. 膵臓β細胞におけるフルクトース及びリボースの細胞毒性

グルコースに比べて糖毒性の強いフルクトース及びリボースの膵臓β細胞由来HIT-T15細胞に対する細胞毒性を比較検討した。その結果, いずれも用量依存的に細胞毒性を発現したが, リボースの方が低濃度で毒性を示すことが確認された (Table1)。

**Table 1 Cytotoxicity of fructose or ribose to cultured pancreatic β cells**

Fructose(mM)	Cell viability(%)	Ribose(mM)	Cell viability(%)
0	100	0	100
50	68.5	5	62.7
100	45.5	10	45.2
200	19.9	20	13.6
400	-2.1	40	-1.1

Each value shows the mean of 3 wells in 96 well microplate.

そこで, 抗酸化活性及び非酵素的糖化反応阻害活性を有するアミノグアニジンのリボースによる細胞毒性に対する保護効果を検討した。その結果, Table2に示すように, リ

**Table2 Protective effect of aminoguanidine on the cell death induced by ribose**

	Concentration (mM)	Ribose(20mM)	
		-	+
Control		100	13.6
Aminoguanidine	1.0	91.0	24.2
	3.0	104	46.5

Each value shows the mean of 3 wells in 96 well microplate.

ボース単独時には13.6%の生細胞率を示すが, アミノグアニジン併用により1mM適用時は, 24.2%, 3mM適用時は46.5%と細胞毒性を軽減した。また, データには示さないが, フルクトースによる細胞毒性に対してもアミノグアニジンは保護効果を示した。

### 2. 膵臓β細胞におけるリボースによる細胞毒性に対する天然物の保護効果

膵臓β細胞におけるリボースによる細胞毒性に対する748種の天然物エキス及び化合物の保護効果を検索した。このスクリーニングにおいて, 化合物については, 1μMまたは10μM, 天然物エキスについては20μg/mLとして細胞毒性の発現しない濃度で試験した。その結果, リボースによる細胞毒性に対する保護効果を有する天然物としてフォルスコリンが見出された (Table3)。リボース単独時の生細胞率が12.2%の時にフォルスコリンを併用することにより, 1μMでは57.5%, 3μMでは59.9%と低濃度で顕著な保護効果を示した。この時, 膵臓β細胞によるインスリン分泌もリボース処理によりコントロールの18.6%に減少したが, 3μMフォルスコリン併用時には51.1%の分泌能を保持していた。

**Table3 Protective effect of forskolin on the cell death induced by ribose**

	Concentration (μM)	Ribose(20mM)	
		-	+
Control		100	12.2
Forskolin	1	99.1	57.5
	3	101.8	59.9
	10	109.5	49.4

Each value shows the mean of 3 wells in 96 well microplate.

### 3. リボースによる膵臓β細胞における細胞毒性に対するcAMP上昇物質の保護効果

フォルスコリンは, アデニレートシクラーゼ活性化剤として良く知られていることから, リボースによる細胞毒性に対する保護効果にアデニレートシクラーゼによりATPから合成されるcAMPの関与が推察される<sup>4)</sup>。そこで, cAMPの細胞透過性誘導体のクロロフェニルチオcAMP (cpt-cAMP) 及びcAMP分解酵素のホスホジエステラーゼ阻害剤であるテオフィリン誘導体のイソブチルメチルキサンチン (IBMX) の細胞障害に対する保護効果を検討した。その結果, Table4に示すように, 両化合物はリボースによる細胞毒性を軽減することが認められた。この時, イ

**Table4 Protective effect of chlorophenylthio-cAMP and isobuthylmethylxanthine on the cell death induced by ribose**

	Concentration (mM)	Ribose(20mM)	
		-	+
Control	0	100	12.2
cpt-cAMP	0.01	83.5	23.8
	0.1	97.0	56.7
IBMX	1.0	80.5	39.0

Each value shows the mean of 3 wells in 96 well microplate.

ンスリン分泌能も改善しており, 20mM リボースによりインスリン分泌能はコントロールの18.6%に低下したが, 0.1mM cpt-cAMP の併用により42.6%に, また, 1mM IBMX の併用により35.0%にインスリン分泌能は回復した.

## 考 察

糖尿病は, 1 型と 2 型に分類されるが, いずれも最終的にはインスリンの分泌細胞である膵臓β細胞の機能不全あるいは細胞消失により進行すると共に各種合併症を来すことになる. そのため, 糖尿病の発症予防あるいは進展阻止のためにはβ細胞機能の保全が重要である. 糖尿病による高血糖状態の持続に伴い, 糖毒性が各種組織で見られるようになり, 特に, 膵臓β細胞では糖毒性による酸化ストレスを受け易くなる<sup>3)</sup>. これは, β細胞では酸化ストレスに対する防御機構が脆弱であるためとされている<sup>5)</sup>. また, 高血糖状態により非酵素的糖化反応であるグリケーションが生じるため細胞障害が起きやすい事が指摘されている<sup>6)</sup>. そこで, 糖毒性による培養膵臓β細胞における細胞死に対する天然物などの保護効果を検討した.

このスクリーニングでは, 比較的低濃度で細胞毒性を発現するリボースを用い, 被検物自身の細胞毒性を示さない処理濃度で検討した. その結果, フォルスコリンに保護効果が認められた. フォルスコリンは, シソ科のコリウス・フォルスコリの根に含まれるジテルペン化合物であり, cAMPの合成酵素であるアデニレートシクラーゼを活性化することが良く知られている<sup>4)</sup>. このことから, フォルスコリンによるリボース誘発細胞死に対する保護効果は, 細胞内cAMPの上昇によることが推察される. そこで, cAMPの細胞透過性誘導体であるcpt-cAMP及びcAMP分解酵素の阻害剤であるIBMXの効果を検討したが, 同様にリボースによる細胞死の発現を抑制した.cAMPが, 細胞死をもたらすアポトーシスを抑制することは, 肝細胞<sup>7)</sup>や膵臓β細胞<sup>8)</sup>において既に報告されている. この作用機序としては, アポトーシス誘発タンパクの不活化及びアポトーシス抑制タンパクの合成促進などによることが指摘されている<sup>9)</sup>. この様に, cAMP上昇をもたらす化合物はアポトーシスを抑制することが期待されるが, フォルスコリンは, 膵臓β細胞に対して選択的ではなく, 糖尿病の予防・治療薬に適用することは困難であると考えられる.

最近, 糖尿病治療薬として汎用されているインクレチン作動薬は, 血糖値の上昇に依存してインスリン分泌を促進するため低血糖をもたらさない特徴を有している<sup>10)</sup>. 作用機序としては, 細胞内cAMPの上昇によりインスリン分泌を増強すると共に, 膵臓β細胞のアポトーシスによる細胞

数減少を抑制することが報告されている<sup>11)</sup>. 今回のスクリーニングで見出されたフォルスコリンとは異なり, インクレチン作動薬は, 膵臓β細胞膜上の受容体を介して作用することから選択性もあるものとされる. このように, cAMP上昇物質は, インスリン分泌の促進及び細胞死に対する保護作用の観点からも, 膵臓β細胞に対する選択性を備えていれば, 優れた糖尿病治療薬になり得るものと思われる.

## 謝 辞

本研究で用いた被検物を御提供頂きましたクラシエ製薬株式会社とリードケミカル株式会社に感謝致します.

本研究は, 文部科学省「イノベーションシステム整備事業」地域イノベーションクラスタープログラム富山・石川地域「ほくろく健康創造クラスター」事業の分担研究課題(天然薬物の免疫制御を活用した医薬品シーズの開発, 研究代表者: 高津聖志) の一環として実施しました.

## 参考文献

- 1) 平成19年度国民健康・栄養調査
- 2) Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S. and Sharma, S.: Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes, *Diabetes*, **50**, S154-159 (2001)
- 3) 鈴木春彦, 井原裕, 清野裕: 膵β細胞疲弊の分子機構; 膵β細胞糖毒性, *Diabetes Frontier*, **15**, 146-150 (2004)
- 4) Souza, N.J., Dohadwalla, A.N., Reden J.: Forskolol, a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory and adenylate cyclase activating properties, *Med. Res. Rev.*, **3**, 201-219 (1983)
- 5) Tiedge, M., Lotz, S., Drinkgern, J. and Lenzen, S.: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells, *Diabetes*, **46**, 1733 (1997)
- 6) 吉川敏一, 長谷川剛二: 糖尿病と酸化ストレス, *Diabetes J.*, **30**, 79-85 (2002)
- 7) Li, J., Yang, S. and Billiar, T.R.: Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release by primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation, *J. Biol. Chem.*, **275**, 13026-13034 (2000)
- 8) Jhala, U.S., Canettieri, G., Sreaton, R.A., Kulkarni,

- R.N., Krajewski, S., Reed, J., Walker, J., Lin, X., White, M. and Montminy, M. : cAMP promotes pancreatic  $\beta$ -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2, *Genes and development*, **17**, 1575-1580 (2003)
- 9) Kwon, G., Pappan, K.L., Marshall, C.A., Schaffer, J.E. and McDaniel, M.L. : cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in  $\beta$ -cells, *J.Biol.Chem.*, **279**, 8938 – 8945 (2004)
- 10) 山田祐一郎：インクレチン作用,治療,**92**, 591-596 (2010)
- 11) Hui, H., Nourparvar, A., Zhao, X. and Perfetti, R. : Glucagon-like peptide-1 inhibit apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5' -adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway, *Endocrinol.*, **144**, 1444-1455 (2003)

## がん細胞による免疫抑制を克服する天然薬物の探索 (2)

小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲<sup>1</sup>, 松永孝之

<sup>1</sup>富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

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

Masaru OGASAWARA, Shino YAMASAKI, Tomomi MIYAMOTO, Yoshinori NAGAI, Takayuki MATSUNAGA

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

#### 要 約

がん局所では、TGF- $\beta$ やPGE2などの免疫抑制因子により抗腫瘍免疫応答が阻害されている。このことから、より有効ながん免疫療法を確立するためには、これらの免疫抑制機構を解明し克服することが重要であると考えられている。本研究では、ポリ (I:C) により亢進したマウス脾臓細胞の細胞傷害活性を指標として、TGF- $\beta$ 及びPGE2による抑制を克服するための阻害物質の探索を行った。約800種の天然物について検討した結果、植物成分のベツリンに有効性を認めた。ベツリンの効果は、免疫賦活物質としてポリ (I:C) 以外のToll様受容体リガンドを用いた場合にも同様に認められた。また、ベツリンはTGF- $\beta$ あるいはPGE2によるパーフォリンmRNAの発現抑制に対しても回復作用を示した。一方、ベツリン単独では全く細胞傷害活性の亢進は認められなかった。

これらのことから、ベツリンは、TGF- $\beta$ 及びPGE2により低下した抗腫瘍免疫応答を回復させる上で有用な化合物であると考えられた。

#### Summary

Immunosuppressive factors such as TGF- $\beta$  or PGE2 are shown to reduce the activity of antitumor immunity at tumor site. These observations suggest that blockade of the effects of immunosuppressive factors is one of promising ways to restore the decreased responses of antitumor immunity. In the present study, screening of natural products for recovering the TGF- $\beta$  or PGE2-induced suppression of the cytolytic activity of mouse splenocyte in the presence of poly (I:C) was performed. Among around 800 compounds tested, betulin, a plant constituent, restored the reduced cytolysis of splenocytes caused by TGF- $\beta$ . The restorative effect of betulin was also observed on the PGE2-induced suppression. When other Toll-like receptor ligands except poly (I:C) as an immunostimulator were used, the effect of betulin was reproduced. Betulin alone did not enhance the cytolytic activity of splenocyte.

Betulin was suggested to be a promising agent for recovering the reduced activity of antitumor immunity by TGF- $\beta$  or PGE2

キーワード : ベツリン ; TGF- $\beta$  ; PGE2 ; 免疫抑制 ; ポリ (I:C)

Key words : Betulin ; TGF- $\beta$  ; PGE2 ; Immunosuppression ; Poly (I:C)

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

がん局所で認められる免疫抑制には、主にtransforming growth factor (TGF)- $\beta$  やprostaglandin E2 (PGE2), IL-10 の関与が明らかにされているが、とりわけTGF- $\beta$  に着目した研究が数多く報告されている。前報において<sup>4)</sup>、ポリ (I:C) により亢進した脾臓細胞の細胞傷害活性を指標として、TGF- $\beta$ , PGE2, 及びIL-10の抑制作用を比較検討し、TGF- $\beta$  が最も強い抑制作用を示すことを明らかにした。また、PGE2にも比較的強い抑制活性を認めた。このことは、TGF- $\beta$  及びPGE2に着目した阻害剤開発が、がん局所で認められる免疫抑制の克服により重要であることを示唆する。

実際、これら免疫抑制因子を標的とした薬剤の開発が精力的に進められている。TGF- $\beta$  については、抗TGF- $\beta$  中和抗体<sup>5)</sup>、TGF- $\beta$  のアンチセンスオリゴヌクレオチドあるいはシグナル伝達系に対する阻害剤 (多くはTGF- $\beta$  タイプI受容体のセリン・スレオニンキナーゼに対する阻害剤) の開発が進められている<sup>6)</sup>。これらのうち、中和抗体とアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発が最も進行しており第3相臨床試験中と報告されている<sup>6)</sup>。一方、PGE2については、シクロオキシゲナーゼ (COX)-2の阻害に基づくその産生抑制について多くの報告がなされており、多数のCOX-2阻害物質について特許の出願もなされている<sup>7)</sup>。しかし、これら両抑制因子の作用を同時に阻害できる化合物についての報告はなされていない。

本研究では、TGF- $\beta$  及びPGE2の阻害作用をともに解除できる天然物の探索を行った。

## 実験方法

### 1. 実験試薬

ポリイノシン酸-ポリシチジン酸 (ポリ (I:C))、各種スクリーニング化合物及びロキソリビンは、Sigma、フナコシ及びHycult biotechnologyよりそれぞれ購入した。その他のTLRアゴニストはInvivoGenより購入した。

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

### 2. 細胞及び細胞培養

YAC-1細胞は、東北大学加齢医学研究所 医用細胞資

源センターより入手した。10%の非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、0.1 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. 細胞傷害活性の評価

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

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = (\text{測定値} - \text{自然放出量}) / (\text{最大蛍光量} - \text{自然放出量}) \times 100$$

### 4. パーフォリン発現量の評価

薬剤で処置した脾臓細胞からRNAを抽出し、Oligo dTプライマーを用いてcDNAを調製した。この一部を用いて、パーフォリンmRNAの発現量をリアルタイムPCRにより定量した。リアルタイムPCRに用いたプライマーはTakaraより購入した。

## 結果

### TGF- $\beta$ およびPGE2の細胞傷害抑制活性に対するベツリンの解除作用

昨年度に構築した細胞傷害活性の評価系を用いて、TGF- $\beta$  およびPGE2の抑制作用を解除し得る化合物のスクリーニングを行った。評価には、市販の化合物ライブラリーなど748化合物を供した (Fig.1)。その結果、ベツリンにのみTGF- $\beta$  の抑制作用に対する解除効果を認めた (Fig. 2A)。免疫賦活剤であるPoly (I:C) (10 $\mu$ g/ml) により亢進した細胞傷害活性は、TGF- $\beta$  (0.5ng/ml) により強く抑制されたが、予めベツリン (2.5-10 $\mu$ M) を添加しておくことで抑制作用は濃度に依存して解除され、10 $\mu$ Mではほぼ完全に解除された。さらに、ベツリンはPGE2 (10 ng/ml) による細胞傷害活性の抑制に対しても同様の解除効果を示した (Fig. 2B)。

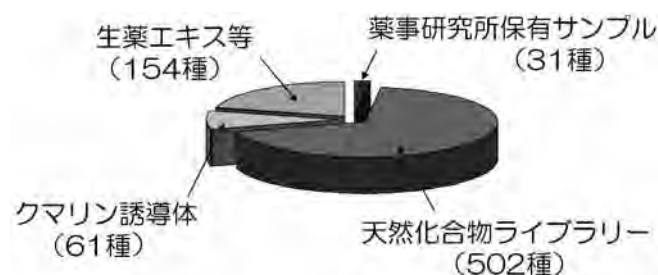
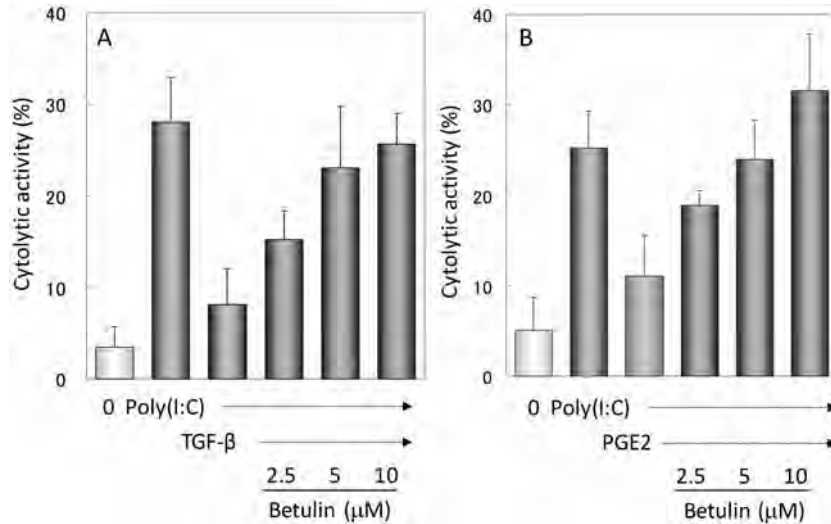


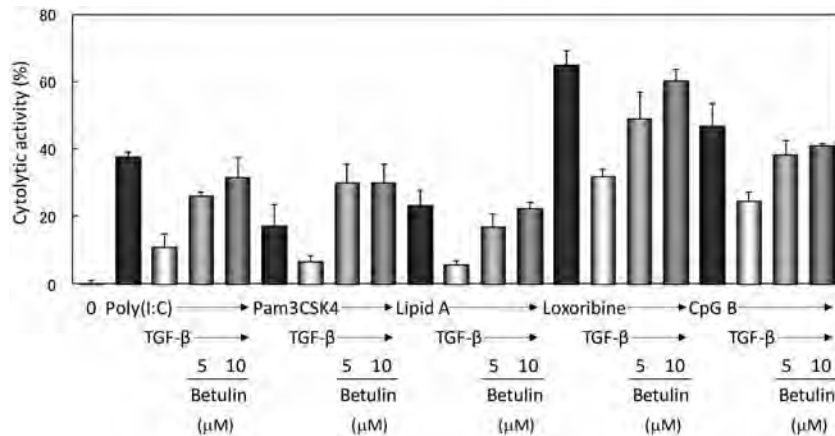
Fig. 1 検討したサンプルの分類と数量。





**Fig. 2. Restorative effects of betulin on TGF- $\beta$ - or PGE2-induced suppression of splenic cytotoxicity.**

Splenic cells were treated with betulin in the presence of TGF- $\beta$  (A) or PGE2 (B) and poly(I:C) for 20 h, then examined their cytotoxic activity against mouse YAC-1 cells.



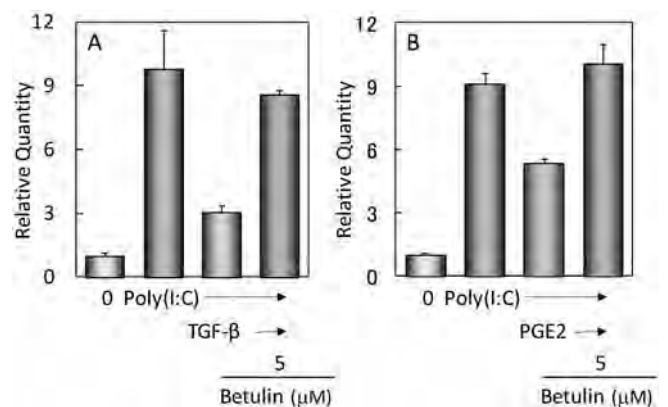
**Fig. 3. Differential effects of betulin on TGF- $\beta$ -induced suppression of splenic cytotoxicity in the presence of various TLR agonists.**

Splenic cells were treated with betulin in the presence of TGF- $\beta$  and various TLR agonists for 20 h, then examined their cytotoxic activity against mouse YAC-1 cells.

また、Poly (I : C) 以外の免疫賦活剤として、Pam3CSK4 (1  $\mu$ g/ml) , Lipid A (0.1  $\mu$ g/ml) , Loxoribine (0.1mM) , あるいは CpG B (0.1  $\mu$ M) を用いた場合においても、ベツリンは TGF-  $\beta$  (0.5ng/ml) により抑制された細胞傷害活性をほぼ完全に解除した (Fig.3) .

#### TGF- $\beta$ およびPGE2によるパーフォリンmRNA発現抑制に対するベツリンの解除作用

細胞傷害活性に重要なパーフォリンの発現に与えるベツリンの影響について検討した. 細胞傷害活性を亢進させた濃度の Poly (I : C) (10  $\mu$ g/ml) は脾臓細胞におけるパーフォリン mRNA の発現を増強させたが、TGF-  $\beta$  (0.5ng/ml) により顕著に抑制された. この抑制は、予めベツリン (5  $\mu$ M) を添加しておくことで解除された (Fig.4A) . 同様の結果は P G E 2 による抑制に対しても認められた (Fig.4B) .



**Fig. 4 Restorative effects of betulin on TGF- $\beta$ - or PGE2-induced suppression of perforin mRNA expression.**

Splenic cells were treated with betulin in the presence of TGF- $\beta$  (A) or PGE2 (B) and poly(I:C) for 20 h, then examined the expression of perforin mRNA with real-time PCR.

本研究では、脾臓細胞のNK活性を指標に、TGF- $\beta$ 及びPGE2による抑制を克服するための阻害物質の探索を748種の天然物について行った。その結果、植物成分のベツリンに有効性を認めた。さらに、ベツリンの効果は、脾臓細胞をポリ (I:C) で刺激した際に誘導されるパーフォリン (細胞傷害活性に関与) mRNA の発現を指標にした場合にも認められた。ベツリンはルパン骨格を基本骨格とするトリテルペン化合物の一種であり、主に白樺の樹皮に含まれる<sup>9)</sup>。薬理作用としては、細胞増殖阻害や抗炎症作用、抗ウイルス作用が報告されているが<sup>9)</sup>、TGF- $\beta$ あるいはPGE2によるNK活性抑制に対する有効性については明らかにされていない。

本研究では、ベツリンの作用特性を明らかにする目的で、ベツリンの作用が免疫賦活剤として用いたポリ (I:C) に特異的であるかどうかを検討した。その結果、ポリ (I:C) 以外の各種のTLRアゴニストを用いても同様にベツリンの作用は認められた。このことから、ベツリンの作用はポリ (I:C) に特異的な現象ではないことが示唆された。その一方で、ベツリンは単独では全くNK活性を亢進させなかったことを考えると、ベツリンの作用は、ポリ (I:C) に依存的であることが示唆される。

ベツリンの作用機序の解析を考えた場合、単一の細胞集団を用いて行うことが必要である。本研究で用いた評価系では脾臓細胞を使用しているため、数種類の免疫細胞が混在した状態になっており、現時点ではベツリンがどの細胞に主に働くことで作用が発揮されているのかは明らかではない。今後はまず、ベツリンの主な標的細胞を明らかにし、次いで当該細胞を用いてベツリンの作用機序を詳細に解析する予定である。

ベツリンの安全性に関する検討についてはいくつかの報告がなされている。すなわち、ラットへの腹腔内投与あるいは犬への皮下投与では、最大300mg/kgの用量での28日間の繰り返し投与においても毒性は認められていない<sup>10)</sup>。また、培養細胞を用いた研究においては、ベツリンは癌化した細胞に比較して正常の細胞には細胞毒性が低いこと<sup>11)</sup>、さらに、カドミウム、あるいはエタノールによる肝細胞毒性に対して保護効果を有することも示されている<sup>12, 13)</sup>。これらのことは、今後、ベツリンを医薬や食品に応用していく上で有用な情報と言える。

本研究では、脾臓細胞の細胞傷害活性を指標として、TGF- $\beta$ 及びPGE2による阻害をとともに解除できる天然物として白樺樹皮成分のベツリンを見出した。今後、作用機序の解明を進めるとともに動物実験において有効性を検証する予定である。

本研究は、文部科学省 イノベーションシステム整備事業 地域イノベーションクラスタープログラム 富山・石川地域 ほうりく健康創造クラスター (天然薬物の免疫制御を活用した医薬品シーズの探索; 代表者: 高津聖志 所長, 富山県薬事研究所) の一環として実施された。

## 文 献

- 1) Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.*, **10** (9), 909-915 (2004)
- 2) Teicher B.A.: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.*, **13** (21), 6247-6251 (2007)
- 3) 河上裕: ヒト腫瘍免疫学の進歩と癌免疫療法開発, *細胞工学*, **29** (3), 267-273 (2010)
- 4) 小笠原勝, 生谷尚士, 刈米アイ, 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, *富山県薬事研究所年報*, **38**, 21-27 (2011)
- 5) Terabe M., Ambrosino E., Takaku S., O'Konek J.J., Venzon D., Lonning S., McPherson J.M., Berzofsky J.A.: Synergistic enhancement of CD8+ T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.*, **15** (21), 6560-6569 (2009)
- 6) Nagaraj N.S., Datta P.K.: Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs.*, **19** (1), 77-91 (2010)
- 7) Ramalho T.C., Rocha M.V., da Cunha E.F., Freitas M.P.: The search for new COX-2 inhibitors: a review of 2002 - 2008 patents. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **19** (9), 1193-1228 (2009)
- 8) Roden M.M., Lee K.H., Panelli M.C., Marincola F.M.: A novel cytolysis assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *J. Immunol. Methods.*, **226** (1-2), 29-41 (1999)
- 9) Pavel A. K.: Birch bark research and development. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 919-942 (2006)
- 10) Jager S, Laszczyk MN, Scheffler A.: A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*). *Molecules*, **13** (12), 3224-35 (2008)

- 11) Rzeski W, Stepulak A, Szymanski M, Juszcak M, Grabarska A, Sifringer M, Kaczor J, Kandefer-Szerszen M. : Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **105** (6) , 425-432 (2009)
- 12) Miura N, Matsumoto Y, Miyairi S, Nishiyama S, Naganuma A. : Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells. *Mol Pharmacol.*, **56** (6) , 1324-1328 (1999)
- 13) Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszen M. : Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacol. Rep.*, **57** (5) , 588-595 (2005)

# 甘草の自然免疫抑制機構の解析 —グリチルリチンとイソリクイリチゲニンがLPSセンサーである TLR4/MD-2複合体のシグナルを異なった方法で抑制する—

本田裕恵, 長井良憲<sup>1</sup>, 高津聖志

<sup>1</sup> 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

## Analyses of the mechanism of suppressive effect of *Glycyrrhiza uralensis* — Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor Toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner —

Hiroe HONDA, Yoshinori NAGAI<sup>1</sup>, Kiyoshi TAKATSU

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

### 要 約

我々は以前、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* (*G. uralensis*)) の代表的な成分であるグリチルリチン (GL) およびイソリクイリチゲニン (ILG) について、Lipid A の存在下において、転写因子であるNF- $\kappa$ B の活性化の抑制を通じマウスマクロファージ細胞株RAW264.7からの炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ 及びIL-6の産生を抑制することを報告している。本研究では、GLとILGのLPS-TLR4/MD-2複合体形成に与える影響について検討を行った。興味深いことに、GLはLPS-TLR4/MD-2複合体の形成を阻害し、TLR4の二量体化を阻害した。ILGはLPSのTLR4/MD-2への結合には影響を与えないが、LPSによるTLR4の二量体化を阻害した。これらの結果から、GLとILGがTLR4/MD-2複合体をレセプターレベルで制御することでLPSによるシグナル経路の活性化やサイトカインの産生を抑制し、GLとILGはTLR4/MD-2シグナルの異なるステップで効果を示していることが明らかとなった。

### Summary

We previously reported that glycyrrhizin (GL) and isoliquiritigenin (ILG), the major components of *Glycyrrhiza uralensis*, suppressed lipid A-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 production in RAW264.7 through inhibition of NF- $\kappa$ B activation. In this study, we explored the effect of these components for the formation of the LPS-TLR4/MD-2 complexes. Interestingly, GL attenuated the formation of the LPS-TLR4/MD-2 complexes, resulting in inhibition of homodimerization of TLR4. Although ILG did not affect LPS binding to TLR4/MD-2, it could inhibit LPS-induced TLR4 homodimerization. These results imply that GL and ILG modulate the TLR4/MD-2 complex at the receptor level, leading to suppress LPS-induced activation of signaling cascades and cytokine production, but their effects are exerted at different steps of TLR4/MD-2 signaling.

キーワード：自然免疫, TLR, 天然物, カンゾウ, グリチルリチン, イソリクイリチゲニン

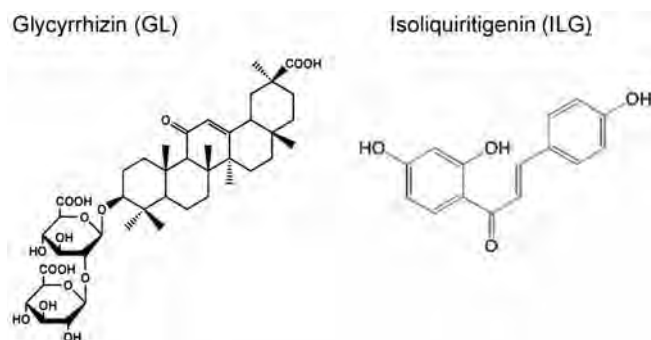
Key words: Innate immunity; TLR; Natural product; *Glycyrrhiza uralensis*;

Glycyrrhizin; Isoliquiritigenin

自然免疫系は病原体から第一線で自らの身体を守るため、病原体由来の物質をすばやく認識し応答する仕組みである<sup>1)</sup>。これらの自然免疫応答を担うものの一つに pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識する Toll-like receptor (TLR) がある。TLR4は最初に同定されたTLRであり、細菌由来のリポポリサッカライドの応答に必要なものである<sup>2, 3)</sup>。LPSを認識するため、TLR4は分泌タンパクでTLR4の細胞外ドメインと結合するMD-2と複合体を形成する<sup>4, 5)</sup>。MD-2はLPSとその疎水性のくぼみにおいて直接反応し、このLPSの認識はTLR4/MD-2複合体の二量体化を誘導し、LPS-TLR4/MD-2複合体を形成する<sup>6)</sup>。このLPS-TLR4/MD-2複合体の形成は、細胞内アダプタータンパクであるMyD88の誘引を引き起こし、下流のシグナルを誘導する<sup>7)</sup>。MyD88により Mitogen activating protein kinases (MAPKs) や転写因子であるNF- $\kappa$ Bの活性化が起こり、IL-6やTNF- $\alpha$ のような炎症性サイトカインの遺伝子を誘導する<sup>7)</sup>。興味深いことに、TLRは病原体産物を認識するだけでなく、TLR4については非細菌性のリガンドが存在することが報告されている<sup>8)</sup>。例えば、パクリタキセルのような化合物や<sup>9)</sup>、脂肪酸<sup>10)</sup>、heat shock proteins (HSPs)<sup>11)</sup> やヒアルロン酸<sup>12)</sup> といった自己由来成分などである。これらの分子はTLR4/MD-2に結合し、炎症性の経路を活性化し、サイトカインの分泌を促す。このように、TLR4/MD-2は急性感染性炎症や慢性炎症において重要な役割を果たしている。

甘草の根や根茎は、4,000年以上も前から世界中で使用されている生薬である<sup>13)</sup>。甘草はよく知られた天然の甘味料であり、糖尿病<sup>14)</sup>、肺病<sup>15)</sup>、咳<sup>16)</sup>などの疾病や症状を治療するために伝統的に使用されてきた。これまでの研究から、抗炎症効果、抗ウイルス効果、抗酸化効果、抗ガン効果、免疫抑制効果、肝臓保護効果、心臓保護効果などの薬学的な効果が報告されている<sup>17)</sup>。これまでの報告で、和漢生薬やその成分がTLRシグナルを制御していることが報告されている。*Panax ginseng*はTLRを介して炎症性サイトカインの産生を誘導する<sup>18)</sup>。*Notoginseng*は、LPS、

**Figure. 1** The chemical structure of glycyrrhizin (GL) and isoliquiritigenin (ILG).



CpGB若しくはpoly (I:C)によってDC2.4細胞からのTNF- $\alpha$ の産生を抑制する<sup>19)</sup>。生薬由来の成分であるsparstolonin Bは、TLR2やTLR4/MD-2によるシグナルを選択的に抑制する<sup>20)</sup>。また、火で煎った甘草のエタノールによる抽出物は、一酸化窒素、プロスタグランジンE2および炎症性サイトカインの産生を減少させ、強い抗炎症効果を示した<sup>21)</sup>。

甘草の中でも、*G.uralensis*は日本で伝統的によく使用されているものの一つである。トリテルペンサポニン、フラボノイド、イソフラボノイド及びカルコンなどの成分が甘草から単離されている。トリテルペンサポニンであるGL (Fig.1)は*G. uralensis*の中で主要な生物学的活性を持つものとして知られている。GLには抗炎症効果<sup>22)</sup>、抗アレルギー効果<sup>23)</sup> および抗ウイルス効果<sup>24)</sup>があり、慢性肝炎の治療に使用されている<sup>25)</sup>。ILGは*G. uralensis*に含まれる別の成分であり、カルコン骨格を持ったフラボノイドで (Fig.1)、抗血小板凝集効果<sup>26)</sup>、抗アレルギー効果<sup>27)</sup>、抗ガン効果<sup>28)</sup>などの生物学的な効果を示す。GLとILGはTLR4/MD-2によるNF- $\kappa$ BとMAPKsの活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生が抑制されることが報告されている<sup>29, 30)</sup>。また、GL処置によってLPS刺激時のTLR4の内在化が抑制されることや<sup>31)</sup>、ILGがLPSによるTLR4の二量体化を阻害することも報告されている<sup>32)</sup>。GLとILGはTLR4/MD-2によるシグナルをシグナル下流だけでなく、レセプターレベルでも阻害していると考えられるが、LPS-TLR4/MD-2複合体形成に与える影響についてはほとんど分かっていない。

以前に我々は、*G.uralensis*の熱水抽出エキスがTLR4/MD-2によるTNF- $\alpha$ の産生を抑制していることを示した<sup>33)</sup>。また、*G. uralensis*由来の化合物であるGLとILGがlipid Aによるサイトカインの産生と転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制した<sup>34, 35)</sup>。本研究において、代表的なサポニンであるGLと代表的なカルコンであるILGによって、LPSによるTLR4の二量体化が抑制されることが明らかとなった。また、GLはLPS-TLR4/MD-2複合体の形成を阻害したが、ILGは阻害しなかった。このように、甘草にはLPSセンサーであるTLR4/MD-2の複合体の重要な最初のステップを異なった方法で阻害する特徴的な成分が含まれていることが明らかとなった。

## 実験方法

### 1 実験試薬

本実験で用いた生薬の熱水抽出エキスは、カンゾウ (ツムラ株式会社、*G. uralensis*由来)である。また、グリチルリチン (株式会社ネオミノファージェン製薬より供与)、イ

ソリクイリチゲニン (Sigma) , Lipid A (Sigma) , LPS (Sigma) を実験に供した。

## 2 細胞及び細胞培養

IL-3 依存性マウス - プロ B 細胞株である Ba/F3 細胞を 100 $\mu$ M 2-メルカプトエタノールと 1ng/ml リコンビナントマウス IL-3 (R & D Systems, Minneapolis, MN) を添加した RPMI1640 培地で培養した。マウス TLR4, MD-2, CD14 および NF- $\kappa$ B-GFP を発現した Ba/F3 細胞ならびに TLR4F (TLR4 の C 末端が flag エピトープで標識) , TLR4G (TLR4 の C 末端が GFP エピトープで標識) , MD-2 および CD-14 を発現した Ba/F3 細胞<sup>36)</sup> は、エレクトロポレーション法により確立されたものであり、三宅健介先生 (東京大学医科学研究所) より供与された。

## 3 フローサイトメトリー解析

PE 結合抗マウス TLR4/MD-2 抗体 (clone MTS510) , PE 結合ラット IgG2a アイソタイプコントロール抗体は eBioscience (San Diego, CA) から購入した。

Ba/F3 形質転換細胞株 (1x10<sup>5</sup> cells/well) はラベルされた抗体が Fc $\gamma$ R に結合するのを阻害するため、精製された抗マウス Fc $\gamma$ R (clone 24G2) と培養した。15 分後に細胞をそれぞれの抗体に適した濃度で染色した。フローサイトメトリー解析は、FACSCanto II<sup>TM</sup> (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA) を用いて行い、データは Flowjo software (Tree Star, San Carlos, CA) を用いて行った。

## 4 免疫沈降と免疫染色

マウスの TLR4, MD-2, CD14 および NF- $\kappa$ B-GFP を発現する Ba/F3 細胞を GL または ILG と 30 分間前培養した後、ビオチン化 LPS (Invivogen, San Diego, CA) を添加した。30 分後に細胞を PBS で洗浄後、細胞を溶解バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Nacalai tesque)) にて溶解した。氷上に 30 分置き、核を遠心にて取り除いた。ラット抗マウス TLR4/MD-2 抗体 (clone Sa15-21) は三宅健介先生 (東京大学医科学研究所) より供与され、これと結合させたビーズを細胞溶解液に加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間回転させた。ビーズを溶解バッファーで洗い、ビーズに結合したタンパクを SDS-PAGE で電気泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 若しくはヤギ抗マウス TLR4 ポリクローナル抗体 (Santa cruz) と反応させ、その後ストレプトアビジン結合抗ヤギ抗体 (American Qualex) で検出した。

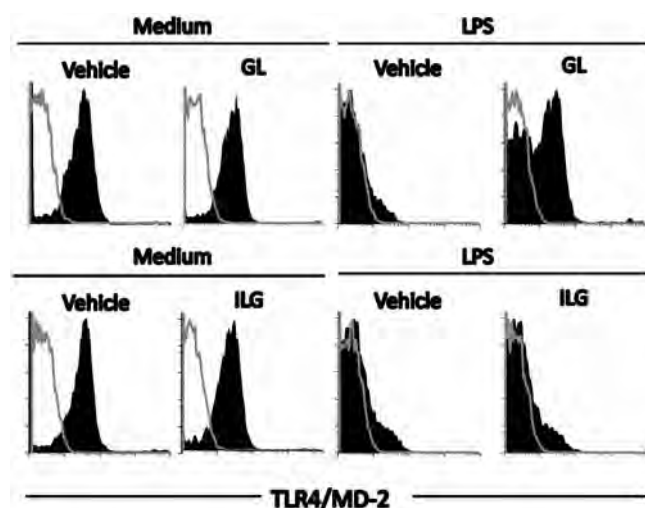
TLR4 の二量体形成を確認するため、TLR4F, TLR4G,

MD-2 および CD14 を発現した Ba/F3 細胞を GL または ILG と共に 30 分間培養し、その後 LPS を培地に添加した。30 分後、細胞を PBS で洗い、溶解バッファーで溶解した。氷上にて 30 分間置いた後、核を遠心で取り除いた。ウサギ抗 GFP 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) と結合させたビーズを細胞溶解液に加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間回転させた。ビーズを溶解バッファーで洗浄し、ビーズに結合したタンパクを SDS-PAGE にて電気泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。マウス抗 FLAG 抗体 (Sigma) またはウサギ抗 GFP 抗体 (MBL, Nagoya, Japan) と反応させ、その後 HRP 結合抗ウサギ抗体 (Cell signaling) で検出を行い、ECL Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) で可視化した。

## 実験結果

### 1 GL は LPS による TLR4/MD-2 の発現低下を抑制するが、ILG は抑制しない

LPS が MD-2 に結合すると、TLR4/MD-2 複合体に急激な構造変化が起こり、特徴的な TLR4/MD-2 特異的抗体である MTS510 による染色が消失する<sup>37)</sup>。この現象が認められる原因として 3 つの可能性がある。第一に、TLR4/MD-2 が LPS による刺激によって内在化されてしまうという可能性である。第二に、LPS の刺激によって二量体化のような TLR4/MD-2 の構造的な変化が起こっており、MTS510 が結合できなくなっている可能性である。最後に、LPS の



**Figure 2. GL but not ILG suppresses LPS-induced down-regulation of the TLR4/MD-2 complex.**

Ba/F3 cells expressing murine TLR4/MD-2 and CD14 were treated with vehicle alone, GL (1 mM), or ILG (30  $\mu$ M) for 30 min. Then, the cells were stimulated with medium alone or LPS (25 ng/ml) for 15 min. The cultured cells were harvested and stained with anti-mouse TLR4/MD-2 mAb (clone MTS510) or isotype control antibody (gray lines). FACS analyses were conducted as described in the Materials and Methods. Data are representative of three independent experiments.

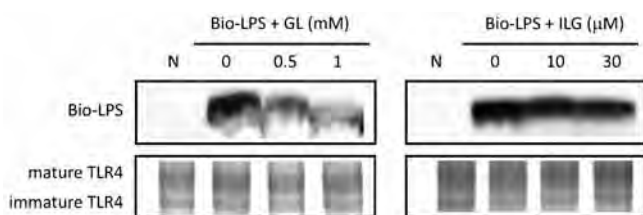


MD-2 への結合によって、物理的に TLR4/MD-2 への MTS510 の結合が不可能となったということも考えられる。

我々はこの現象を利用して、GL と ILG が TLR4/MD-2 シグナルをレセプターレベルで抑制しているか否かを検討した。GL や ILG 単独では TLR4/MD-2 や CD14 を発現する Ba/F3 細胞の TLR4/MD-2 の染色に影響を与えることはなかった (Fig.2)。LPS による刺激は、15 分以内に TLR4/MD-2 の MTS510 による染色を減少させた。興味深いことに GL を添加しておく、LPS による TLR4/MD-2 の染色の減少が一部回復したが、ILG ではそのような現象が起こらなかった (Fig.2)。これらの結果は、GL が TLR4/MD-2 のシグナルをレセプターレベルで抑制していることを示している。

## 2 GLはLPS-TLR4/MD-2複合体の形成を阻害するが、ILGは阻害しない

我々は、次に GL と ILG が細胞表面上の LPS-TLR4/MD-2 複合体の形成に影響を与えるか否かを検討した。我々はビオチン化LPSを反応させたTLR4/MD-2を別の抗TLR4/MD-2抗体である Sa15-21<sup>6)</sup> で免疫沈降し、共沈したビオチン化LPSをstreptavidinアルカリフォスファターゼを用いて検出する実験系を確立した。そして、抗体Sa15-21によってTLR4/MD-2で共沈されるビオチン化LPSを検出した (Fig.3)。GL処置によって、TLR4の沈降量には影響はなかったが、TLR4/MD-2に結合しているビオチン化LPSの量はGL処置によって用量依存的に減少した (Fig.3)。対照的に、ILGはTLR4/MD-2へのビオチン化LPSの結合に影響を与えなかった (Fig.3)。以上より、GLはLPS-TLR4/MD-2複合体の形成を阻害するが、ILGは阻害



**Figure 3. GL but not ILG suppresses the binding of LPS to the TLR4/MD-2 complex.**

Ba/F3 cells expressing murine TLR4/MD-2 and CD14 were treated with vehicle alone, GL, or ILG for 30 min. Then, the cells were stimulated with medium alone or biotinylated LPS ( $0.2 \mu\text{g/ml}$ ) for 30 min. The cultured cells were then subjected to immunoprecipitation with an anti-mouse TLR4/MD-2 mAb (clone Sa15-21) as described in the Materials and Methods. Binding of biotinylated LPS to the TLR4/MD-2 complex was detected with streptavidin-alkaline phosphatase. TLR4 protein was detected with anti-TLR4 polyclonal Ab. Data are representative of three independent experiments.

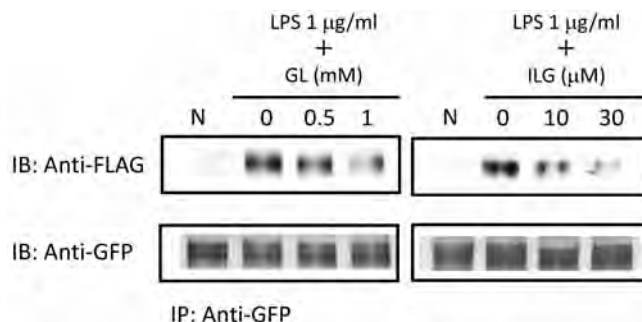
しないことが明らかとなった。

## 3 GLとILGは共にLPSによって誘導されるTLR4/MD-2の二量体化を阻害する

LPSがMD-2に結合すると、TLR4/MD-2複合体の二量体化が起こり、細胞内にシグナルが伝達される<sup>36)</sup>。そこで我々は次にGLとILGがLPSによるTLR4の二量体化に影響を与えるかどうかを検討した (Fig.4)。TLR4同士の相互作用に与える影響を調べるために、TLR4-Flag (TLR4F)、TLR4-GFP (TLR4G)、MD-2およびCD14を発現したBa/F3細胞<sup>36)</sup>を使用した。TLR4の二量体化を検出するため、抗GFP抗体でTLR4Gを免疫沈降し、共沈してきたTLR4Fを抗FLAG抗体で検出した。TLR4FとTLR4Gの相互作用は、LPSによる刺激後に確認された (Fig.4)。このTLR4の物理的な相互作用はGLやILG処置によって用量依存的に阻害された。これらのことから、GLはLPS-TLR4/MD-2複合体の形成を阻害し、一方ILGは阻害しないが、TLR4の二量体形成についてはGLとILG両方がLPSによるTLR4の二量体化を阻害することが明らかとなった。

## 考 察

GLとILGは自然免疫系に影響を及ぼすことが示されてきた。本研究では、我々はこれらの化合物がTLR4/MD-2による自然免疫反応を抑制するメカニズムを明らかにした。我々は以前にGLとILGの両方がLPSによるシグナル経路を阻害することを明らかにした<sup>34,35)</sup>。GLとILGはLPSによるTLR4/MD-2の二量体化を抑制した。Lipid AによるNF- $\kappa$ Bの活性化はGL及びILG処置によって抑制された。興味深いことに、GLはLPS-TLR4/MD-2複合体の形成を阻害し



**Figure 4. GL and ILG block LPS-induced homodimerization of TLR4.**

Ba/F3 cells expressing TLR4-Flag, TLR4-GFP, MD-2 and CD14 were treated with vehicle alone, GL, or ILG for 30 min. The cells were then stimulated with medium alone or LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) for 60 min. The cultured cells were then subjected to immunoprecipitation with anti-GFP, immunoblotting with anti-FLAG or anti-GFP as described in the Materials and Methods. Data are representative of three independent experiments.

たが, ILGはこの複合体の形成に影響を与えなかった (Fig.3). このように, 我々の結果は甘草 (*G.uralensis*) の二つの代表的な成分であるGLとILGが, TLR4/MD-2シグナルの異なった初期段階に作用していることを示している.

以前, GLはLPSによるTLR4の内在化を阻害しているとの報告があった<sup>31)</sup>. 別の研究では, ILGがLPSによるTLR4の二量体化を阻害しているとの報告もある<sup>32)</sup>. それゆえに, GLとILGはLPSによる応答をシグナル経路の下流で阻害しているというよりはむしろ, TLR4/MD-2シグナルの最初の段階を阻害している可能性があることが示唆されていた. しかし, これらの研究はLPS-TLR4/MD-2複合体の形成に与える影響については検討を加えていない. 今回の結果は, GLがLPSとTLR4/MD-2との結合を阻害し, ILGは阻害していないということを明らかにした (Fig.3). この事実がGLによるLPS応答の阻害についての説明になるかもしれない. 興味深い事に, ILGはLPSがTLR4/MD-2に結合することは抑制しないが, Lipid AによるIL-6の産生やNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制する<sup>35)</sup>. このように, LPSの結合だけでなく, TLR4の二量体化の阻害がLPSに対する応答を抑制することにおける重要なターゲットであるかもしれない. これらの情報は, 敗血症に対する治療薬の開発において有用である.

ここで重要な問題は, GLとILGがどのようにレセプターレベルでTLR4/MD-2シグナルを阻害しているかということである. これまで示してきたように, LPS-TLR4/MD-2複合体形成の阻害は, GLによる阻害の主要なステップである. 以前の研究では, GLが脂質二重層に入り込み, 細胞膜の安定性を抑制する可能性が指摘されている<sup>32)</sup>. 膜の状態が崩れることによって, TLR4/MD-2とCD14の複合体の形成が阻害され, その結果LPSのシグナルが阻害されることが報告されている<sup>38)</sup>. また, GLによる抗炎症効果はTLR4に特異的ではないことが報告されている. GLはTLR4だけではなく, TLR9による炎症応答もCpG-DNAの細胞への取り込みを減少させることで阻害している<sup>32)</sup>. さらに, CpG-DNAの細胞への取り込みがスカベンジャー受容体依存的事であることも示唆されている<sup>39-42)</sup>. このように, GLはTLRと直接的な相互作用をしてシグナルを阻害しているのかもしれない. GLによって膜の状態が変化していることが, 様々なTLRに対する阻害活性と関連しているのかもしれない. TLRには細胞外ドメインと細胞内ドメインにシステイン残基が存在している<sup>7, 43)</sup>. イソチオシアネートスルフォラファンはTLR4の細胞外ドメインのシステイン残基に付加物を形成することでTLR4のオリゴマー化を抑制しているとの報告もある<sup>44)</sup>. ILGにはシステインのチオール基と反応する $\alpha$ ,  $\beta$ 不飽和のカルボニル基が存在している<sup>16)</sup>. このようにTLR4のシステイン残基がILGの標的で

あるのかもしれない. 詳細なメカニズムを明らかにするには更なる研究が必要である.

我々の実験では他のグループと同様, 抗炎症反応を誘導するために, 非常に高濃度のGLが必要である<sup>31, 45)</sup>. 一方, ILGはGLと比較して比較的低濃度で抗炎症効果を示す. 我々は, GLの親水的な特徴が細胞膜との相互作用が制限されているのかもしれないと予想している<sup>32)</sup>. 一方, ILGはGLと比較すると疎水的である. 現時点では, LPSの応答を抑制する2つの化合物の異なった濃度依存性について明確な理由は不明であるが, GLよりもむしろILGが*G. uralensis*の抗炎症効果と関連が深い成分の1つであるといえる.

GLはステロイド様骨格を持っているので, グルココルチコイドレセプターアゴニストと同様に核内へ取り込まれて働く可能性もある<sup>46)</sup>. しかしながら, 別の研究ではGLはNF- $\kappa$ Bの活性化をグルココルチコイドレセプターとは無関係に抑制することを示している<sup>45)</sup>. 本報告においてはGLによるTLR4シグナルの抑制にグルココルチコイドレセプターが関与しているか否かについて検討は加えていないが, 我々はGLが転写因子の活性化を直接阻害しているというよりはむしろ, 細胞表面上のTLR4/MD-2に何らかの作用をしてLPS応答を抑制している可能性が高いと考える. ILGについてはIKKと直接相互作用し, キナーゼ活性を阻害するとの報告もある<sup>47)</sup>. ILGはTLR4/MD-2による免疫反応を複数のステップで阻害している可能性があり, レセプターレベルとシグナルの下流レベルで効いている可能性が考えられる.

MTS510抗体はTLR4/MD-2複合体を特異的に認識するが, TLR4単独では認識しない<sup>37)</sup>. 興味深いことに, この抗体で染色されるTLR4/MD-2の発現レベルは, LPS刺激後急速に減少する<sup>6)</sup>. この現象が起こる理由として以下の3つの可能性が考えられる. 第一に, TLR4/MD-2はLPS刺激後に細胞内に取り込まれてしまうのかもしれない. 第二に, MTS510はLPSによって誘導される二量体化のようなTLR4/MD-2が構造的に変化すると認識できなくなるのかもしれない. 最後に, MD-2に結合したLPSが物理的にMTS510によるTLR4/MD-2を邪魔しているのかもしれない. 別の抗TLR4/MD-2抗体であるSa15-21はLPS刺激後にもTLR4/MD-2を認識することができることから<sup>6)</sup>, TLR4/MD-2の細胞内への取り込みによるものではないと考えられる. 本研究において, 我々はGLとILG処理の両方がLPSによるTLR4の二量体化を阻害していることを明らかにした (Fig.4). しかし, LPSによるTLR4/MD-2のダウンレギュレーションは, GLによって回復するが, ILGによっては回復されない (Fig.2). 従って, 二量体化のようなTLR4/MD-2の立体的な変化がLPSによるTLR4/MD-2のダウンレギュレーションを説明しているとは考えにく



い。TLR4/MD-2がLPSによってダウンレギュレーションされる理由は、MTS510によるTLR4/MD-2複合体の認識がLPSが結合することによって立体的に阻害されているためと考えられる。このことは、ILG処置によってLPSのTLR4/MD-2への結合が阻害されないという結果と一致する (Fig.3)。ILGの存在下においてLPSを添加した際、MTS510がTLR4/MD-2を認識できていないので、LPSは依然としてMD-2に結合していると考えられる。

結論として、我々は*G.uralensis*の2つの成分がTLR4/MD-2シグナルの初期のステップを抑制することを明らかにした。これらの知見は、抗炎症剤の分子メカニズムの理解や、感染症や敗血症の新薬の開発に役立つと考える。

## 謝 辞

マウスTLR4, MD-2, CD14 およびNF- $\kappa$ B-GFPを発現したBa/F3細胞ならびに、TLR4F, TLR4G, MD-2およびCD-14を発現したBa/F3細胞ならびに抗マウスTLR4/MD-2抗体 (clone Sa15-21) をご恵与くださいました三宅健介先生 (東京大学医科学研究所) に感謝申し上げます。

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

## 文 献

- 1) Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216.
- 2) Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4) -deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749-52.
- 3) Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-8.
- 4) Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**,

- 1777-82.
- 5) Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., Miyake, K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**, 667-72.
- 6) Akashi, S., Saitoh, S., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Adachi, Y., Kosugi, A., Miyake, K. (2003) Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J. Exp. Med.* **198**, 1035-42.
- 7) Akira, S., Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511.
- 8) Kono, H., Rock, K.L. (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279-89.
- 9) Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., Nishijima, M. (2000) Mouse toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* **275**, 2251-4.
- 10) Suganami, T., Ogawa, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 33-9.
- 11) Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Hacker, H., Wagner, H. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 31332-9.
- 12) Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., Simon, J.C. (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **195**, 99-111.
- 13) Shibata, S. (2000) A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi.* **120**, 849-62.
- 14) Rajurkar, N.S., Pardeshi, B.M. (1997) Analysis of some herbal plants from India used in the control of diabetes mellitus by NAA and AAS techniques. *Appl. Radiat. Isot.* **48**, 1059-62.
- 15) Dafni, A., Yaniv, Z., Palevitch, D. (1984) Ethnobotanical survey of medicinal plants in northern Is-

- rael. *J. Ethnopharmacol.* **10**, 295-310.
- 16) Kamei, J., Nakamura, R., Ichiki, H., Kubo, M. (2003) Antitussive principles of *Glycyrrhizae radix*, a main component of the Kampo preparations Bakumondoto (Mai-men-dong-tang) . *Eur. J. Pharmacol.* **469**, 159-63.
  - 17) Asl, M.N., Hosseinzadeh, H. (2008) Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother. Res.* **22**, 709-24.
  - 18) Nakaya, T.A., Kita, M., Kuriyama, H., Iwakura, Y., Imanishi, J. (2004) *Panax ginseng* induces production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor. *J. Interferon Cytokine Res.* **24**, 93-100.
  - 19) Rhule, A., Rase, B., Smith, J.R., Shepherd, D.M. (2008) Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by *Panax notoginseng*. *J. Ethnopharmacol.* **116**, 179-86.
  - 20) Liang, Q., Wu, Q., Jiang, J., Duan, J., Wang, C., Smith, M.D., Lu, H., Wang, Q., Nagarkatti, P., Fan, D. (2011) Characterization of Sparstolonin B, a Chinese Herb-derived Compound, as a Selective Toll-like Receptor Antagonist with Potent Anti-inflammatory Properties. *J. Biol. Chem.* **286**, 26470-9.
  - 21) Kim, J.K., Oh, S.M., Kwon, H.S., Oh, Y.S., Lim, S.S., Shin, H.K. (2006) Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1215-23.
  - 22) Yoshida, T., Abe, K., Ikeda, T., Matsushita, T., Wake, K., Sato, T., Inoue, H. (2007) Inhibitory effect of glycyrrhizin on lipopolysaccharide and d-galactosamine-induced mouse liver injury. *Eur. J. Pharmacol.* **576**, 136-42.
  - 23) Ram, A., Mabalirajan, U., Das, M., Bhattacharya, I., Dinda, A.K., Gangal, S.V., Ghosh, B. (2006) Glycyrrhizin alleviates experimental allergic asthma in mice. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 1468-77.
  - 24) Hoefer, G., Baltina, L., Michaelis, M., Kondratenko, R., Tolstikov, G.A., Doerr, H.W., Cinatl, J., Jr. (2005) Antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus. *J. Med. Chem.* **48**, 1256-9.
  - 25) Arase, Y., Ikeda, K., Murashima, N., Chayama, K., Tsubota, A., Koida, I., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M., Kumada, H. (1997) The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer* **79**, 1494-500.
  - 26) Tawata, M., Aida, K., Noguchi, T., Ozaki, Y., Kume, S., Sasaki, H., Chin, M., Onaya, T. (1992) Anti-platelet action of isoliquiritigenin, an aldose reductase inhibitor in licorice. *Eur. J. Pharmacol.* **212**, 87-92.
  - 27) Kakegawa, H., Matsumoto, H., Satoh, T. (1992) Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* . **40**, 1439-42.
  - 28) Lee, C.K., Son, S.H., Park, K.K., Park, J.H., Lim, S.S., Chung, W.Y. (2008) Isoliquiritigenin inhibits tumor growth and protects the kidney and liver against chemotherapy-induced toxicity in a mouse xenograft model of colon carcinoma. *J. Pharmacol. Sci.* **106**, 444-51.
  - 29) Takahashi, T., Takasuka, N., Iigo, M., Baba, M., Nishino, H., Tsuda, H., Okuyama, T. (2004) Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development. *Cancer Sci.* **95**, 448-53.
  - 30) Kim, J.Y., Park, S.J., Yun, K.J., Cho, Y.W., Park, H.J., Lee, K.T. (2008) Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **584**, 175-84.
  - 31) Schrofelbauer, B., Raffetseder, J., Hauner, M., Wolkerstorfer, A., Ernst, W., Szolar, O.H. (2009) Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. *Biochem. J.* **421**, 473-82.
  - 32) Park, S.J., Youn, H.S. (2010) Suppression of homodimerization of toll-like receptor 4 by isoliquiritigenin. *Phytochemistry* **71**, 1736-40.
  - 33) Hiroe HONDA, Kiyoshi TAKATSU, Search for Natural Products Affecting on the Innate Immunity System—Establishment of a Screening System to Search the Natural Products Regulating Innate Immunity —, 富山県薬事研究所年報, **35**, 35-39 (2008)
  - 34) Hiroe HONDA, Kiyoshi TAKATSU, The extract from *Glycyrrhizae Radix* and its compounds, Glycyrrhizin modulate innate immunity via TLR4, 富山県薬事研究所年報, **36**, 26-31 (2009)
  - 35) Hiroe HONDA, Kiyoshi TAKATSU, Analyses of the mechanism of suppressive effect of *Glycyrrhizae*

- Radix-Isoliquiritigenin modulate innate immunity via TLR4, 富山県薬事研究所年報, **37**, 32-36 (2010)
- 36) Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A., Miyake, K. (2004) Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4) -MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int. Immunol.* **16**, 961-9.
- 37) Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., Miyake, K. (2000) Cutting edge : cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **164**, 3471-5.
- 38) Schmitz, G., Orso, E. (2002) CD14 signalling in lipid rafts : new ligands and co-receptors. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 513-21.
- 39) Steward, A., Christian, R.A., Hamilton, K.O., Nicklin, P.L. (1998) Co-administration of polyanions with a phosphorothioate oligodeoxynucleotide (CGP 69846A) : a role for the scavenger receptor in its in vivo disposition. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 509-16.
- 40) Takagi, T., Hashiguchi, M., Mahato, R.I., Tokuda, H., Takakura, Y., Hashida, M. (1998) Involvement of specific mechanism in plasmid DNA uptake by mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 729-33.
- 41) Jozefowski, S., Sulahian, T.H., Arredouani, M., Kobzik, L. (2006) Role of scavenger receptor MARCO in macrophage responses to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 870-9.
- 42) Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T., Shirahata, T. (2004) Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb. Pathog.* **37**, 11-9.
- 43) Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J., Lee, J.O. (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* **130**, 906-17.
- 44) Youn, H.S., Kim, Y.S., Park, Z.Y., Kim, S.Y., Choi, N.Y., Joung, S.M., Seo, J.A., Lim, K.M., Kwak, M.K., Hwang, D.H., Lee, J.Y. (2009) Sulforaphane suppresses oligomerization of TLR4 in a thiol-dependent manner. *J. Immunol.* **184**, 411-9.
- 45) Takei, H., Baba, Y., Hisatsune, A., Katsuki, H., Miyata, T., Yokomizo, K., Isohama, Y. (2008) Glycyrrhizin inhibits interleukin-8 production and nuclear factor-kappaB activity in lung epithelial cells, but not through glucocorticoid receptors. *J. Pharmacol. Sci.* **106**, 460-8.
- 46) Yoh, T., Nakashima, T., Sumida, Y., Kakisaka, Y., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Sakamoto, Y., Okanou, T., Mitsuyoshi, H. (2002) Effects of glycyrrhizin on glucocorticoid signaling pathway in hepatocytes. *Dig. Dis. Sci.* **47**, 1775-81.
- 47) Kumar, S., Sharma, A., Madan, B., Singhal, V., Ghosh, B. (2007) Isoliquiritigenin inhibits IkappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1602-12.

# TGF- $\beta$ による免疫抑制に対する ベツリン関連化合物の解除作用の評価

山崎（屋敷）思乃，小笠原勝，宮本（山口）朋美，松永孝之

## Evaluation of the restorative effect of betulin-related compounds on TGF- $\beta$ -induced immunosuppression

Shino YAMASAKI-YASHIKI, Masaru OGASAWARA,

Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO, Takayuki MATSUNAGA

### 要 約

がん細胞は免疫逃避のために transforming growth factor (TGF) - $\beta$  や prostaglandin E2 (PGE2) などの免疫抑制因子を放出する。これらの免疫抑制因子はがん細胞を殺傷する T 細胞や natural killer (NK) 細胞の機能を減弱させる。我々は、マウス脾臓細胞の細胞傷害活性を指標とした天然化合物のスクリーニングを行い、白樺樹皮由来のベツリンが TGF- $\beta$  や PGE2 による免疫抑制を解除することを見出した。本研究では、より高い抑制解除作用を有する化合物の獲得を目的として、17 種のベツリン関連化合物について評価を行い、TGF- $\beta$  による抑制の解除作用の発現に関与する化学構造を解析した。その結果、ベツリンの抑制解除作用の発現には 28 位の水酸基が重要であることが示唆された。

### Summary

Immunosuppressive factors such as transforming growth factor (TGF) - $\beta$  and prostaglandin E2 (PGE2) are released frequently by cancer cells. These factors can inhibit the function of tumor-reactive effector T cells and natural killer (NK) cells. To obtain compounds which could restore the TGF- $\beta$  - and PGE2-induced immunosuppression, around 800 natural compounds were screened using the assay system for cytolytic activity of splenic NK cell. Betulin, a natural triterpene compound extracted from the bark of birch, was found that had the restorative effect on both TGF- $\beta$  - and PGE2-induced immunosuppression. To analyze the chemical groups responsible for evoking the restorative effect on TGF- $\beta$  -induced immunosuppression, 17 betulin-related compounds were investigated for the cytolytic activity and analyzed based on the structure-activity relationship. As the result, it was suggested that the hydroxyl group at C-28 has a critical role for the restorative effect of betulin.

キーワード：ナチュラルキラー細胞，TGF- $\beta$ ，PGE2，ベツリン，ベツリン誘導体

Key words : Natural killer cell, TGF- $\beta$  , PGE2, Betulin, Betulin-related compound

担がん患者では、がん細胞自体が産生する免疫抑制因子により、がん細胞の排除に関わる NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞の機能が低下し、腫瘍免疫逃避が成立している。これにより、第 4 のがん治療法として期待されるがん免疫療法では十分な治療効果が得られず、免疫抑制因子による抑制機構の解明と抑制作用の解除が重要な課題となっている。がん細胞が産生する強力な免疫抑制因子に TGF- $\beta$  や PGE2 があり、T 細胞、NK 細胞、樹状細胞やマクロファージなどに作用して増殖や活性化を抑制する<sup>1-3)</sup>。我々は、がん細胞の排除に関わる NK 細胞の細胞傷害活性を指標として、天然化合物約 800 種から TGF- $\beta$  および PGE2 による免疫抑制を解除する化合物のスクリーニングを行った。

その結果、白樺樹皮由来のトリテルペン化合物であるベツリンに有効性を見出した<sup>4)</sup>。本実験系では、2 本鎖 RNA であるポリイノシン酸-ポリシチジン酸 (poly (I:C)) により亢進された NK 活性は、TGF- $\beta$  および PGE2 により未処置群レベルにまで抑制されるが、ベツリンの添加により TGF- $\beta$  および PGE2 による抑制が完全に解除された。

ベツリンに関しては、抗がん作用、抗ウイルス作用、抗菌作用等の多様な生物学的特性を有することが報告されている<sup>5-7)</sup>。最近では、脂肪酸合成系酵素遺伝子発現を調節する転写因子であるステロール調節エレメント結合タンパク質の成熟をベツリンが阻害することが明らかとなり、高脂血症や 2 型糖尿病などの治療薬としての有効性も期待さ

れている<sup>8)</sup>。

本研究では、TGF- $\beta$ による免疫抑制の解除におけるベツリン作用機序の解明を目的とし、まずは構造活性相関手法に基づいて解除作用の発現に必須な化学構造の同定を行うこととした。ここでは、細胞傷害活性を指標とした評価系にて、ベツリンと化学構造が類似した17種のベツリン関連化合物がTGF- $\beta$ による免疫抑制に対する解除作用を調べ、それらの活性と構造を比較検討した結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 実験試薬

Poly (I : C) はSigma社より購入した。TGF- $\beta$ はPeprotech社より購入した。ベツリン、ルペオールおよびベツリンジアセテートはExtrasynthese社より、ベツリン酸は東京化成工業社より購入した。その他のベツリン関連化合物はナミキ商事より購入した。ベツリンおよびベツリン関連化合物はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して、実験に供した。ベツリンおよびベツリン類似化合物の化学構造を Fig. 1 および Fig. 2, 3 にそれぞれ示す。

### 2. 細胞および細胞培養

マウス脾臓細胞はBALB/cマウス (7-9 週令, 雌性) より調製した。BALB/cマウスは三協ラボサービスより購入し、1~3 週間の予備飼育の後、実験に供した。マウスをジエチルエーテル麻酔下頸椎脱臼にて安楽死させた後、脾臓を摘出し、スライドガラスですりつぶして脾臓細胞を調製した。YAC-1細胞は、東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより入手した。10%の非働化ウシ胎児血清

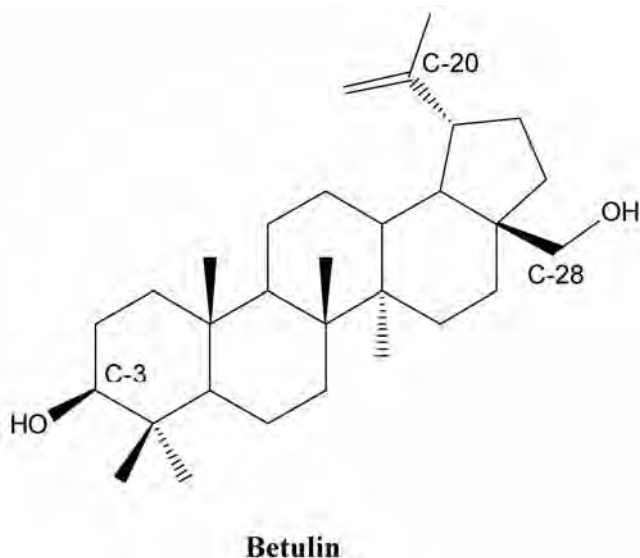


Fig. 1 The chemical structure of betulin

(FBS), 100U/mlのペニシリン, 0.1mg/mlのストレプトマイシンおよび55  $\mu$ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地中, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>下で継代, 維持した。

### 3. 細胞傷害活性の評価

脾臓細胞を $1.0 \times 10^7$  cells/mlに調製し、ベツリンあるいはベツリン関連化合物を1.25 - 5  $\mu$ Mとなるように添加して30分間培養した後, poly (I : C) およびTGF- $\beta$ をそれぞれ10  $\mu$ g/mlおよび0.5 ng/mlとなるように添加した。こ

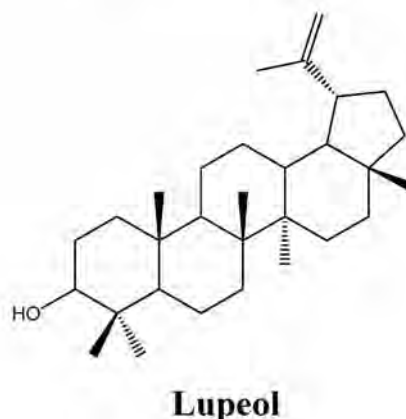
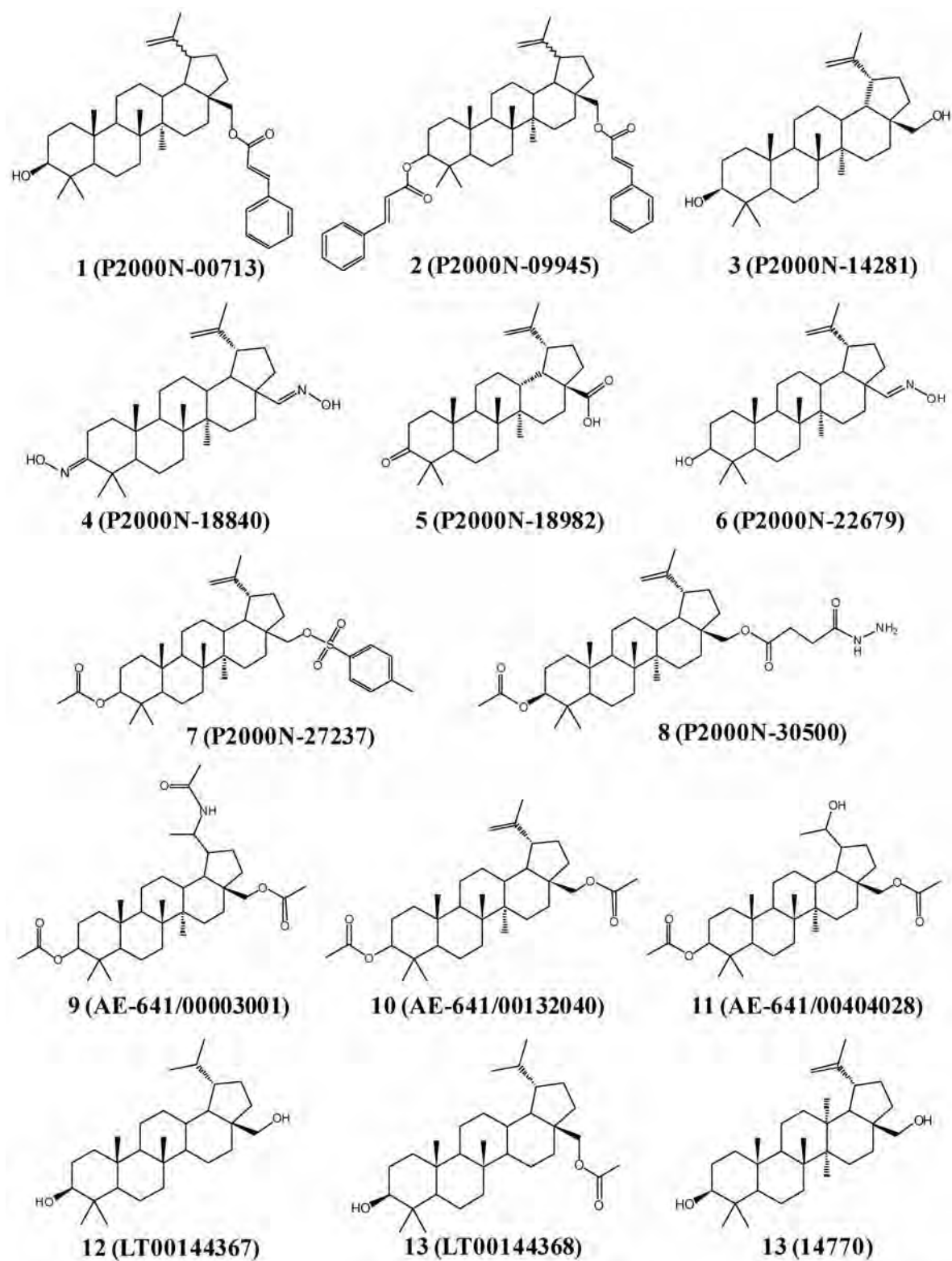


Fig. 2 The chemical structures of representative betulin-related compounds



**Fig. 3 The chemical structures of betulin-related compounds**

All compounds were purchased from Namiki shoji. Structure-activity relationship of lupane-triterpene was evaluated by the splenic NK assay.



の細胞懸濁液を96穴ウェルプレートに100  $\mu$ Lずつ ( $1.0 \times 10^6$  cells/well) 播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>下で20時間培養した。培養後, 10% FBS含有RPMI1640培地で洗浄し, 同培地にて  $1.0 \times 10^7$  cells/mlに再懸濁した。また, ターゲット細胞として calcein-AM (同仁化学研究所 社製) で蛍光標識したYAC-1細胞を用いた。YAC-1細胞を10% FBS含有RPMI1640培地で細胞密度  $1.0 \times 10^5$  cells/mlに調製し, 洗浄した脾臓細胞に100  $\mu$ Lずつ ( $1.0 \times 10^4$  cells/well) 添加し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>下で4時間共培養した。このとき, エフェクター細胞と標的細胞の比率 (E:T比) は100:1となる。培養後, 250  $\times$  gで10分間遠心分離を行い, 上清を100  $\mu$ L採取した。この上清中に含まれる傷害細胞より放出されたcalcein量をマイクロプレートリーダー(バイオテック 社製)を用いて励起波長490 nm, 蛍光波長515 nmで測定し, 細胞傷害活性を次式により算出した。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = (\text{測定値} - \text{自然放出量}) / (\text{最大蛍光量} - \text{自然放出量}) \times 100$$

## 結 果

### ベツリン類似化合物のTGF- $\beta$ により抑制された細胞傷害活性に対する解除作用の評価

NK細胞の細胞傷害活性の評価系を用いて, ベツリンおよびベツリン類似化合物がTGF- $\beta$ の抑制作用を解除するかどうかを調べた。まずは, ベツリンと化学構造が極めて類似したベツリン酸 (28位がカルボキシル基), ルペオール (28位がメチル基), およびベツリン酸ジアセテート (3位および28位が酢酸エステル化) との比較検討を行った。その結果, ベツリンに認められたTGF- $\beta$ による抑制解除

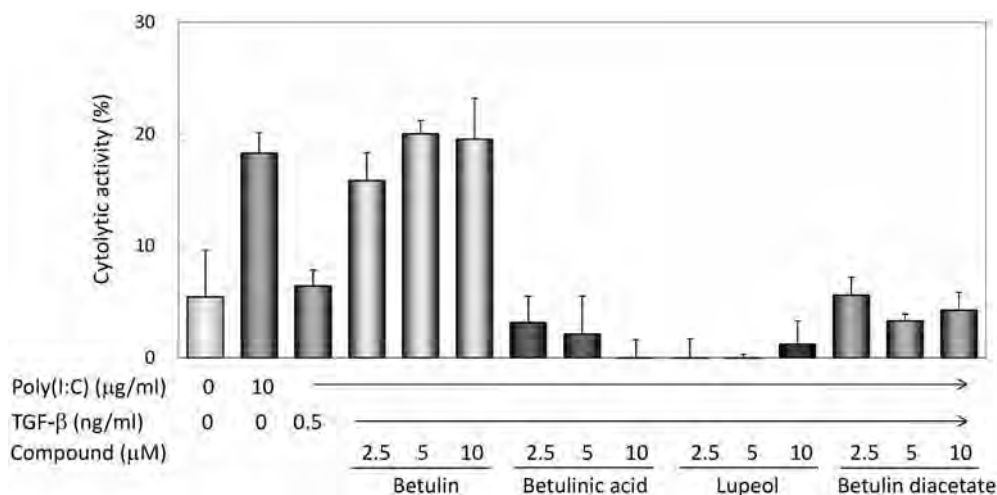
作用は, ベツリン酸, ルペオールおよびベツリンジアセテートのいずれのベツリン類似化合物においても認められなかった (Fig. 4)。

### ベツリン関連化合物のTGF- $\beta$ により抑制された細胞傷害活性に対する解除作用の評価

ベツリン関連化合物として, ルパン骨格を有する化合物からFig. 3に示す14種の化合物を選定した。これらは, ベツリンの28位のみが修飾された化合物3種 (化合物1, 6, 12), 3位および28位が修飾された化合物5種 (化合物2, 4, 7, 8, 11), 3位, 20位および28位が修飾された化合物2種 (化合物9, 10), ルパン骨格の立体構造が異なる化合物1種 (化合物3), メチル基が付加あるいは脱メチル化した化合物 (化合物12, 14)に分類される。細胞傷害活性の評価系において, これらのベツリン関連化合物がTGF- $\beta$ による抑制に及ぼす影響を調べた。その結果, 化合物3 (P2000N-14281) および化合物12 (LT00144367) にベツリンと同程度の抑制解除作用が認められたが, 他の化合物については認められなかった (Fig. 5)。ただし, 化合物12に関して, MNRにより化学構造解析を行ったところ, Fig. 3に示した化学構造とは異なり, ベツリンであると同定された。

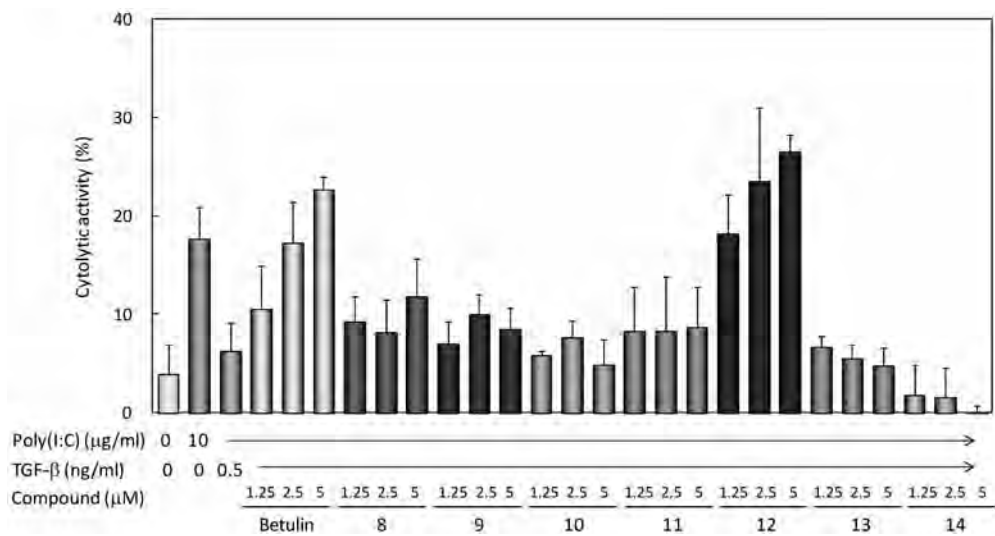
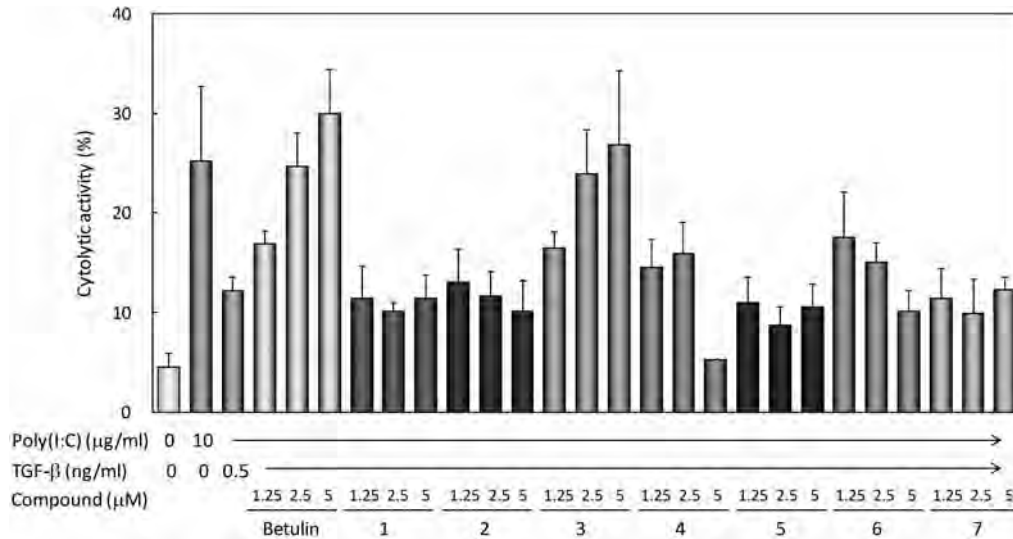
## 考 察

これまでに我々は, 免疫抑制因子であるTGF- $\beta$ およびPGE2による免疫抑制をベツリンが解除することを明らかとしてきた。本研究では, ベツリン作用機序解明の一端として, ベツリンの免疫抑制解除の活性発現に必須な構造の



**Fig. 4 Effect of representative betulin-related compounds on TGF- $\beta$ -induced suppression of cytolytic activity.**

Splenocyte were treated with betulin or betulin-related compounds in the presence of poly(I:C) for 20 h. The cytolytic activity was examined by co-culture with mouse YAC-1 cells for 4 h. Error bars indicate the SD from the mean (n = 3).



**Fig. 5 Effect of betulin-related compounds on TGF- $\beta$ -induced suppression of cytolitic activity.**

Splenocyte were treated with betulin or its related compounds in the presence of poly(I:C) for 20 h. The cytolitic activity was examined by co-culture with mouse YAC-1 cells for 4 h. Error bars indicate the SD from the mean (n = 3). The numbers of compounds are indicated in Fig. 3.

解明を目指し、ベツリンと類似の化学構造をもつベツリン関連化合物について活性の比較検討を行った。ベツリン類似化合物として代表的なベツリン酸およびルペオールは、ルパン骨格を同じくして28位がそれぞれカルボキシル基およびメチル基の化合物である。ベツリン酸およびルペオールにおいてTGF- $\beta$ による免疫抑制の解除作用が認められなかったことは最も注目すべき点であり、ベツリンの28位の水酸基が免疫抑制解除に重要であることが明らかとなった。また、立体構造が異なる化合物3とベツリンの間にはほとんど差が見られなかったことから、基本となる骨格よりも3位あるいは28位の置換基が解除作用には重要であることが示唆された。さらに、28位の炭素原子と水酸

基との間に窒素原子を導入した化合物6において、解除作用が認められなかったことより、28位側の水酸基の有無のみならず、環構造と3位の水酸基との距離も関与していることが推察された。

ベツリンは正常細胞に対する細胞毒性が低く、安全性の高い化合物であることから<sup>9)</sup>、医薬品シーズとして非常に優れている。本研究では*in vitro*の実験系において作用濃度5  $\mu$ Mで有効性を示してきたが、今後、*in vivo*の実験系においても有効性を確保することが課題となる。そのためには、免疫抑制に対する解除作用の増強が必要であると考えられる。その1つの方法として、ベツリンの水溶性の向上が挙げられる。ベツリンは水に極めて難溶性である



が、3位あるいは28位の水酸基をアミノ酸とエステル化することで水溶性が向上する<sup>10)</sup>。さらに、このエステル結合は細胞内のエステラーゼにより切断されて再びベツリンとなることから、免疫抑制に対する解除作用は維持されることが考えられる。一方、ベツリンおよびベツリン酸は抗HIV作用を有するが、ベツリンあるいはベツリン酸をリード化合物とした誘導体の合成により抗HIV作用の増強が試みられており、ベツリン酸の3位の化学修飾により高い抗HIV活性を有する化合物の取得に成功したとの報告がある<sup>11)</sup>。TGF- $\beta$ による免疫抑制解除においても、作用の発現に重要な28位の水酸基を維持しながら、3位側の化学修飾により高活性の誘導体を得られる可能性がある。今後、これらの検討を加えることで、より有効性の高いベツリン誘導体の取得を目指していく。

## 謝 辞

本研究は、住民生活に光をそそぐ交付金(がん免疫抑制解除剤の開発研究事業；代表者：高津 聖志 富山県薬事研究所 所長)の一環として実施された。

## 文 献

- Alleva DG, Walker TM, Elgert KD, Induction of macrophage suppressor activity by fibrosarcoma-derived transforming growth factor- $\beta$  1: contrasting effects on resting and activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **57**(6), 919-928 (1995)
- Uotila P. The role of cyclic AMP and oxygen intermediates in the inhibition of cellular immunity in cancer. *Cancer Immunol Immunother*, **43**, 1-9 (1996)
- Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK, IL-4 inhibits TGF- $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF- $\beta$ , generates IL-9<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> effector T cells. *Nat. Immunol.*, **9**(12), 1347-1355 (2008)
- Ogasawara M, Yamasaki S, Miyamoto T, Nagai Y, Matsunaga T, Screening of natural compounds for the restorative activity against immunosuppression by tumor cells. *富山県薬事研究所年報*, **39**, 21-25 (2012)
- Rzeski W, Stepulak A, Szymański M, Juszcak M, Grabarska A, Sifringer M, Kaczor J, Kandefer-Szerszeń M. Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **105**(6), 425-32 (2009)
- Pavlova NI, Savinova OV, Nikolaeva SN, Boreko EI, Flekhter OB, Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia*, **74**(5), 489-92 (2003)
- Salin O, Alakurtti S, Pohjala L, Siiskonen A, Maass V, Maass M, Yli-Kauhala J, Vuorela P, Inhibitory effect of the natural product betulin and its derivatives against the intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae*. *Biochem. Pharmacol.*, **80**(8), 1141-1151 (2010)
- Tang JJ, Li JG, Qi W, Qiu WW, Li PS, Li BL, Song BL, Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.*, **13**(1), 44-56 (2011)
- Rzeski W, Stepulak A, Szymanski M, Juszcak M, Grabarska A, Sifringer M, Kaczor J, Kandefer-Szerszen M., Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **105**(6), 425-432 (2009)
- Drag-Zalesinska M, Kulbacka J, Saczko J, Wysocka T, Zabel M, Surowiak P, Drag M., Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(16), 4814-4817 (2009)
- Xiong J, Kashiwada Y, Chen CH, Qian K, Morris-Natschke SL, Lee KH, Takaishi Y, Conjugates of betulin derivatives with AZT as potent anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**(17), 6451-6469 (2010)

# シャクヤクの品種別薬理試験 (2) シャクヤクエキスのラット血管平滑筋に対する作用

川筋 透, 横田洋一, 田村隆幸, 松永孝之

## Comparative Pharmacological Evaluation of Extracts from Various Cultivars of *Paeonia lactiflora* (2) Effects on the Rat Vascular Smooth Muscle

Toru KAWASUJI, Yoichi YOKOTA, Takayuki TAMURA and Takayuki MATSUNAGA

### 要 約

薬用植物指導センターで栽培されている62種のシャクヤクの根のエキスについて、ラットの血管平滑筋に対する作用を比較検討した。いくつかの品種の50%メタールエキスは、300 $\mu$ g/mLで、血管内皮を保持したラット胸部大動脈におけるフェニレフリン (0.3 $\mu$ M) による収縮に対して顕著な弛緩作用を示した。一方、他のいくつかのエキスには顕著な収縮増大作用を示すものがみられた。ペオニフロリンやアルビフロリンには弛緩作用はみられなかった。没食子酸 (3 $\mu$ g/mL) や没食子酸メチル (30 $\mu$ g/mL) は収縮増大を示した。これらのことから、いくつかのシャクヤク品種は、ラット胸部大動脈において血管弛緩作用を有することが示唆された。

### Summary

Effects of the root extracts of *Paeonia lactiflora* cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance were examined on the vascular smooth muscle to compare among 62 cultivars of this plant. The 50% methanolic extracts of some cultivars, at 300 $\mu$ g/mL, showed the remarkable relaxation against phenylephrine (0.3 $\mu$ M) -induced contraction of rat thoracic aorta with endothelium. On the other hand, some other cultivars showed the remarkable enhancement of contraction. Paeoniflorin and albiflorin did not show the relaxation. Gallic acid (3 $\mu$ g/mL) and methyl gallate (30 $\mu$ g/mL) showed the enhancement of contraction. These results suggest that extracts of some cultivars of *Paeonia lactiflora* have vasorelaxant effects in the rat thoracic aorta.

キーワード：シャクヤク, 品種, 胸部大動脈, 平滑筋, 弛緩

Key words: *Paeonia lactiflora*, Cultivar, Thoracic aorta, Smooth muscle, Relaxation

日本薬局方のシャクヤク (芍薬) は, *Paeonia lactiflora* Pallasの根 (Paeoniae Radix ; Peony Root) であり, 多くの漢方処方に配合されている重要生薬である<sup>1)</sup>。一般に鎮痙, 鎮痛, 鎮静, 収斂などの薬理作用があるとされている<sup>1-4)</sup>。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, ガロタンニン類などが知られている<sup>1-4)</sup>。

シャクヤクは根を薬用に花を鑑賞用に利用され, 県薬用植物指導センターには多くのシャクヤクの品種が栽培されている。ペオニフロリン等の成分については, 品種間に差がみられている<sup>5-7)</sup>。本研究では, 薬効面で優れたシャクヤクの品種を探し出し, 栽培普及・利用促進に役立てるため, 品種別シャクヤクエキスをを用いて各種の薬理試験を行い, 品種間で薬理効果の比較検討を行っている<sup>8)</sup>。

シャクヤクは駆瘀血薬として血流改善作用が期待され, シャクヤクは一酸化窒素 (nitric oxide ; NO) が関与する血管内皮依存性の血管弛緩作用を有し, その有効成分はガロタンニン類であることが報告されている<sup>9-11)</sup>。今回, シャクヤク62品種のエキスについて血管に対する作用を検討したので報告する。

### 実験材料及び実験方法

#### 1. シャクヤクエキス

薬用植物指導センターで栽培されたシャクヤクの根から第1報<sup>8)</sup>に記載した方法で調製された50%メタノールエキスを使用した。すなわち, シャクヤクの根は, 洗浄し, 凍結乾燥後に粉末にし, 10倍量の50%メタノールによる加熱

還流 1 時間の抽出を 2 回行い、得られた抽出液を合わせ、減圧濃縮・凍結乾燥を経て、50%メタノールエキスが調製された。多くの品種は植え付け 8 年経過後に掘り出した根を用いたが、やまびこは 7 年、春の粧は 3 年栽培の根を用いた。大和シャクヤクの代表的な品種であり、センターで薬用に栽培している梵天は 8 年 (8Y) と 4 年 (4Y) 後に掘り出した 2 種類の根を用いた。また、比較のため市販のシャクヤクとして、日本産 (ツムラ) 及び中国産 (ウチダ和漢薬) を購入し、同様に調製された 50%メタノールエキスを使用した。これらのシャクヤクエキスの収率は 20~58% (多くは 30~50%) であった。

シャクヤクのエキスは、蒸留水に懸濁して薬理試験の検体として使用した。

## 2. 使用薬物

(-) -フェニレフリン塩酸塩 (和光純薬)、塩化アセチルコリン (第一製薬)、パパベリン塩酸塩 (和光純薬)、ペオニフロリン (生薬精製品)、アルビフロリン (和光純薬)、没食子酸 (半井化学)、没食子酸メチル (和光純薬)、ペンタガロイルグルコース (Toronto research chemicals; 1, 2, 3, 4, 6-ペンタ-O-ガロイル-β-D-グルコピラノース) 他を使用した。ペンタガロイルグルコースは、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。なお、マグヌス槽内での DMSO の終濃度は、0.33%とした。

## 3. ラット摘出血管の収縮弛緩反応の測定

Wistar 系雄性ラット (体重 280 - 400g) をペントバルビタール・ナトリウム 40mg/kg 背部皮下注射で麻酔し、ヘパリンナトリウム生理食塩液で凝血を防止し、胸部大動脈

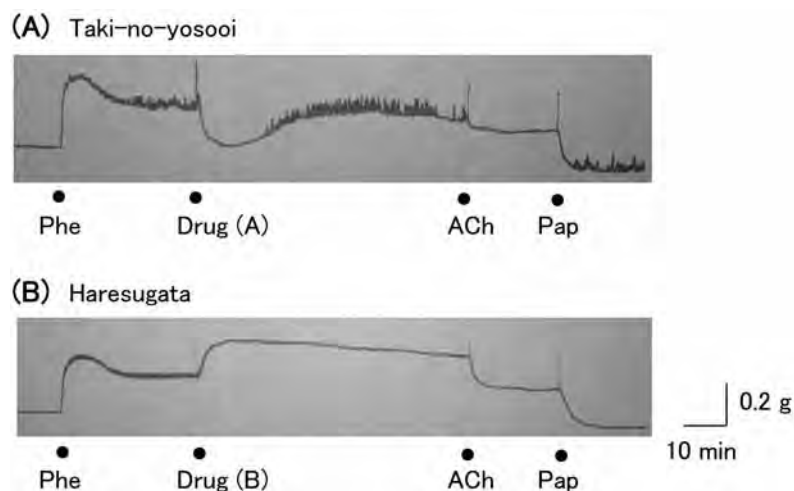
血管を摘出した。血管内皮に損傷を与えないように注意し、幅約 3 mm のリング標本を作製した。タングステン線で作られた三角形の臓器クリップ (RADNOTI, 10mm) 2 個を用い、血管内腔に線を通し、34°C の Krebs-Henseleit 液 (118.4mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub> 及び 11.1 mM グルコース) を満たした 15mL のマグヌス槽内に懸垂し、混合ガス (95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>) を通気した。血管標本には約 0.5g の負荷をかけ、収縮弛緩反応をアイソメトリックトランスデューサ (日本光電, TB-652T) を介して等尺性に記録した。

## 4. ラット摘出血管のフェニレフリンに対する作用の検討

標本を懸垂した 60 分後、選択的 α<sub>1</sub>-アドレナリン受容体活性薬であるフェニレフリン (0.3μM) による収縮 (15 分間) とそれに続くアセチルコリン (1 μM) による弛緩 (5 分間) を生じさせ、弛緩がみられることで内皮機能の維持を確認した。栄養液を交換し、40 分の休養後に、反応の安定化のため同様な操作を行った。

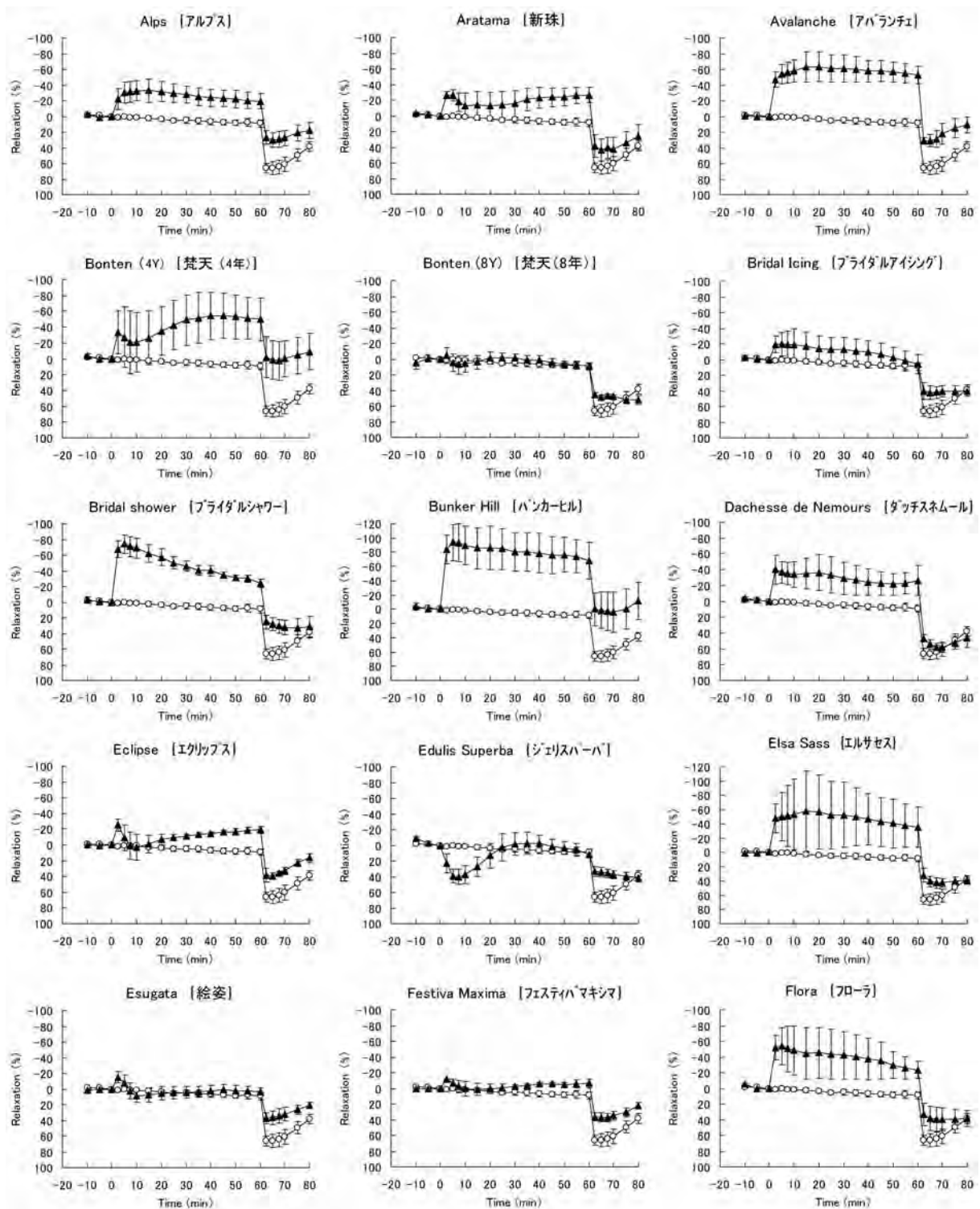
フェニレフリンで収縮させ、30 分後に検体適用し、収縮弛緩反応を 60 分間記録した。アセチルコリンの適用で 20 分間記録し、最後にパパベリン (100 μM) を適用した。パパベリンによる最大弛緩を 100% として、検体適用による弛緩率を算出した。なお、エキスによる弛緩反応は、適用 10 分前後に最大に達したことから、検体適用 10 分後の弛緩率でエキス間の弛緩効力を比較した。

シャクヤクエキスは、終濃度で 300 μg/mL 適用の場合、90 mg/mL の水懸濁液を調製し使用した (マグヌス槽内で 300 倍希釈)。



**Fig.1 Typical recording of extract-induced relaxation and enhancement of contraction in the isolated rat thoracic aorta with endothelium**

Drugs, at 300 μg/mL, were added to the bath 30 min after the application of phenylephrine (Phe ; 0.3 μM ). Drug (A) and (B) are the 50 % methanolic extracts prepared from Taki-no-yosooi (A) and Haresugata (B) of *Paeonia lactiflora*, respectively. Acetylcholine (ACh ; 1 μ M ) and papaverine (Pap ; 100 μ M ) were added 60 min and 80 min after drug application, respectively.



**Fig.2-1** Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the isolated rat thoracic aorta

○: Control, ▲: drug application at 300  $\mu\text{g/mL}$ . Phenylephrine (0.3  $\mu\text{M}$ ) was added 30 min before drug application. Acetylcholine (1  $\mu\text{M}$ ) and papaverine (100  $\mu\text{M}$ ) were added 60 min and 80 min after drug application, respectively. Relaxation was expressed as a percentage of the maximal relaxation induced by papaverine. Each point is presented as a mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.



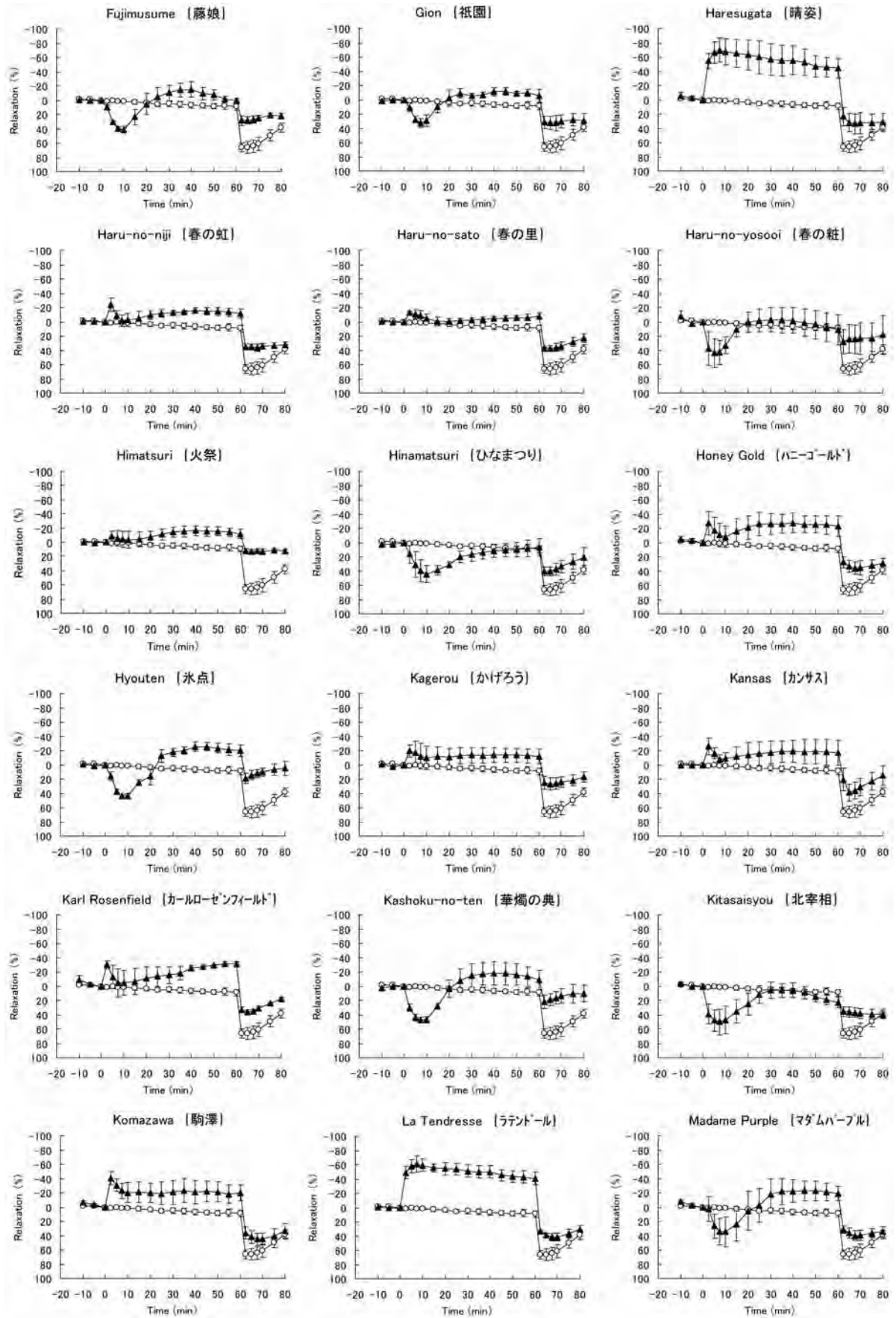


Fig.2-2 Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the isolated rat thoracic aorta

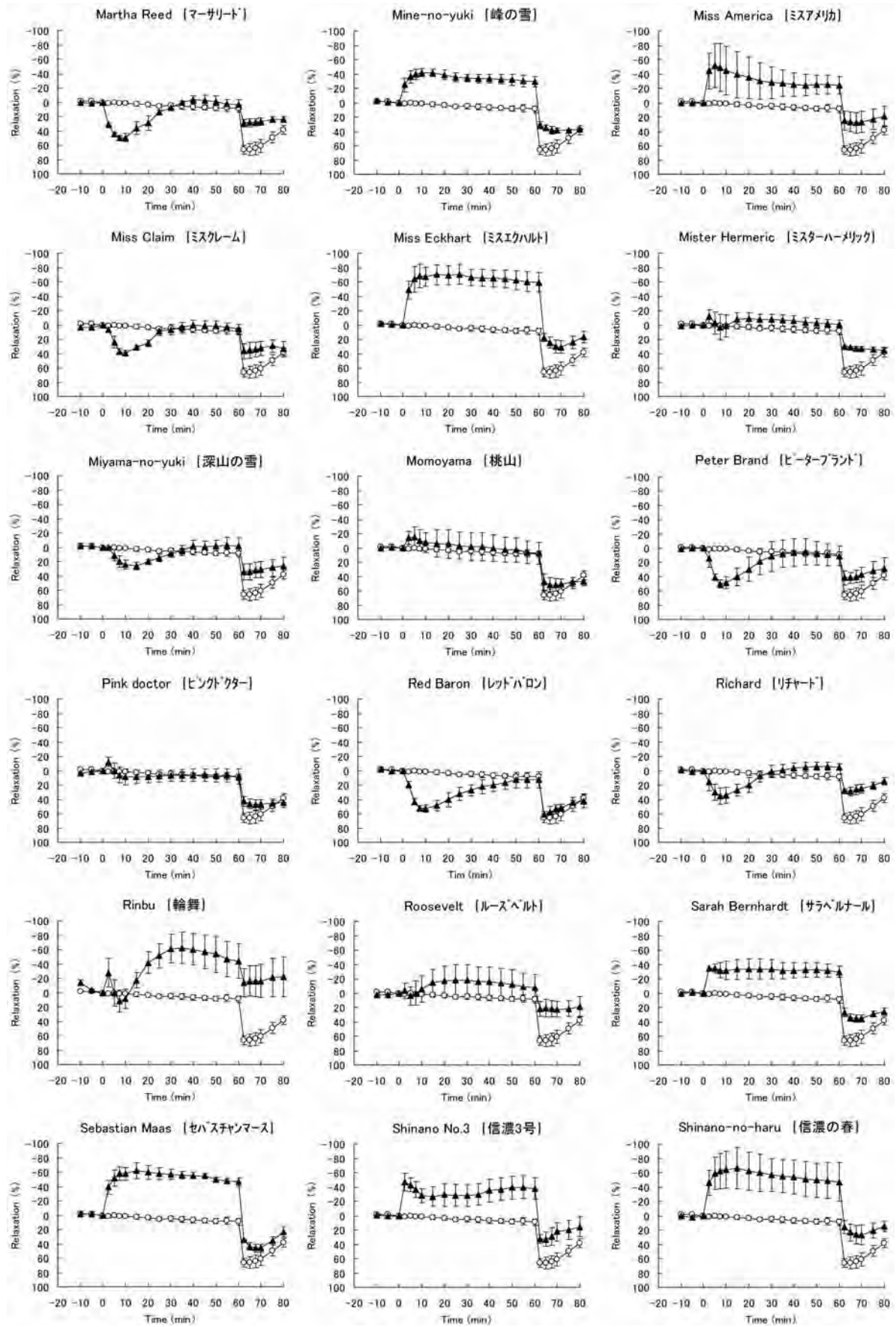


Fig.2-3 Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the isolated rat thoracic aorta



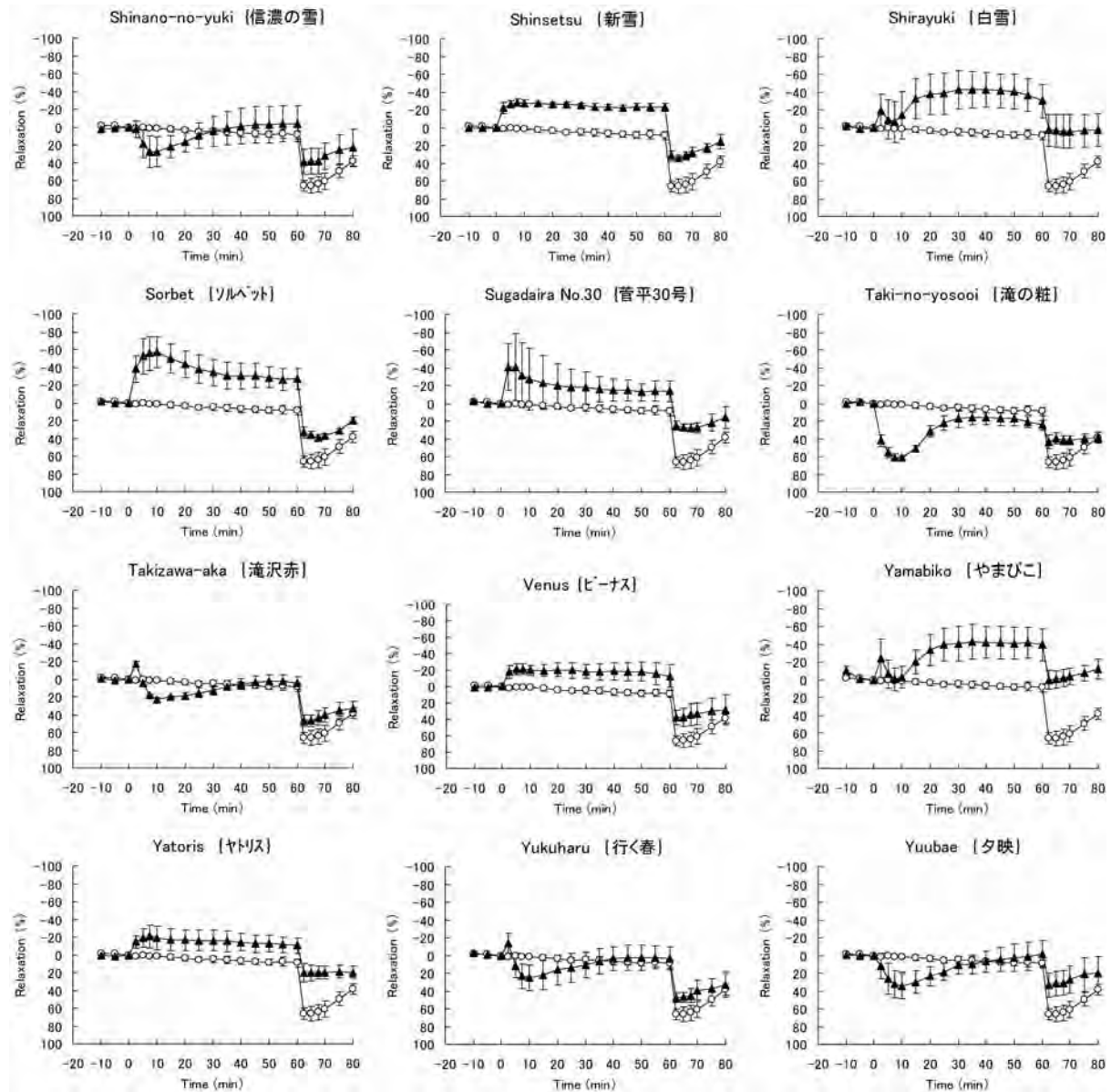


Fig.2-4 Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the isolated rat thoracic aorta

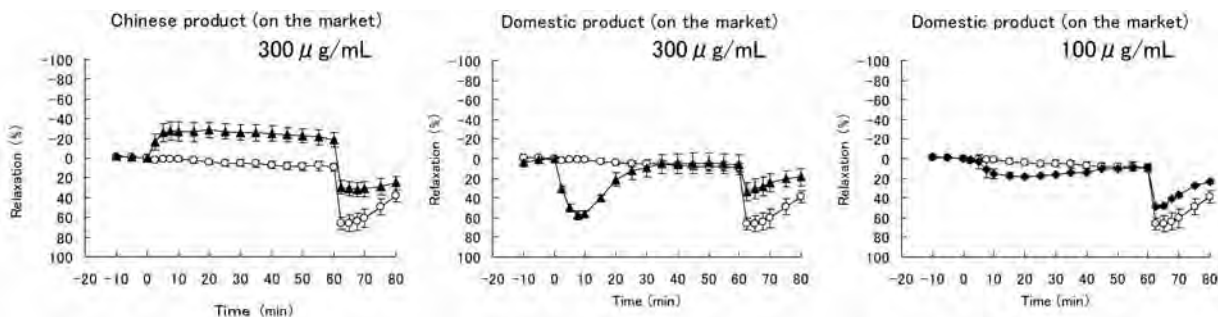


Fig.3 Effects of extracts prepared from a Chinese product and a domestic product of *Paeonia lactiflora* on the isolated rat thoracic aorta

○: Control, ▲: drug application at 300 $\mu$ g/mL, ◆: 100 $\mu$ g/mL. Phenylephrine (0.3 $\mu$ M) was added 30 min before drug application. Acetylcholine (1 $\mu$ M) and papaverine (100 $\mu$ M) were added 60 min and 80 min after drug application, respectively. Relaxation was expressed as a percentage of the maximal relaxation induced by papaverine. Each point is presented as a mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.

## 5. 統計処理

測定値は平均値±標準誤差で表した。

### 実験結果

#### 1. シャクヤクエキスのラット血管平滑筋に対する作用

品種別シャクヤクエキスは、300 $\mu$ g/mLの濃度で、顕著な血管弛緩から顕著な収縮増大までの反応を示した (Fig.1, Fig.2-1~2-4)。Fig.1にはエキスによる血管弛緩と収縮増大の記録例を示す。弛緩反応は10分前後で最大となり、その後は収縮の戻りが観察された。一方、収縮増大反応には持続性がみられた。エキスによっては弛緩反応と収縮増大反応が合わさった複雑な反応を示す場合があった。

市販の日本産生薬からのエキスは、300 $\mu$ g/mLで顕著な血管弛緩作用を示し、100 $\mu$ g/mLで弱い弛緩作用を示した (Fig.3)。一方、市販の中国産生薬エキスは、300 $\mu$ g/mLで弛緩作用を示さず、血管収縮増大作用を示した (Fig.3)。

シャクヤクエキス適用60分後の弛緩率は、-89% (負の値：収縮増大) ~61%を示した。比較的強い弛緩率41~61%を示したものは、滝の粧、日本産生薬、レッドパロン、マーサリード、ピーターブランド、北宰相、華燭の典、ひなまつり、氷点、藤娘の10種類のエキスであった。逆に顕著な収縮増大を示したエキスとしては、バンカーヒル、ブライダルシャワー、晴れ姿、ミスエクハルトなどであった。

梵天の2つのエキス (栽培年数：8年と4年) は、弛緩作用は弱いかほとんどみられなかった。

マグヌス槽内では糸で血管標本を懸垂し、混合ガスを通気しているが、エキスによってはパパベリン適用後に持続性の泡が多くなる現象がみられ、糸が曲げられることで張力変化が記録される場合があった (Fig.1)。

#### 2. シャクヤク成分のラット血管平滑筋に対する作用

ペオニフロリン及びアルピフロリンは10-30 $\mu$ g/mLで弛緩作用を示さなかった。また、ペンタガロイルグルコースは10 $\mu$ g/mLで血管弛緩作用をほとんど示さず、30 $\mu$ g/mLでは若干の弛緩傾向あるいはほとんど弛緩を示さなかった。没食子酸は、3 $\mu$ g/mLで収縮増大作用を示し、10-30 $\mu$ g/mLでは徐々に進む弛緩がみられ、60分までにはほぼ完全に弛緩した。没食子酸メチルは、30 $\mu$ g/mLで収縮増大作用を示した。

## 考 察

内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor ; EDRF) の主なものであるNOは、血管の緊張(トーン)を弛緩方向に制御するとともに、血小板の凝集や粘着を抑制し、血圧や血流の調節及び血栓の防止に重要な役割を果たしているとされている<sup>12-13)</sup>。NOの血管作用の大部分はサイクリックGMP (cGMP) を介するとされ<sup>14)</sup>、血管内皮細胞にアセチルコリンなどが働くと、L-アルギニンからNO合成酵素によってNOがつけられ、拡散によって平滑筋細胞に到達し、グアニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内のcGMP濃度の上昇を介して収縮が抑制され、血管は弛緩する<sup>12-14)</sup>。

NOは極めて不安定な物質で、半減期はきわめて短く数秒といわれ、構造型cNOSの酵素反応の持続時間の短いことも知られている<sup>13)</sup>。NOはフリーラジカルであり、活性酸素などの存在で寿命がさらに短くなり、一方で活性酸素を消去するSOD (スーパーオキシドジスムターゼ) はNOの失活を遅らせ、NOの効果が強くなるとされている<sup>12-13)</sup>。

ラット胸部大動脈血管をプロスタグランジンF<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) で収縮させ、シャクヤクの熱水抽出エキスを用いて血管弛緩作用が検討されており、内皮の除去やNO合成酵素阻害剤によって弛緩作用がみられなくなるなどから、シャクヤクエキスはNOが関与する内皮依存性血管弛緩作用を示し、弛緩活性成分はガロタンニン類であると報告されている<sup>9-11)</sup>。

今回、血管内皮機能を保持したラットの胸部大動脈をフェニレフリンで収縮させ、シャクヤクの50%メタノールエキスを用いて、品種別シャクヤクエキスと市販生薬からのエキスについて、血管弛緩作用を検討した。その結果、シャクヤクエキスは、300 $\mu$ g/mLの濃度で顕著な弛緩作用から顕著な収縮増大作用まで観察され、エキス間に差がみられた。

2種類の市販漢方薬原料生薬からのエキスについては、日本産生薬のエキスは強い弛緩作用を示し、品種別エキスの中でも強い弛緩を示すグループに入っていた。一方、中国産生薬のエキスは収縮増大作用を示した。他の市場流通品においても血管作用の効力に差が出る可能性があると思われる。

シャクヤクエキスにみられる血管弛緩反応は、適用10分前後に最大弛緩を示す一過性のものであり、一方、収縮増大反応は持続性のものであった。エキスによっては、収縮増大反応を示すと同時に適用10分前後に弛緩方向への変動がみられることなどから、シャクヤクエキスには血管弛緩作用と収縮増大作用という2つの相反する作用が混在していることが推察された。顕著な弛緩作用を示すためには弛



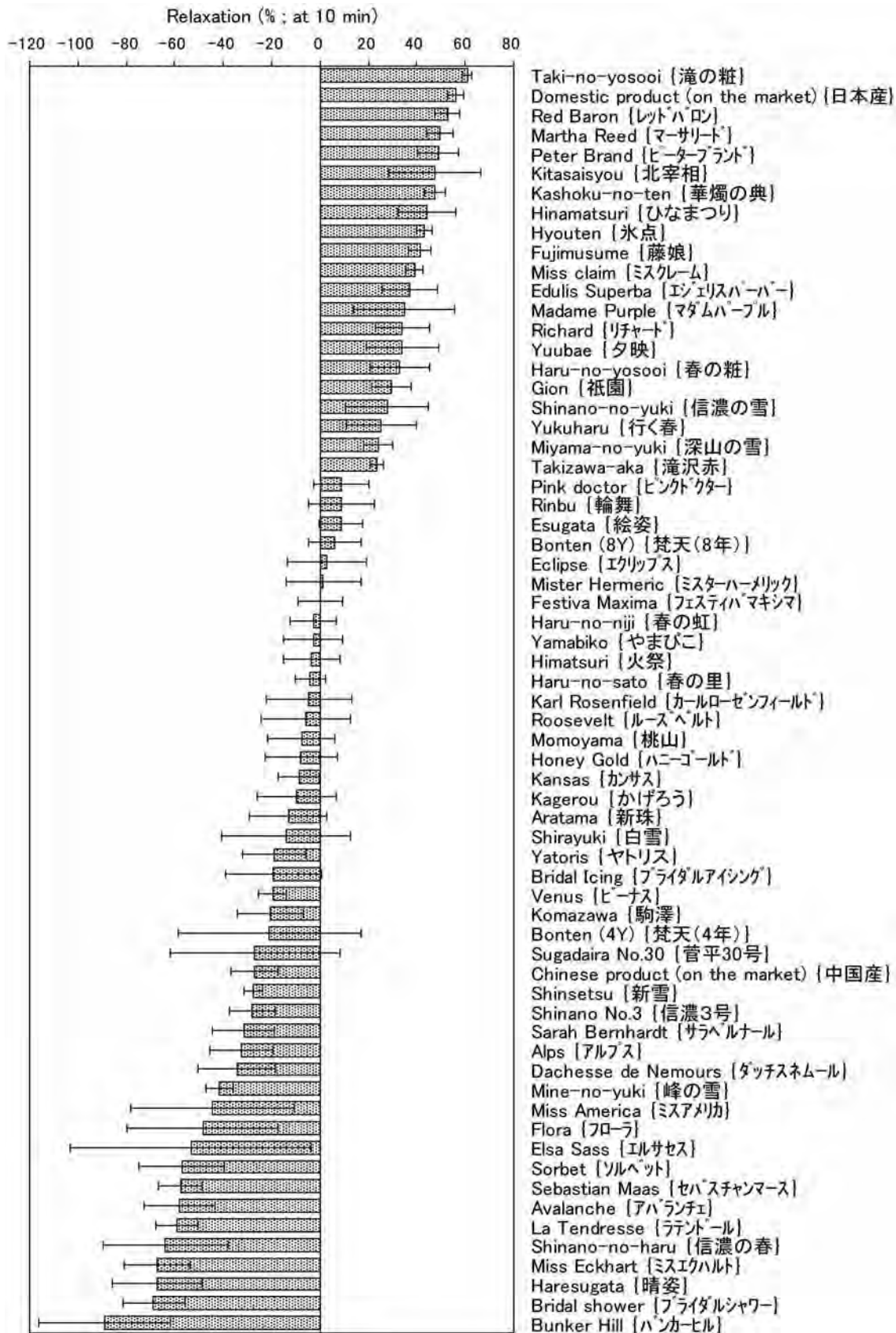


Fig.4 Relaxant potency of extracts of *Paeonia lactiflora* in the isolated rat thoracic aorta

Drugs, at 300 $\mu$ g/mL, were added 30 min after the application of phenylephrine (0.3 $\mu$ M). Relaxation (% ; at 10 min) was expressed as a percentage of the maximal relaxation induced by papaverine (100 $\mu$ M). Each point is presented as a mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.

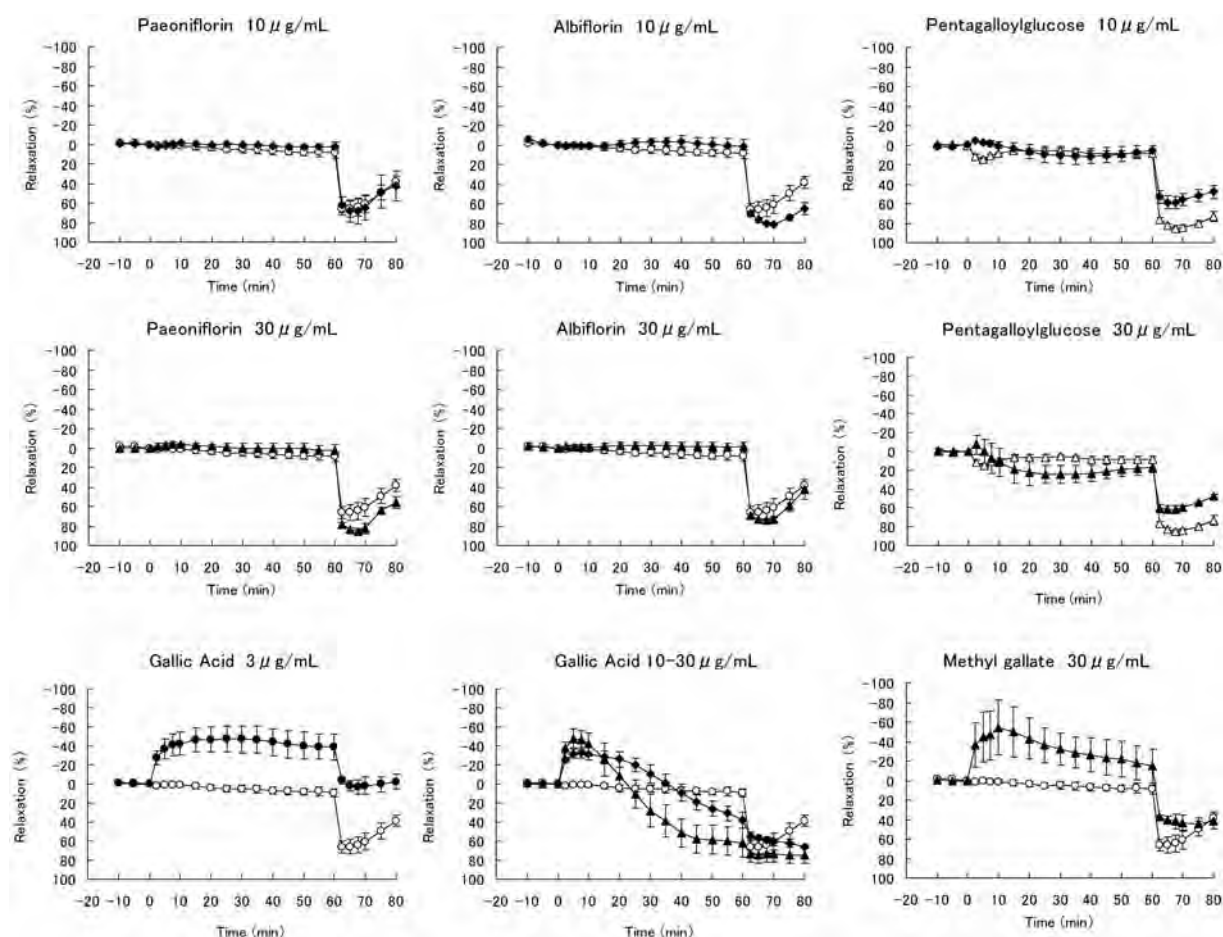
緩が強いほかに収縮増大が相対的に弱い必要があると思われる。

シャクヤクエキス適用後に、アセチルコリンによる弛緩反応は減弱しても完全消失まではしていないことから、シャクヤクエキスは300 $\mu$ g/mLの濃度では、血管内皮のアセチルコリンに対する反応性やNOの産生・放出機能はある程度保持されており、アセチルコリンによる弛緩反応を示さない内皮細胞除去標本のような機能障害を受けた状態には至っていないと思われる。

NOは内皮自身にも作用し、NO合成酵素の活性が抑制され、いわゆるネガティブフィードバックがかかるとされ、アセチルコリンによる弛緩反応が一過性である機序として考えられている<sup>14)</sup>。シャクヤクエキスによる弛緩反応は、適用10分前後に最大弛緩に達し、その後弛緩の減弱がみられた。アセチルコリンによる弛緩反応も最大弛緩に達した後に弛緩の減弱がみられる傾向にあったことから、エキス

とアセチルコリンの両方の弛緩特性に類似性があると思われる。シャクヤクエキスによる弛緩作用機序の1つには、内皮依存性血管弛緩作用物質であるアセチルコリンに類似して、NOの産生・放出を促進することで弛緩作用を示している可能性があると思われる。

内皮が付着した血管では、多くの収縮薬による収縮が小さく、内皮の除去やNO合成酵素阻害剤の投与によって収縮が大きくなることが知られており、内皮からNOが自発的かつ持続的に放出され、収縮を制御しているものと考えられている<sup>14)</sup>。今回の血管実験においても、内皮を除去せずにアセチルコリンで弛緩がみられる血管標本を用いていることから、フェニレフリンによる収縮時には血管内皮から持続的にNOが産生・放出されていると考えられる。フェニレフリンによる収縮反応が一過性に大きくなってから減弱し、収縮が小さくなったことに関係していると思われる。



**Fig.5** Effects of paeoniflorin, albiflorin, pentagalloylglucose, gallic acid and methyl gallate on the isolated rat thoracic aorta

○: Control, △: 0.33% DMSO, ●: drug application at 3 $\mu$ g/mL, ◆: 10 $\mu$ g/mL, ▲: 30 $\mu$ g/mL. Drugs were added 30 min after the application of phenylephrine (0.3 $\mu$ M). Acetylcholine (1 $\mu$ M) and papaverine (100 $\mu$ M) were added 60 min and 80 min after drug application, respectively. Relaxation was expressed as a percentage of the maximal relaxation induced by papaverine. Pentagalloylglucose was dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.

和漢薬にしばしば多量に含まれている抗酸化性化合物群にフェノール性化合物群,特にポリフェノール(タンニン)群があり,これらの多くにラジカルスカベンジャーとしての作用がみられるといわれている<sup>15)</sup>. シャクヤクには没食子酸の構造を分子内にもつ加水分解性タンニンであるガロタンニン類の存在が知られている. また, シャクヤクエキス, 没食子酸, ペンタガロイルグルコースなどには抗酸化活性(ラジカル消去作用)が報告されている<sup>8)</sup>.

フリーラジカルであるNOは反応性が高いことから, フェニレフリンによる血管収縮時に持続的に放出されているNOが, シャクヤクエキス中のガロタンニン類などのラジカルスカベンジャーと反応しNOが不活性化されることが考えられる. フェニレフリン収縮時のエキスによる収縮増大作用に関与する成分及び作用機序の少なくとも一部ではないかと思われる.

没食子酸はPGF<sub>2α</sub>収縮時において血管収縮増大作用を示すことが報告されており<sup>9,10)</sup>, 没食子酸は, 収縮薬の種類に関係しない機序で今回のフェニレフリン収縮時においても収縮増大作用を示したものと考えられる. 一方, 没食子酸は, 比較的高濃度では, 徐々に進行する弛緩作用(収縮抑制作用)を合わせて示した. シャクヤクエキスにみられる一過性の弛緩作用とは作用機序が異なる可能性が高いと思われる.

没食子酸メチルは収縮増大作用を示したことから, エキスによる収縮増大作用に没食子酸メチルも一部関与している可能性があると思われる.

ペンタガロイルグルコース, ヘキサガロイルグルコース, ヘプタガロイルグルコース及びオクタガロイルグルコースは, 血管弛緩作用を示すことが報告されているが<sup>10,11)</sup>, 今回使用したペンタガロイルグルコースには, 弛緩作用は弱いかほとんどみられなかった. また, 没食子酸や没食子酸メチルと異なり収縮増大作用もみられなかった.

血管内皮を保持したラット胸部大動脈標本において, ペオニフロリンには血管弛緩作用がみられないという報告<sup>9-11)</sup>と血管弛緩作用がみられるという報告<sup>16)</sup>がある. 今回の実験では, ペオニフロリンのほかアルビフロリンにも血管弛緩作用はみられなかった.

大和シャクヤクの代表的な薬用品種である梵天のエキスでは, 血管弛緩作用は弱いかほとんどみられなかった. また, 梵天は2つのエキス(栽培年数:8年と4年)で作用の強さに違いがみられた. なお, 2つのエキスで抗酸化活性に差がみられている<sup>8)</sup>.

今回, 比較的顕著な弛緩作用を示したシャクヤクの品種としては, 滝の粧, レッドバロン, マーサリード, ピーターブランド, 北宰相などが挙げられる.

顕著な血管弛緩作用を示したシャクヤクの品種は, 血流

改善効果の面で有効性が高い可能性があるかと推察される. 今後, 植物の生育環境の違いによって薬効が変動する可能性を考慮に入れて, 新たに掘り出して調製するエキスを用いて有効性の再評価などを行う予定である.

## 文 献

- 1) 第十五改正日本薬局方解説書, 廣川書店(2006), D-324
- 2) 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F<sub>M</sub>100との併用効果, 薬学雑誌, **89**, 879-886 (1969)
- 3) 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
- 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) 田村隆幸, 田中彰雄, 内 正人, 村上守一: シャクヤクの栽培研究—8年間栽培したシャクヤクの品質について—, 富山県薬事研究所年報, **37**, 57-63 (2010)
- 6) 小松かつ子: 富山県ブランド生薬の開発 遺伝的・成分的多様性の解析, 平成21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 富山大学, p.17-21 (2010)
- 7) Wu Yuqiu, Zhu Shu, 小松かつ子, 村上守一, 田中彰雄, 柴田敏郎: 芍薬の成分的多様性の解析, 第27回和漢医薬学会学術大会要旨集, p.64 (2010)
- 8) 松永孝之, 横田洋一, 田村隆幸, 田中彰雄: 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)
- 9) 後藤博三, 嶋田豊, 古田一史, 伊藤隆, 寺澤捷年: 芍薬の内皮依存性血管弛緩作用, 和漢医薬学会大会要旨集, **12**, p.29 (1995)
- 10) Goto H., Shimada Y., Akechi Y., Kohta K., Hattori M., Terasawa K.: Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from the roots of *Paeonia lactiflora* on isolated rat aorta, *Planta Med.*, **62**, 436-439 (1996)
- 11) 後藤博三: 芍薬の血管作動性と病態モデル動物に対する効果に関する研究, 平成15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 富山大学, p.49-54 (2004)
- 12) フリーラジカル入門(吉川敏一著), 先端医学社(1996)
- 13) 血管—内皮と平滑筋—, 新生化学実験講座10(日本生化学会編), 東京化学同人(1993)
- 14) 唐木英明: NOの血管作用, 最新医学からのアプローチ **12** NO(戸田昇編), 108-117, メジカルビュー社

(1995)

- 15) 奥田拓男：和漢薬,最新医学からのアプローチ4 フリーラジカル (近藤元治編) ,164-173,メジカルビュー社 (1992)
- 16) Yoo M.Y., Lee B.H., Choi Y.H., Lee J.W., Seo J.H., Oh K.-S., Koo H.-N., Seo H.W., Yon G.H., Kwon D.Y., Kim Y.S., Ryu S.Y. : Vasorelaxant effect of the rootbark extract of *Paeonia moutan* on isolated rat thoracic aorta, *Planta Med.*,**72**, 1338-1341 (2006)

# 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

川筋 透, 横田洋一, 田村隆幸, 松永孝之

## Comparative Pharmacological Evaluation of Extracts from Various Cultivars of *Paeonia lactiflora* (3)

### Effects on the Twitch Response to Electrical Stimulation in the Isolated Mouse Vas Deferens

Toru KAWASUJI, Yoichi YOKOTA, Takayuki TAMURA and Takayuki MATSUNAGA

#### 要 約

薬用植物指導センターで栽培されている62種のシャクヤクの根のエキスについて、マウス精管の電気刺激 (1 msec, 0.1 Hz) 収縮に対する作用を検討した。テトロドトキシン、クロニジン (選択的 $\alpha_2$ -アドレナリン受容体活性薬) 及びシクロペンチルアデノシン (選択的 $A_1$ -アデノシン受容体活性薬) は、マウス精管のtwitch収縮反応を強く抑制した。シャクヤクエキスは、300 $\mu$ g/mLでtwitch収縮を抑制し、適用60分後の抑制率は52~97%であった。ペオニフロリンはtwitch収縮抑制作用を示さず、没食子酸 (3 $\mu$ g/mL)、ペンタガロイルグルコース (10 $\mu$ g/mL)、没食子酸メチル (30 $\mu$ g/mL) 及びカテキン (100 $\mu$ g/mL) はtwitch収縮抑制作用を示した。これらのことから、シャクヤクエキスはマウス精管における神経刺激性収縮を抑制する作用を有することが示唆された。

#### Summary

Effects of the root extracts of *Paeonia lactiflora* cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance were examined on the twitch response to electrical stimulation (1msec, 0.1Hz) in the isolated mouse vas deferens to compare among 62 cultivars of this plant. Tetrodotoxin, clonidine (a selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist) and cyclopentyladenosine (a selective  $A_1$ -adenosine receptor agonist) potently inhibited the twitch response of mouse vas deferens. The 50% methanolic extracts of peony root, at 300 $\mu$ g/mL, inhibited the twitch response and the percent twitch-inhibition was 52~97% at 60 min after drug application. Paeoniflorin did not show the twitch-inhibitory effect. Gallic acid (3 $\mu$ g/mL), pentagalloylglucose (10 $\mu$ g/mL), methyl gallate (30 $\mu$ g/mL) and catechin (100 $\mu$ g/mL) showed the twitch-inhibitory effect. These results suggest that extracts of peony root have inhibitory effects on the neurogenic contraction in the mouse vas deferens.

キーワード：シャクヤク, 品種, 精管, 電気刺激

Key words : *Paeonia lactiflora*, Cultivar, Vas deferens, Electrical stimulation

日本薬局方のシャクヤク (芍薬) は、*Paeonia lactiflora* Pallas の根 (Paeoniae Radix ; Peony Root) であり、多くの漢方処方に配合されている重要生薬である<sup>1)</sup>。一般に鎮痙、鎮痛、鎮静、収斂などの薬理作用があるとされている<sup>1-4)</sup>。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、ガロタンニン類などが知られている<sup>1-4)</sup>。

シャクヤクは根を薬用に花を鑑賞用に利用され、県薬用植物指導センターには多くのシャクヤクの品種が栽培されている。ペオニフロリン等の成分については、品種間に差

がみられている<sup>5-7)</sup>。本研究では、薬効面で優れたシャクヤクの品種を探し出し、栽培普及・利用促進に役立てるため、品種別シャクヤクエキスを用いて各種の薬理試験を行い、品種間で薬理効果の比較検討を行っている<sup>8)</sup>。

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 (脚攣急) 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<sup>9)</sup>。

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し、副交感神経終末部からのアセチルコリンの遊離を抑制する作用が報告されている<sup>10-11)</sup>。

今回、モルモット回腸の場合と類似の神経刺激性収縮反応が生じるマウスの精管を用い<sup>12-13)</sup>、シャクヤク62品種のエキスについて電気刺激によるtwitch収縮反応に対する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. シャクヤクエキス

薬用植物指導センターで栽培されたシャクヤクの根から第1報<sup>8)</sup>に記載した方法で調製された50%メタノールエキスを使用した。すなわち、シャクヤクの根は、洗浄し、凍結乾燥後に粉末にし、10倍量の50%メタノールによる加熱還流1時間の抽出を2回行い、得られた抽出液を合わせ、減圧濃縮・凍結乾燥を経て、50%メタノールエキスが調製された。多くの品種は植え付け8年経過後に掘り出した根を用いたが、やまびこは7年、春の粧は3年栽培の根を用いた、大和シャクヤクの代表的な品種であり、センターで薬用に栽培している梵天は8年(8Y)と4年(4Y)後に掘り出した2種類の根を用いた。また、比較のため市販のシャクヤクとして、日本産(ツムラ)及び中国産(ウチダ和漢薬)を購入し、同様に調製された50%メタノールエキスを使用した。これらのシャクヤクエキスの収率は20~58%(多くは30~50%)であった。

シャクヤクのエキスは、蒸留水に懸濁して薬理試験の検体として使用した。

### 2. 使用薬物

テトロドトキシン・クエン酸塩(Research Biochemicals International)、クロニジン塩酸塩(東京化成)、N<sup>6</sup>-シクロペンチルアデノシン(Sigma)、ペンタガロイルグルコース(Toronto research chemicals; 1,2,3,4,6-ペンタ-O-ガロイル-β-D-グルコピラノース)、ペオニフロリン(生薬精製品)、没食子酸(半井化学)、没食子酸メチル(和光純薬)、D-(+)-カテキン(東京化成)他を使用した。ペンタガロイルグルコースとカテキンは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して使用した。なお、マグナス槽内でのDMSOの終濃度は、0.33%とした。

### 3. 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(体重27g以上)を頸椎脱臼で致死し、精管を摘出した。マウスの精管は細く1本では発生張力が小さいので、1匹からの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(直径約1mm)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(日本光電, TB-652T)に連結した。精管標本は、上下(10mm間隔)に並べた1対のリング状白金電極(直径8mm)の中に通した状態で、34℃のMcEwen液(130mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0mM NaHCO<sub>3</sub>, 13.1mMスクロース及び11.1 mMグルコース)を満たした30mLのマグナス槽内に懸垂した<sup>14)</sup>。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

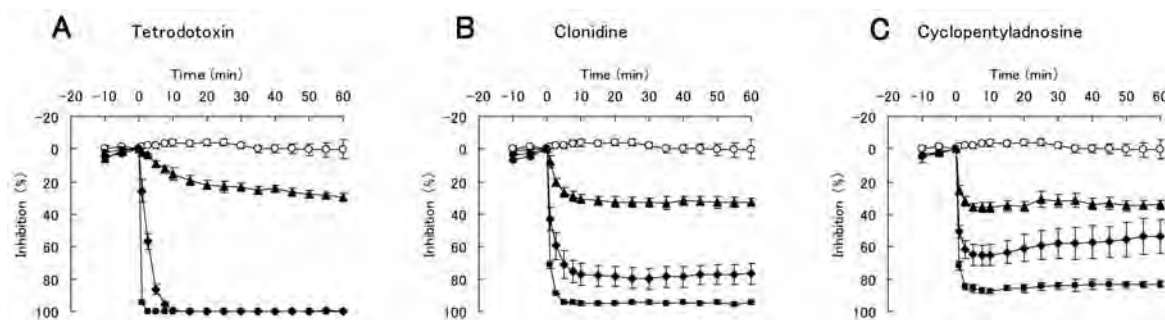


Fig.1 Effects of tetrodotoxin (A), clonidine (B) and cyclopentyladenosine (C) on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

A: Control (○), tetrodotoxin at 0.01 μM (▲), 0.03 μM (◆) and 0.1 μM (■).  
 B: Control (○), clonidine at 0.001 μM (▲), 0.003 μM (◆) and 0.01 μM (■).  
 C: Control (○), cyclopentyladenosine at 0.01 μM (▲), 0.03 μM (◆) and 0.1 μM (■).  
 Each point is presented as a mean ± S.E. of 3-5 experiments.

頻度0.1Hz, 電圧65V)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0.15gの静止張力のもとで電気刺激を開始した。30分後に電気刺激を中断し栄養液を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。

シャクヤクエキスは, 終濃度で300  $\mu$ g/mL適用の場合, 90mg/mLの水懸濁液を調製し使用した(マグナス槽内で300倍希釈)。

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。

#### 4. 統計処理

測定値は平均値 $\pm$ 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抑制作用

高選択的Na<sup>+</sup>チャンネルブロッカーであるテトロドトキシンは, 0.01-0.1 $\mu$ Mで電気刺激によるtwitch収縮反応を抑制し, 0.03 $\mu$ Mで完全抑制した(Fig.1)。60分間で最も大きい抑制率から算出した50%抑制に要する濃度であるIC<sub>50</sub>値は0.014 $\mu$ Mであった。選択的 $\alpha_2$ -アドレナリン受容体活性薬であるクロニジンは, 0.001-0.01 $\mu$ Mでtwitch収縮反応を抑制し, IC<sub>50</sub>値は0.0015 $\mu$ Mであった(Fig.1)。選択的アデノシンA<sub>1</sub>-受容体活性薬であるシクロペンチルアデノシンは, 0.01-0.1 $\mu$ Mでtwitch収縮反応を抑制し, IC<sub>50</sub>値は0.017 $\mu$ Mであった(Fig.1)。

#### 2. シャクヤクエキスのtwitch収縮反応に対する作用

品種別シャクヤクエキス及び2種類の市販生薬からのエキスは, 300 $\mu$ g/mLの濃度で, twitch収縮抑制作用を示した(Fig.2, Fig.3-1~3-4, Fig.4)。エキスによって, 抑制率の時間的変化に違いがみられた。エキス適用の初期に, ある程度抑制が一気に進み(初期抑制), その後徐々に進行する収縮抑制がみられたが, 別のエキスでは, その途中段階で抑制の減弱が追加的にみられ, 適用1分前後に初期抑制の最大値を示した。

適用60分後の抑制率は52~97%であった。60分後の抑制率が95%以上を示したのは, 春の粧, プライダルアイシング, 北宰相, 輪舞, ルーズベルト, 梵天(8年)など9種類のエキスであった。また, ミスエクハルト, ダッチスネムール, ひなまつり場合は, 60分後の抑制率は小さく52~56%であった(他のエキスは抑制率70%以上)。

適用1分後の抑制率は17~39%であり, 比較的強い31~39%の抑制率を示したのは, 春の粧, 梵天(4年), カールローゼンフィールド, 輪舞, セバスチャンマース, 北宰相, 日本産生薬の7種類のエキスであった。

#### 3. シャクヤク成分のtwitch収縮反応に対する作用

ペオニフロリンは, 300 $\mu$ g/mLでtwitch収縮抑制作用を示さなかった(Fig.5)。没食子酸は, 3 $\mu$ g/mLで収縮抑制作用を示し, 経過時間に対して最初はゆっくりと抑制が進行し, その後は抑制率の増大する速度はやや大きくなった(Fig.5)。没食子酸メチルは, 30 $\mu$ g/mLで適用後しばらくしてから徐々に進行する弱い収縮抑制を示した(Fig.5)。

ペンタガロイルグルコースは, 10 $\mu$ g/mLで収縮抑制作用を示し, 経過時間に対してほぼ直線的な抑制率の増加がみられた(Fig.5)。カテキンは, 100 $\mu$ g/mLで弱い収縮抑制作用を示した。

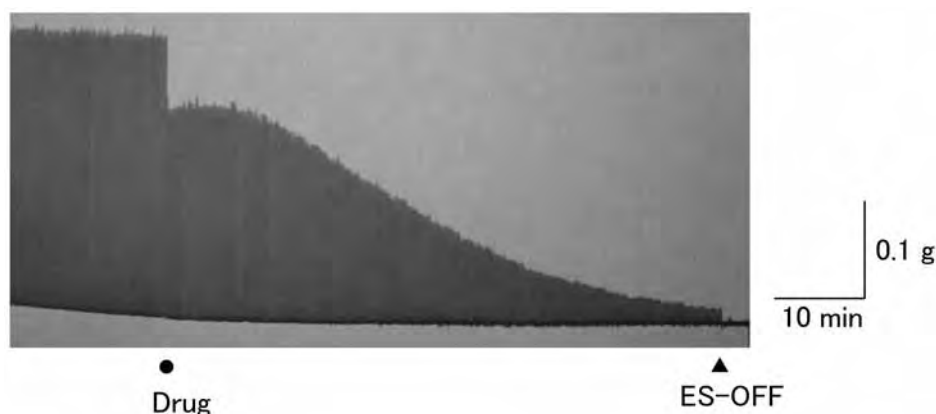


Fig.2 Typical recording of extract-induced twitch-inhibition in the isolated mouse vas deferens

Drug is the 50% methanolic extract prepared from *Paeonia lactiflora*. The extract of Bridal Icing, at 300 $\mu$ g/mL, was added to the bath at the point indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1Hz) was stopped 60 min after drug application.

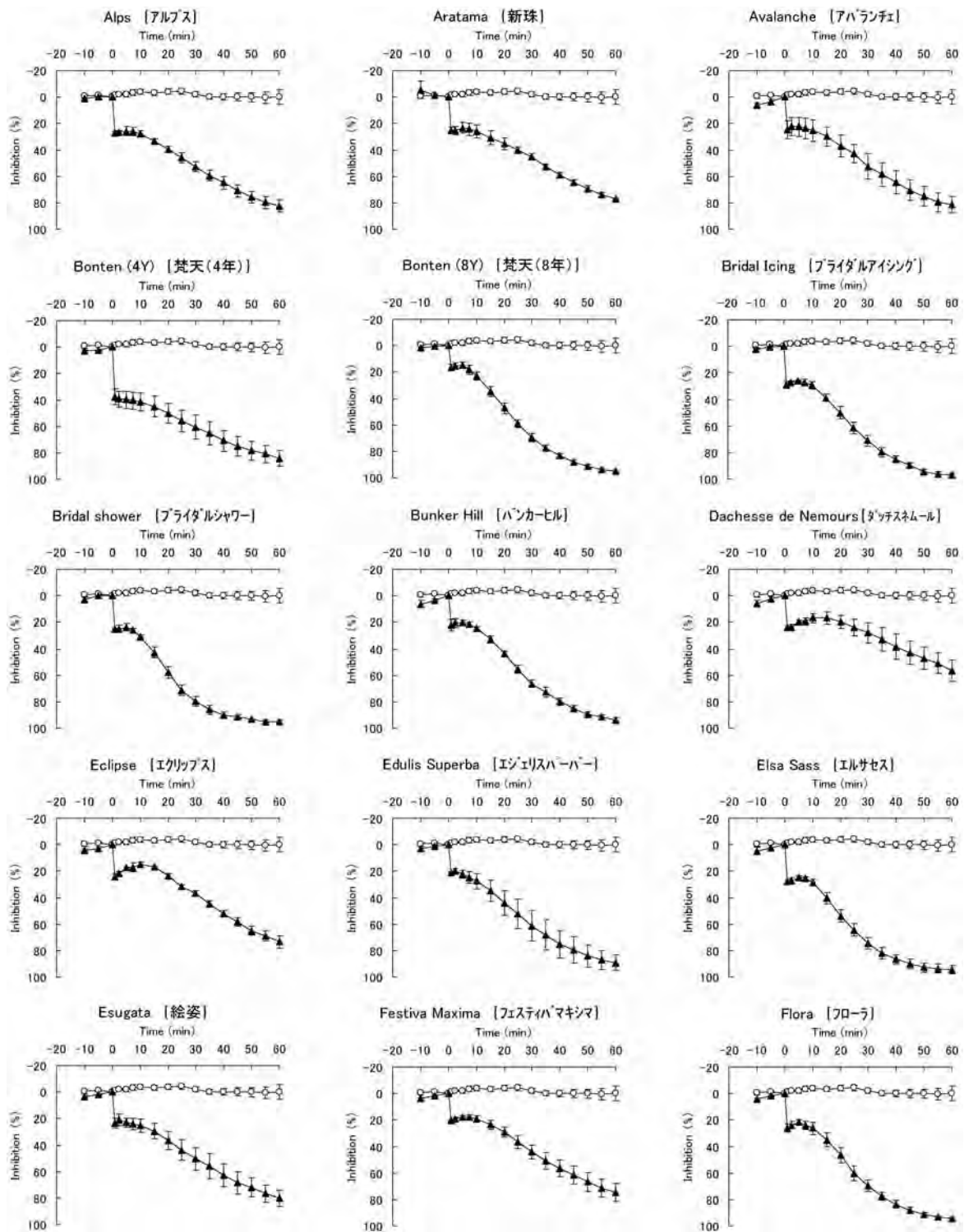


Fig.3-1 Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

○ : Control, ▲ : drug application at 300 μg/mL. Each point is presented as a mean ± S.E. of 3-5 experiments.



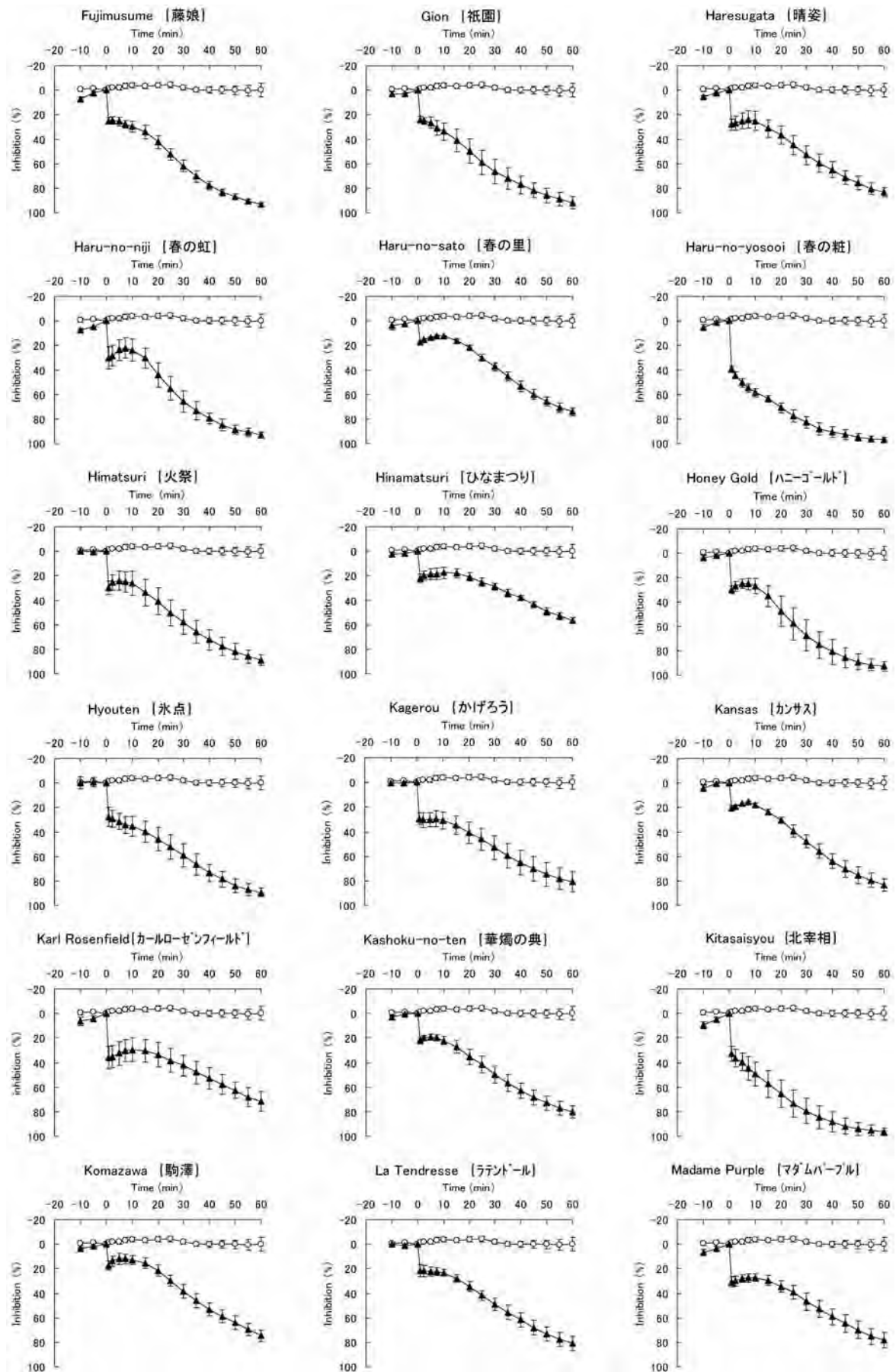


Fig.3-2 Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

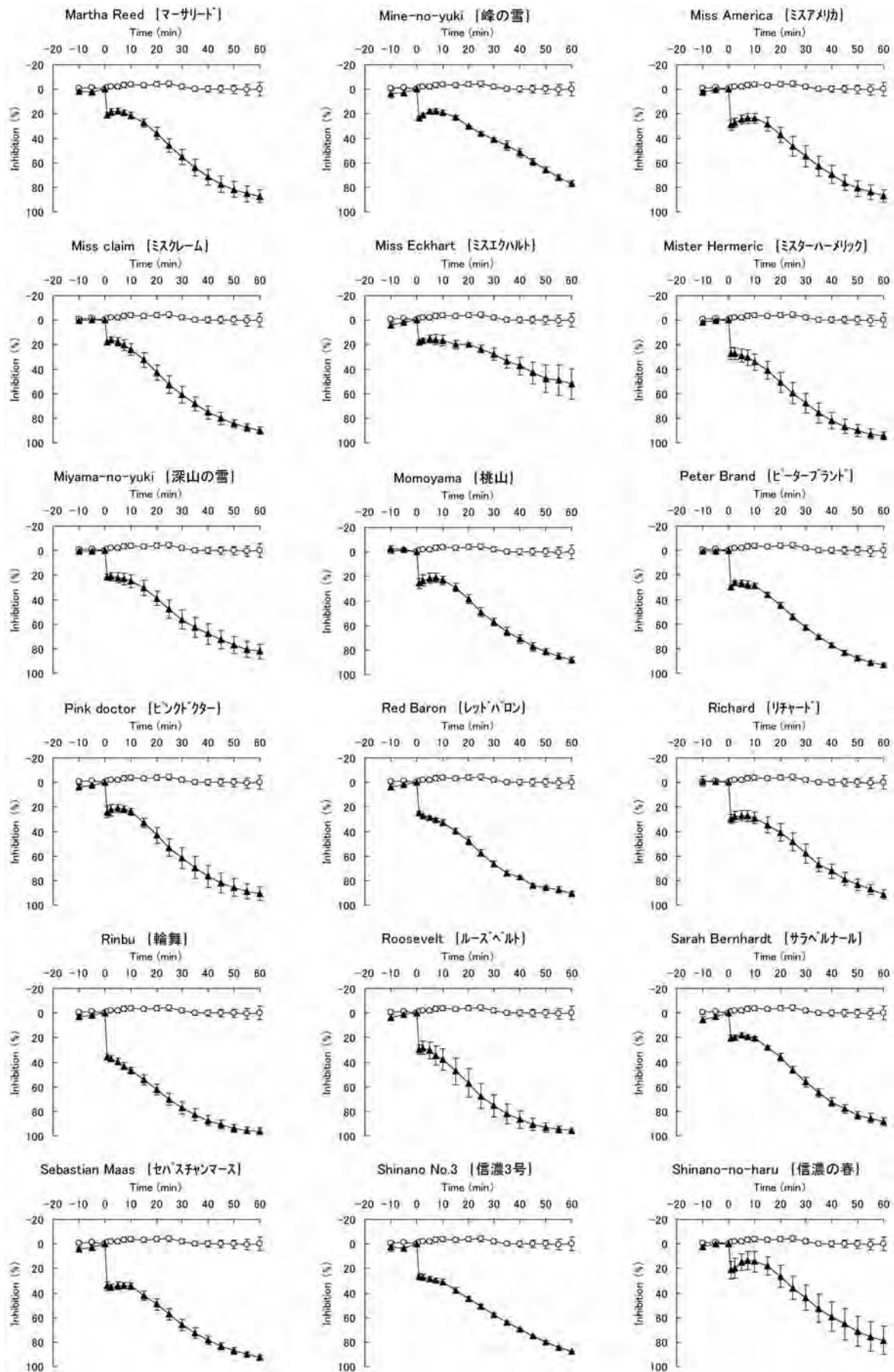


Fig.3-3 Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

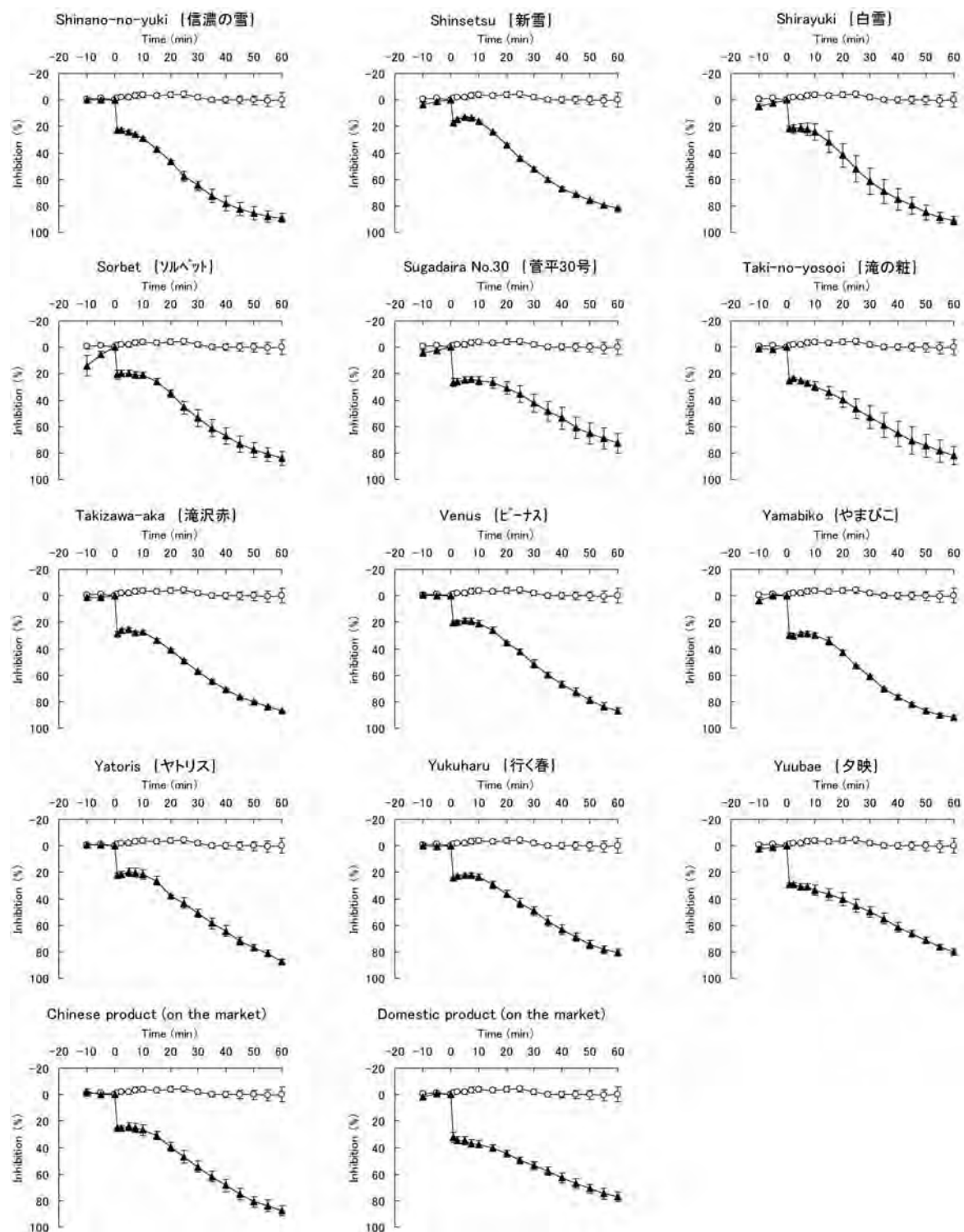


Fig.3-4 Effects of extracts of *Paeonia lactiflora* on the twitch response in the isolated mouse vas deferens



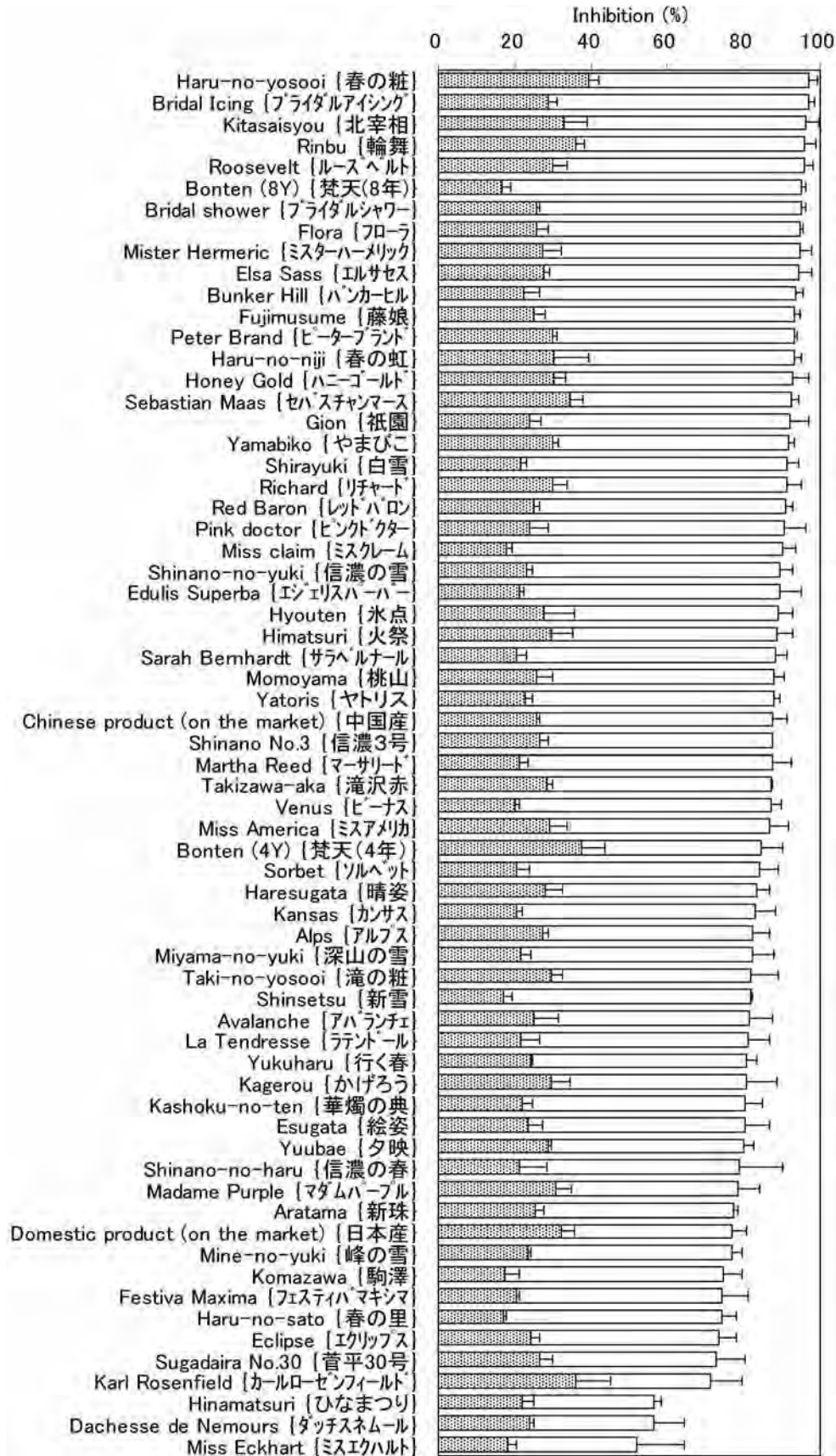
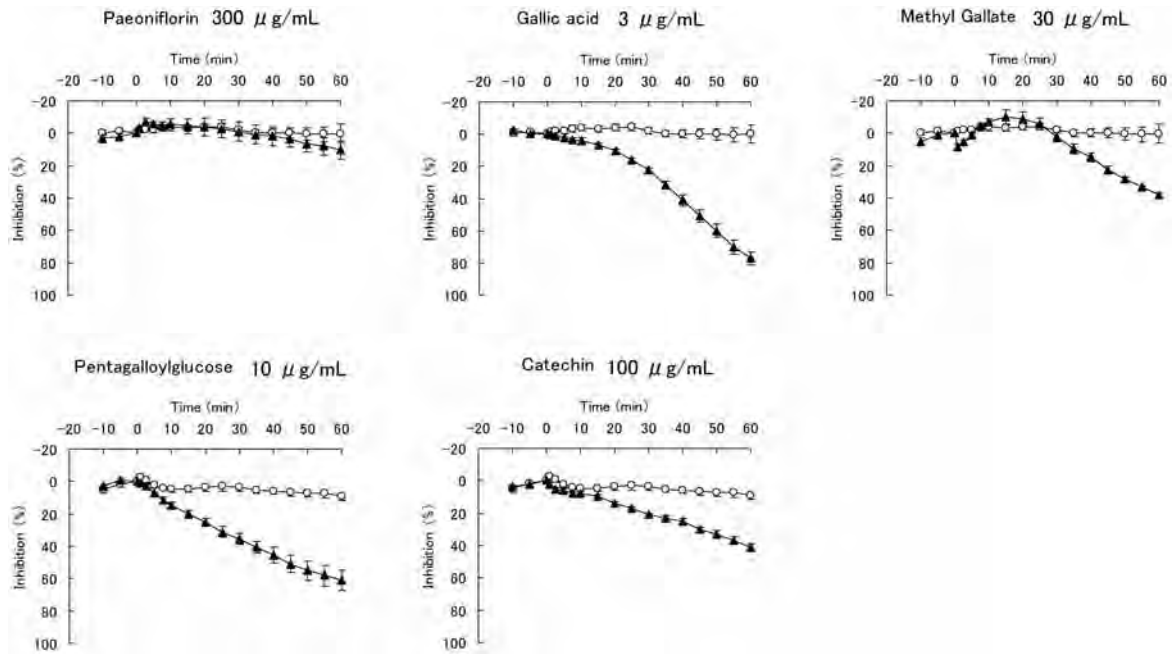


Fig.4 Twitch-inhibitory potency of extracts of *Paeonia lactiflora* in the isolated mouse vas deferens

Shaded column and open column indicate twitch-inhibition (%) at 1 min and 60 min after the application of drug (300 μg/mL), respectively. Each column is presented as a mean ± S.E. of 3-5 experiments.



**Fig.5** Effects of paeoniflorin, gallic acid, methyl gallate, pentagalloylglucose and catechin on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

○: Control, ▲: drug application. Pentagalloylglucose and catechin were dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean  $\pm$  S.E. of 3-5 experiments.

## 考 察

腹痛の原因のひとつとなる消化管平滑筋の異常収縮を抑制するために鎮痙薬が用いられる。多くの鎮痙薬は、アセチルコリンなどの収縮薬による平滑筋収縮を抑制する作用を有している。モルモット回腸を用いた実験で、シャクヤクエキスは、外来性に与えたアセチルコリンや高濃度カリウムによる平滑筋収縮に対して抑制作用をほとんど示さないことが報告されている<sup>10)</sup>。一方で、シャクヤクエキスは、モルモット回腸の電気刺激収縮を抑制することから、副交感神経の節後線維終末からのアセチルコリンの遊離を抑制する作用を有するといわれている<sup>10-11)</sup>。

回腸と精管は、神経終末部に作用する薬物の評価によく用いられる。モルモット回腸は電気刺激によって、副交感神経の終末部からアセチルコリンが遊離し、twitch収縮反応が生じるとされている。一方、マウス精管の電気刺激によって、交感神経の終末部からノルアドレナリンとATPが遊離し、twitch収縮反応が生じるとされている<sup>12)</sup>。

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、 $\alpha_2$ アドレナリン受容体、 $A_1$ -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<sup>12-13)</sup>。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<sup>12)</sup>。

今回のマウス精管を用いた電気刺激によるtwitch収縮反応は、活動電位の発生・伝導を抑制する高選択的 $Na^+$ チャ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たことから、神経刺激性の収縮反応といえる。選択的 $\alpha_2$ -アドレナリン受容体活性薬であるクロニジンや選択的 $A_1$ -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は強いtwitch収縮抑制作用を示した。少なくともこれらの薬物と同様の作用を有する物質は今回の実験で検出できると考えられる。

今回のマウス精管を用いた電気刺激実験で、シャクヤクエキスは、 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、twitch収縮抑制作用を示した。エキス適用の初期に、ある程度抑制が一気に進んだ後、抑制の減弱がみられる場合とほとんどみられない場合があり、さらにその後、徐々に進行する収縮抑制がみられた。1分後の抑制率と60分後の抑制率についてのエキスの効力順は同じではなかった。複数の成分がtwitch収縮反応に影響を及ぼしているものと思われる。

モルモット回腸を用いた実験において、シャクヤクエキス(熱水抽出エキス, $300\mu\text{g}/\text{mL}$ )によるtwitch収縮抑制作用は、1分で最大に達し、その後、徐々に減弱し、数分間で抑制作用が消失することが報告されている<sup>12)</sup>。今回のマウス精管を用いた実験で適用1分前後にみられた発現の早いtwitch収縮抑制作用は、モルモット回腸において発現が早く持続性の短いtwitch収縮抑制作用との間に、作用成分と作用機序の面で関連性があるかもしれない。シャクヤ



クエキスは、副交感神経と交感神経の違いには関係しない発現の早い神経伝達抑制作用を有している可能性があると思われる。

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おり<sup>11)</sup>、今回の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。

没食子酸、ペンタガロイルグルコース、没食子酸メチル及びカテキンは、徐々に進行するtwitch収縮抑制作用を示したが、エキスの場合と異なり、適用初期に一気に進む抑制はほとんどみられなかった。シャクヤクには没食子酸の構造を分子内にもつ加水分解性タンニンであるガロタンニン類の存在が知られている。ペンタガロイルグルコースは糖に没食子酸が結合したガロタンニン類のひとつである。ガロタンニン類やカテキン類は、徐々に進行するtwitch収縮抑制作用に少なくとも一部は関与しているものと考えられる。

今回、比較的強いtwitch収縮抑制作用したシャクヤクエキスとしては、60分後の抑制率では、春の粧、ブライダルアイシング、北宰相などのエキスであり、適用1分後の抑制率では、春の粧、梵天（4年）、カールローゼンフィールドなどのエキスであった。大和シャクヤクの代表的な品種である梵天のエキスでは、2つのエキス（栽培年数：8年と4年）で抑制作用の時間的変化に違いがみられ、特に適用1分後の抑制率では大きな差がみられた。

シャクヤクエキスの中で電気刺激収縮抑制作用が比較的強かったシャクヤク品種は、鎮痛・鎮痙作用の面で有効性が高い可能性があるかと推察される。今後、植物の生育環境の違いによって薬効が変動する可能性を考慮に入れて、新たに掘り出して調製するエキスを用いて有効性の再評価などを行う予定である。

## 文 献

- 1) 第十五改正日本薬局方解説書，廣川書店（2006），D-324
- 2) 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F<sub>M</sub>100との併用効果，薬学雑誌，**89**，879-886（1969）
- 3) 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
- 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) 田村隆幸，田中彰雄，内 正人，村上守一：シャクヤクの栽培研究—8年間栽培したシャクヤクの品質について—，富山県薬事研究所年報，**37**，57-63（2010）
- 6) 小松かつ子：富山県ブランド生薬の開発 遺伝的・成分的多様性の解析，平成21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 富山大学，p.17-21（2010）
- 7) Wu Yuqiu, Zhu Shu, 小松かつ子，村上守一，田中彰雄，柴田敏郎：芍薬の成分的多様性の解析，第27回和漢医薬学会学術大会要旨集，p.64（2010）
- 8) 松永孝之，横田洋一，田村隆幸，田中彰雄：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）
- 9) 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）
- 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) Kawasuji T.,Koike K.,Saito H.: Effects of optical isomers of ephedrine and methylephedrine on the twitch response in the isolated rat vas deferens and the involvement of  $\alpha_2$ -adrenoceptors, J.Smooth Muscle Res.,**32**，155-163（1996）

# シャクヤクの品種別成分分析 (I)

横田 洋一, 高橋 敏, 寺崎 さち子, 田村 隆幸, 松永 孝之

## Comparative study on the determination of constituents in the root of various cultivars of *Paeonia lactiflora* Pallas (I)

Yoichi YOKOTA, Hitoshi TAKAHASHI, Sachiko TERASAKI, Takayuki TAMURA and Takayuki MATSUNAGA

### 要 約

富山県薬用植物指導センターで栽培されている様々なシャクヤク品種 (*Paeonia lactiflora* Pallas) の根の品質評価を行うため, 主要成分 10 種 (没食子酸, オキシペオニフロリン, カテキン, 没食子酸メチル, アルビフロリン, ペオニフロリン, ペンタガロイルグルコース, 安息香酸, ベンゾイルペオニフロリン, ペオノール) の迅速定量法について, フォトダイオードアレイ検出器付き超高速液体クロマトグラフ (UPLC/PDA) を用いて検討した. ACQUITY UPLC HSS C18 カラム及び 0.1% リン酸とアセトニトリルのグラジエント溶出法を用いることで, これらの物質と内標準物質のケルセチンは 3 分以内で分離した. 本法を用いて切り花用 60 品種及び薬用品種 2 種のシャクヤク根に含まれる 10 成分の定量を行ったところ, 60 品種中の成分含量にはばらつきが見られた. さらに薬用優良品種とされる梵天の 10 成分総含量は比較的低い値を示した.

### Summary

To evaluate the roots of various cultivars (*Paeonia lactiflora* Pallas) cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance, rapid determination method of ten major constituents, gallic acid, oxypaeoniflorin, catechin, methylgallate, albiflorin, paeoniflorin, pentagalloylglucose, benzoic acid, benzoylpaeoniflorin and paeonol was investigated by using ultra-performance liquid chromatograph / photo-diode-array detector (UPLC/PDA). These substances and quercetin (internal standard) were separated within 3 minutes by using ACQUITY UPLC HSS C18 column with a gradient elution system composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid in water. Ten constituents contained in sixty cultivars for cut flowers and two medicinal ones were determined by this method. As a result, it was found that each content in sixty cultivars varied, respectively. Furthermore, the sum total content of ten constituents in Bonten known as a high quality cultivar, showed the comparatively low value.

キーワード: シャクヤク, 切り花品種, 主要 10 成分,  
フォトダイオードアレイ検出器付き超高速液体クロマトグラフ

Key words: *Paeonia lactiflora* Pallas, cultivars for cut flowers, ten major constituents,  
ultra-performance liquid chromatograph/photo-diode-array detector

### 緒 言

日本薬局方のシャクヤクは, *Paeonia lactiflora* Pallas の根と規定されており, 多くの漢方処方に配合される重要な生薬である<sup>1)</sup>. 今回, 富山県薬用植物指導センターで栽培されている多くの品種のシャクヤクについて, 品種別に薬理試験を行うことにより優良品種の選抜を行うこととなった. そこで, 栽培されているシャクヤク品種の理化学的品質を明確にするため, 分析法を検討した. シャクヤク成分については, ペオニフロリンなどのモノテルペン類やタンニン類が主成分とされ, これらについては多くの分析例が報告されている<sup>2-7)</sup>が, 日本薬局方では, ペオニフロリン

含量が 2.0% 以上と規定されているのみで, その他成分の規定はない<sup>1)</sup>. 薬理試験を裏付けるためには, ペオニフロリン以外にも多くの成分を把握しておくことが望ましい. なお, センターのシャクヤク成分については, これまで品種により, ペオニフロリンなど成分にばらつきが見られることが報告されている<sup>8-9)</sup>. そこで今回, 薬理試験に用いるため調製した 50% メタノールエキスについて, 主要な 10 成分の定量を行い, その品質を調査するとともに薬理試験結果との関連についても検討することとした. 短時間で多検体の測定を可能とするため, フォトダイオードアレイ検出器を装備した超高速液体クロマトグラフ (UPLC/PDA) を使用し, ペオニフロリンを含む 10 成分について迅速定量

法の検討を行った。

## 実験方法

### 試薬・試液

没食子酸 (GA) (ナカライテスク試薬特級), オキシペオニフロリン (OP) (PytoLab), カテキン (CA) : (+)カテキン水和物 (東京化成試薬), 没食子酸メチル (MG) (和光純薬試薬特級), アルピフロリン (AL) (和光純薬生薬試験用), ペオニフロリン (PA) (日本薬局方標準品), ペンタガロイルグルコース (PG) : 1, 2, 3, 4, 6-ペンタガロイル-β-D-グルコピラノース (Toronto research chemicals), 安息香酸 (BA) (和光純薬試薬特級), ベンズイルペオニフロリン (BP) (PytoLab), ペオノール (PE) (和光純薬局方生薬試験用), ケルセチン (QE) (東京化成試薬特級), アセトニトリル (関東化学 HPLC 用), 蒸留水 (関東化学 HPLC 用), メンブランフィルター (ADVANTEC, 13HP020AN), ろ紙 (ADVANTEC, No.2)

### 検体

富山県薬用植物指導センターで栽培された切り花用シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas) 60 品種及び比較対照として薬用種の梵天 (4 年物) 及び北宰相 (8 年物) を用いた。切り花の品種名は前報<sup>10)</sup>に記載した。また市販品シャクヤクとして、中国産 (ウチダ和漢薬) 及び日本産 (ツムラ) を用いた。

### シャクヤクの調整加工法

掘り取ったシャクヤクの根はシャワーノズルのジェット水流で洗浄を行い、約3ヶ月、日陰で風乾した後、直径1.0 cm以上の根をとり、真空凍結乾燥を行った後、Cyclotec™ 1093 で粉末とした。掘り取り後水洗浄したものを photo.1 に、凍結乾燥したものを photo.2 に示す。



Photo.1 Peony root which was dug up and washed

### エキス製造法

シャクヤク末60gに水/メタノール混液 (1:1) (50%メタノールと略) 600mLを加え、1 時間還流抽出した後、ろ紙を敷いたブフナー漏斗で減圧ろ過した。残留物は少量の50%メタノールで洗浄し、ろ液は100mL近くになるまで40℃以下で減圧濃縮した後、真空凍結乾燥を行い、エキスIを得た。ろ紙上の残留物を取り、同様の操作を行い、エキスIIを得た。エキスI及びIIの質量を測定した後、良く混合し乾燥剤 (シリカゲル) を入れたアルミ包装に密封保存した。

### 成分定量法

50%メタノールエキス約0.1gを精密に量り、50%メタノールを加えて溶かし、正確に50mLとした。この液5mLを正確にとり、内標準溶液 (ケルセチン60.0mgをメタノール溶かし500mLとしたもの) 2mLを正確に加え、水2mL及び50%メタノール1mLを加え、良く振り混ぜ、メンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

別に没食子酸、オキシペオニフロリン、カテキン、没食子酸メチル、アルピフロリン、ペオニフロリン、ペンタガロイルグルコース、安息香酸、ベンズイルペオニフロリン、ペオノールをそれぞれ4.1, 4.0, 7.6, 8.1, 20.0, 80.8, 20.1, 4.0, 3.4, 0.9 μg/ml及び内標準物質24.0 μg/mlを含有する50%メタノール溶液を標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液のそれぞれ0.5 μLについて、以下の条件で試験を行い、内標準物質のピーク面積に対する各ピークの面積の比を求め、エキス中の含量を求めた。さらに、エキス収率を用いて生薬中の含量に換算した。なお、ピークの確認には溶出時間及び吸収スペクトルを用いた。

### UPLC条件

機器はWaters社製のUPLC H-Class, 検出器はフォトダイオードアレイ検出器, 検出波長は232, 280及び257nmを用



Photo.2 Freeze dried peony roots

いた。カラムはWaters社製の ACQUITY UPLC HSS C18 (粒径1.8  $\mu$  m, 2.1  $\times$  50 mm), カラム温度は25 $^{\circ}$ C, 移動相は薄めたリン酸 (1 $\rightarrow$ 1000) (A) 及びアセトニトリル (B) について下記のグラジエント溶出を行った。なお, 曲線 No. は Waters 社が設定したグラジエント曲線である。

時間min	流量mL/min	%A	%B	曲線
0	0.5	98	2	
1.1	0.5	75	25	4
2.5	0.5	10	90	6
3.0	0.5	0	100	6
3.2	0.5	0	100	6
3.4	0.5	98	2	6

## 結果及び考察

### 1. エキス調製法

エキスの調製法については, 日本薬局方シャクヤクの定量法の抽出法<sup>1)</sup>を参考に作成したが, 操作上の能率化を考慮し, 抽出液は薄めたメタノール (1 $\rightarrow$ 2) に替え, 水/メタノール混液 (1:1) を50%メタノールとして用いた。また, 抽出時間については, 市販品の粉末を用いて, エキス収率, ペオニフロリン及びアルピフロリン含量並びにDPPH還元能を指標に, 30分及び1時間を比較したところ, いずれも1時間抽出が若干上回ったため, 抽出時間は1時間とした (Fig.1)。

富山県薬用植物指導センターで栽培された切り花種及び薬用品種のエキス収率は20.0~58.3%と大きなばらつきが見られ, 平均収率は40.7%であった。なお, 市販品 (中国

及び日本産) はそれぞれ46.5%及び43.3%であった。

### 2. 成分定量法

今回, 試薬・試液の項に示した10成分について, UPLC H-Class (Waters) を用い, 迅速同時定量法について検討を行った。UPLC用カラムについては, 径2.1mm, 長さ50mmのACQUITY UPLC HSS C18及びBEH C18を使用し, 種々のグラジエント条件を検討した。その結果HSS C18カラムを使用し, 成分定量法で示したグラジエント条件で, ほぼ3分以内で10成分の同時分析が可能であった。

検出波長については, オキシペオニフロリンは257nm, 没食子酸, カテキン及び没食子酸メチルは280nmを選択した。これら4成分は試料中では近接するピークの影響を受けやすいため, 特異性を高める目的でそれぞれの吸収極大に近い波長を選択した。なお, その他成分は232nmを用いた。Fig.2に検出波長232nmにおける標準品のクロマトグラム及び各成分の吸収スペクトルを示した。また, 標準溶液の10成分のシステム再現性 (n = 6の相対標準偏差) はいずれも注入量0.5  $\mu$ Lで1.5%以下であり, 良好な再現性を得た。いずれの検量線もほぼ原点を通り良好な直線性を示した (Fig.3)。従って, 今回設定した方法により, シャクヤク中の10成分の同時定量が迅速に精度よくできることが分かった。

### 3. 品種別定量試験

確立した方法を用いて薬用植物指導センターで栽培した60種の切り花品種 (*Paeonia lactiflora* Pallas), 薬用品種2種 (梵天, 北宰相) の根及び市販品シャクヤク (日本, 中国) の50%メタノールエキスの10成分の含量を求めた

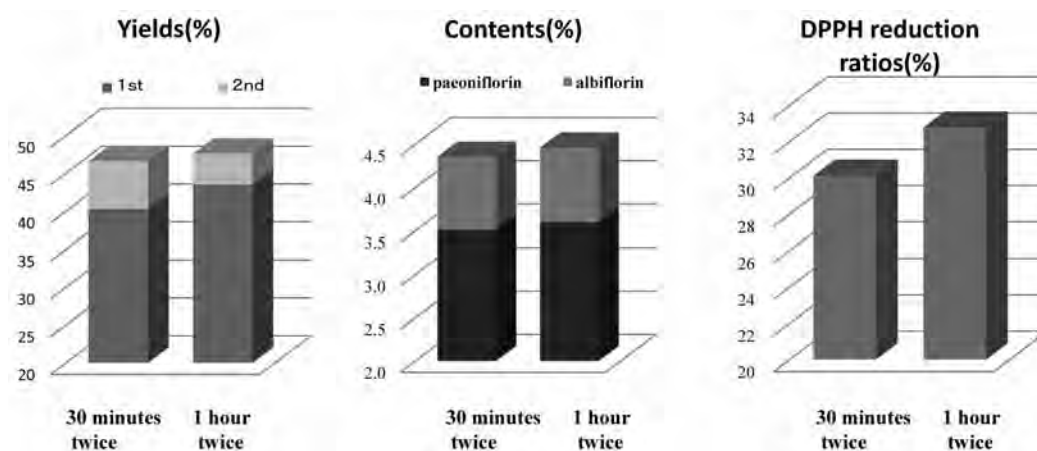
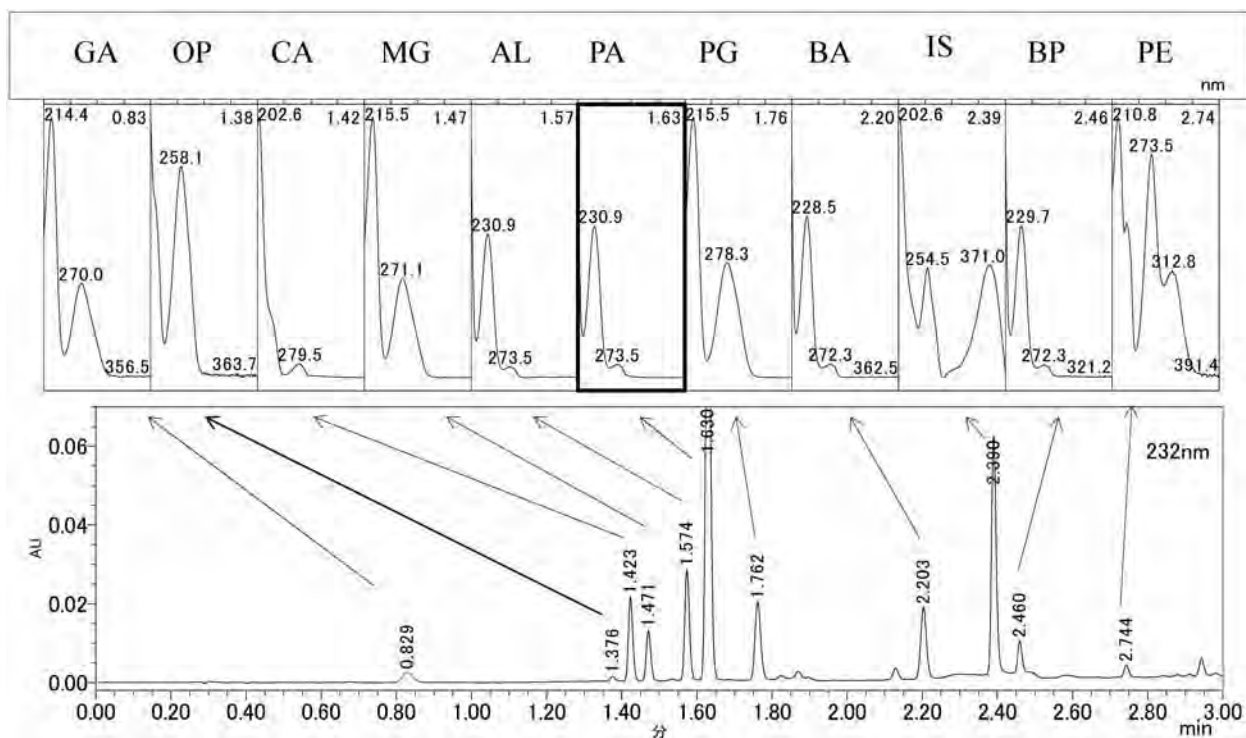


Fig.1 Optimization of the extraction time



**Fig.2 Chromatogram and UV spectrum of standards**

GA:gallic acid,OP:oxypaeoniflorin,CA:catechin,MG:methylgallate,AL:albiflorin,PA:paeoniflorin,PG:pentagalloylglucose,BA:benzoic acid, IS:quercetin ,BP:benzoylpaeoniflorin ,PE:paeonol

( $n = 2$ の平均値)．さらにエキス収率を用いて、生薬中の含量に換算した. Table 1に切り花60品種の平均含量(%), 標準偏差, 相対標準偏差(%), 最小及び最大含量, 並びに薬用品種及び市販品の含量を示した．

その結果, 各成分とも切り花品種間で大きなばらつきを示したが, その中でペオニフロリン及び総含量については, 比較的ばらつきが小さかった. なお, ペオニフロリン含量はいずれの切り花品種も日局規格の2.0%以上を満たした<sup>1)</sup>. 薬用種の梵天のペオニフロリン含量は切り花品種と比較しては最小, 北宰相は最大値に近い値を示した. 総含量についても同様の傾向を示した. 代表的な薬用種とされている梵天のペオニフロリン含量が低いことはこれまでも報告があるが<sup>11)</sup>, 10成分の総含量についても低いことが今回の実験の結果判明した. 10成分以外の成分については今回明らかではないため, 今後の検討課題である. 北宰相については, ペオニフロリン含量が高い品種として育種されたものであり, このことは今回の結果からも裏付けられた. 今回入手した市販のシャクヤクでは, 中国産及び日本産ともペオニフロリン及び総含量は栽培品種の平均的な値に近い値を示した.

その他成分については, 北宰相ではアルビフロリンは不検出, カテキンは高含量という, 特徴的な性質を示した. ま

た, 切り花品種及び薬用種の没食子酸メチル含量は, 市販品より高い値を示した. このことは今のところ薬用植物指導センターでの栽培の特徴ともいえるが, 他の市販品や異なる栽培年度など今後詳細な検討の必要がある.

参考までに薬用種梵天及び市販日本産の232nmにおけるクロマトグラムをFig.4に示す.

次に, 成分間の関連を調べたところ, ペンタガロイルグルコースは没食子酸メチル含量と強い相関を示し, このことから両者の生合成には何らかの関連があることが示唆された (Fig.5).

前報<sup>10)</sup>において, シャクヤクエキスには抗酸化作用が認められ, ペンタガロイルグルコース, 没食子酸などポリフェノール化合物の寄与が示唆された. そこで, ポリフェノール化合物であるペンタガロイルグルコース, 没食子酸メチル, 没食子酸及びカテキンの生薬中の合計含量とDPPHの還元能について相関を求めたところ, 有意な相関を認め, 抗酸化作用にこれらの関与が示唆された (Fig.6). しかし, 相関係数がそれほど大きくないことから, 抗酸化作用にはこれら以外の成分の関与も考えられた. なお, 他の薬理試験結果についても強い関連を示唆する成分が得られており, 今後の展開が期待できる.

これまで, シャクヤク根の成分分析については種々の報



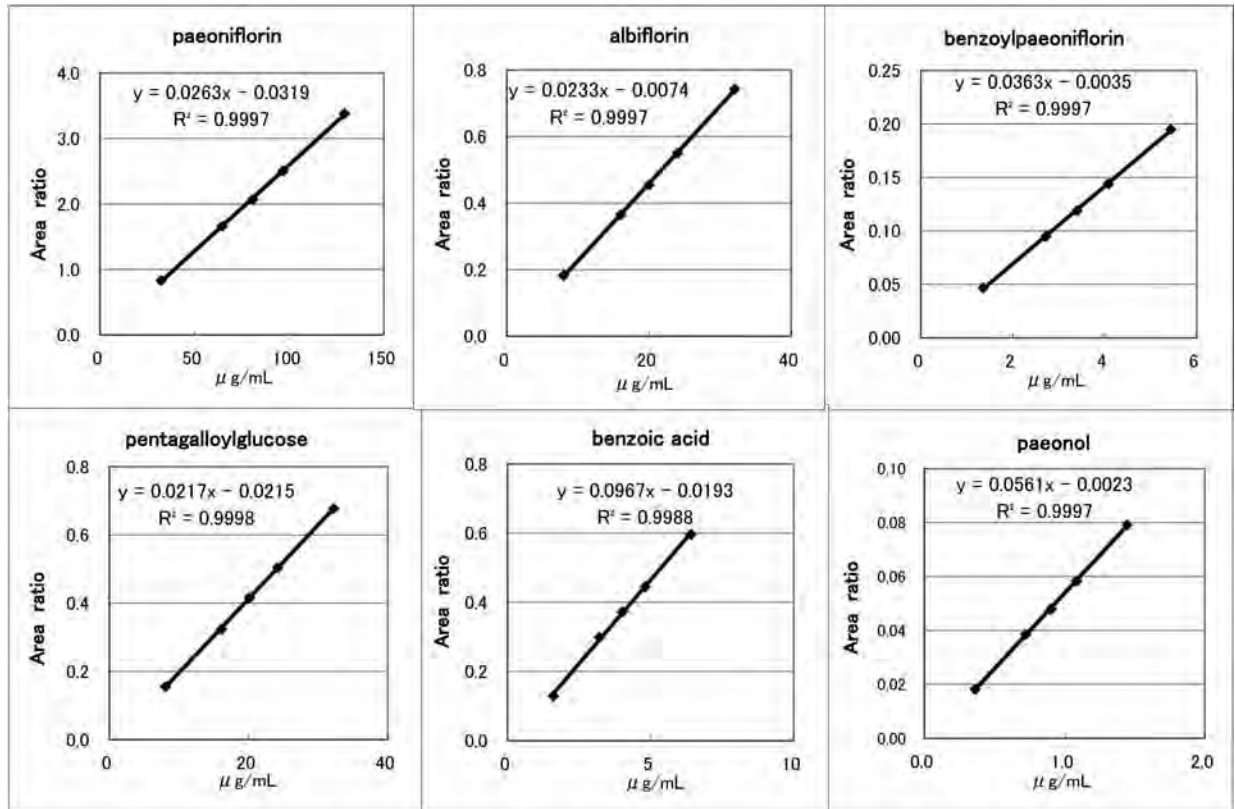


Fig.3-1 Calibration curves (1)

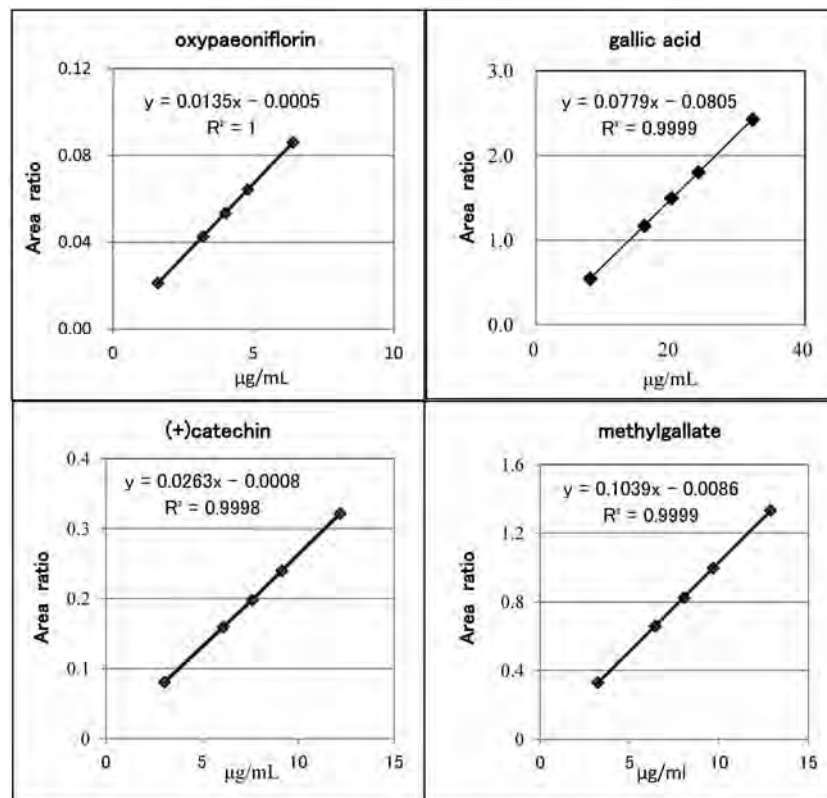
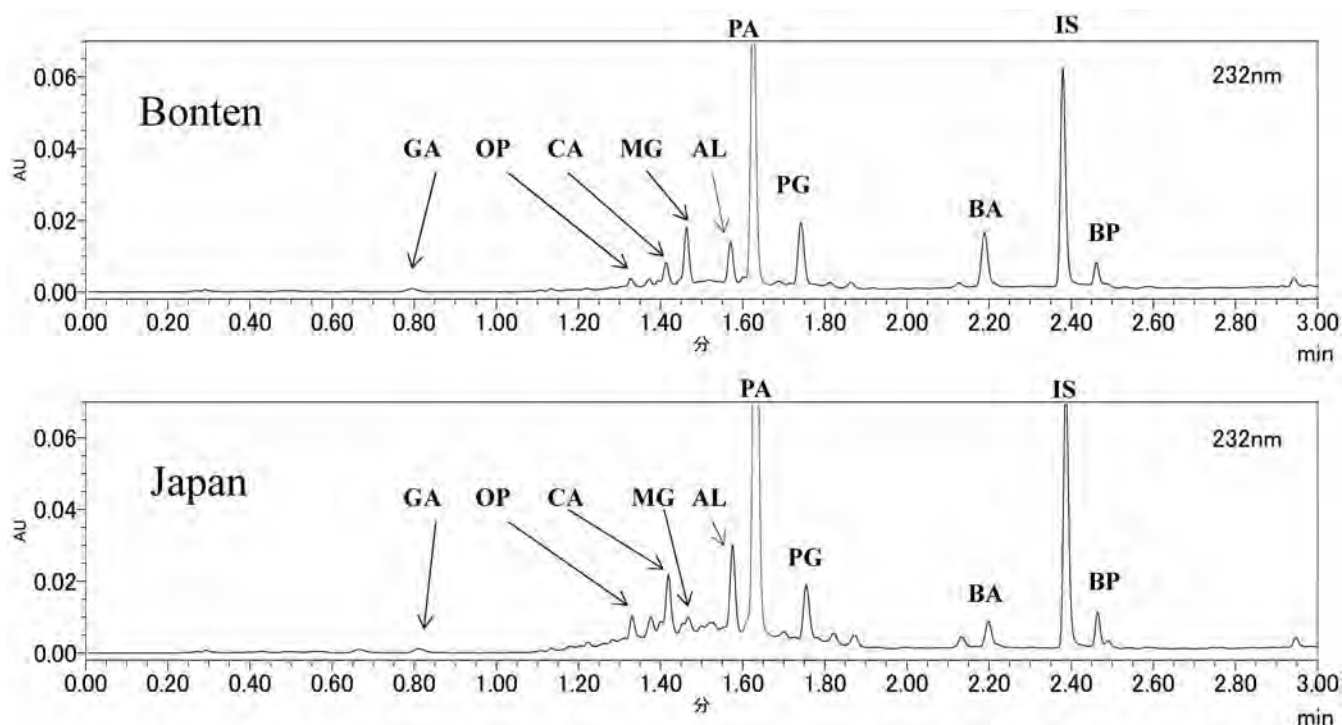


Fig.3-2 Calibration curves (2)

**Table 1** Contents(%) of constituents in peony roots cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance, and commercial peony roots

		Constituent	GA	OP	CA	MG	AL	PA	PG	BA	BP	PE	TOTAL
Toyama prefectural center for medicinal plant guidance	Cultivars (n=60)	AVG	0.07	0.15	0.11	0.39	0.34	3.13	1.18	0.04	0.06	0.002	5.47
		SD	0.03	0.08	0.08	0.17	0.41	0.73	0.45	0.01	0.03	0.007	1.27
		RSD(%)	49.3	52.0	74.4	43.4	118.7	23.2	38.1	23.6	53.1	332.5	23.3
		MIN	0.02	0.04	0.01	0.15	0.00	1.99	0.25	0.02	0.01	0.000	3.47
		MAX	0.17	0.38	0.47	0.89	1.61	5.10	2.49	0.08	0.15	0.037	9.60
	Medicinal cultivars	Bonten	0.03	0.15	0.10	0.33	0.28	1.96	0.59	0.11	0.09	0.000	3.65
		Kitasaisyo	0.03	0.55	0.69	0.40	0.00	5.25	0.83	0.02	0.16	0.000	7.93
Commercial peony roots	China	0.21	0.05	0.03	0.10	0.85	3.55	1.06	0.13	0.09	0.000	6.07	
	Japan	0.05	0.29	0.24	0.11	0.53	3.52	0.36	0.05	0.11	0.000	5.27	

GA:gallic acid, OP:oxypaeoniflorin,CA:catechin,MG:methylgallate,AL:albiflorin,PA:paeoniflorin,PG:pentagalloylglucose,BA:benzoic acid, BP:benzoylpaeoniflorin,PE:paeonol,AVG:average,SD:standard deviation,RSD:relative standard deviation,MIN:minimum,MAX:maximum



**Fig.4** Chromatograms of Bonten cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance, and the commercial peony root cultivated in Japan

GA:gallic acid,OP:oxypaeoniflorin,CA:catechin,MG:methylgallate,AL:albiflorin,PA:paeoniflorin,PG:pentagalloylglucose,BA:benzoic acid, IS:quercetin ,BP:benzoylpaeoniflorin

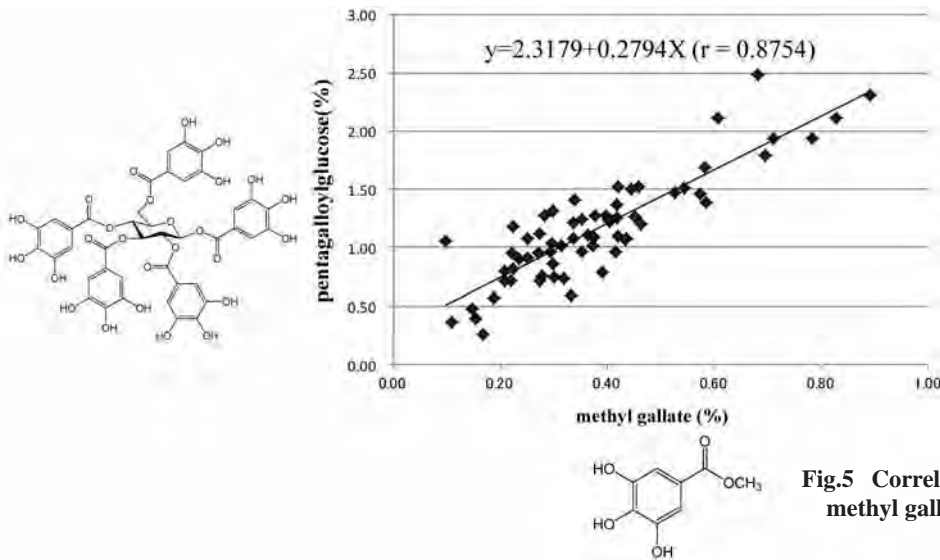


Fig.5 Correlation between pentagalloylglucose and methyl gallate contents in peony roots

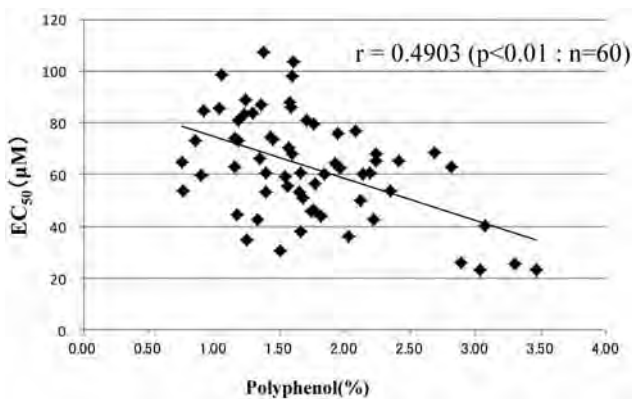


Fig.6 Correlation between polyphenol content and DPPH reduction ability  
Polyphenol=pentagalloylglucose+gallic acid+methyl gallate+catechin

告があるが、その多くは基原、調製加工、流通製品の判別等を目的とするものであり、品種と薬理作用との関連を目的とするものは見られない。今回は、薬用植物指導センターで栽培した切り花種60種の品種別薬理試験を行い、優良品種を選抜するにあたり、その裏付けを行うため10成分の定量を行った。その結果、切り花品種の中には代表的な薬用種である梵天の成分含量より多いものが多数見られた。また、薬理試験結果と関連性が示唆される成分も見出した。今後はより高分離な分析条件やその他の分析条件の使用により、さらに多くの成分についても分析を行い、薬理作用との関係について検討を行う予定である。

### 引用文献

- 1) 第十六改正日本薬局方解説書, 広川書店 (2011), D-324
- 2) 西澤 信, 山岸 喬, 野中源一郎, 西岡五夫, 芍薬中のガロタンニンの定量, 薬学雑誌104 (12) 1244-1250 (1984)
- 3) 池田憲廣, 福田智美, 城 尚信, 嶋田康男, 村上啓寿,

坂 正美, 吉川雅之, 芍薬の品質評価 (第1報) 高速液体クロマトグラフ法によるシャクヤク中のモノテルペン類の定量分析, 外部形態, 修治方法及び産地の異なる薬材の比較解析, 薬学雑誌116, 138-147 (1996)

- 4) Qiao Wang, Rongxia Liu, Hongzhu Guo, Min Ye, Changhong Huo, Kaishun Bi, Dean Guo, Simultaneous LC determination of major constituents in red and white peony root, Chromatographia 62, 581-588 (2006)
- 5) Song-Lin Li, Jing-Zheng Song, Franky F. K. Choi, Chun-Feng Qiao, Yan Zhou, Quan-Bin Han, Hong-Xi Xu, Chemical profiling of Radix Paeonia evaluated by ultra-performance liquid chromatography/photo-diode-array/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis 49, 253-266 (2009)
- 6) Shunjun Xua, Liu Yangb., Runtao Tianc, Zhengtao Wangd, Zhijun Liua, Peishan Xiec., Qianru Feng, Species differentiation and quality assessment of Radix Paeoniae Rubra (Chi-shao) by means of high-per-

formance liquid chromatographic fingerprint, Journal of Chromatography A, **1216**, 2163-2168 (2009)

- 7) 財団法人奈良県中小企業支援センター, 芍薬の品質鑑定方法, 特開2011-174899 (P2011-164899A) (2011. 9. 8)
- 8) 田村隆幸, 田中彰男, 内 正人, 村上守一, : シャクヤクの栽培研究 - 8年間栽培したシャクヤクの品質について -, 富山県薬事研究所年報, **37**, 57-64 (2010)
- 9) 小松かつ子, 富山県ブランド生薬の開発: 遺伝的・成分的多様性の解析, 和漢薬・バイオテクノロジー研究研究成果報告書 (平成21年度富山県受託研究), p17-21 (2010)
- 10) 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よる抗酸化作用, 富山県薬事研究所年報, **38**, 17-20 (2011)
- 11) 姉帯正樹, 佐藤正幸, 南収, シャクヤクの試作栽培, 道衛研所報, **57**, 61-64 (2007)

## 訂 正

平成22年度「医薬品成分及び指定薬物の迅速検出法の開発」, 誤: DPT → 正: DIPT

# 製薬企業の品質管理部門を対象とした外部精度管理

寺崎さち子，横田洋一，出町幸男

## External Quality Control for Laboratories of Pharmaceutical Companies in Toyama Prefecture

Sachiko TERASAKI, Yoichi YOKOTA and Yukio Demachi

### 要 約

平成21年度から23年度まで富山県内にある製薬企業の試験室を対象とし，外部精度管理事業を行った。試験品目及び試験項目は，市販製剤の高速液体クロマトグラフィーによる定量，薄層クロマトグラフィーによる確認，製剤均一性又は溶出性，並びに医薬品原料の純度試験及び融点で，各試験室で可能な試験について報告を求めた。

各試験室の結果はZスコア値に変換し評価した。その結果，3年間の事業を通じ，高速液体クロマトグラフィー，薄層クロマトグラフィー及び融点の試験は参加試験室の約95%以上が評価基準内（ $|Z| < 3$ ）であったが，8試験室が不満足と判定された。

### Summary

We conducted an external quality control for laboratories of pharmaceutical companies in Toyama Prefecture, from 2009 to 2011. Test samples were liquid or solid preparations intended for oral administration, and active substances. Each laboratory participated in the study by submitting results of assay by high-performance liquid chromatography, identification by thin-layer chromatography, uniformity of dosage units, dissolution, and melting point.

Each result was converted to a Z-score, and laboratory performance was evaluated by a Z-score. As a result, in 3 years, more than 95% laboratories satisfied  $|Z| < 3$  with assay by high-performance liquid chromatography, identification by thin-layer chromatography, melting point, but eight labs were judged to be unsatisfactory.

キーワード：外部精度管理，精度管理調査，Zスコア

Key words：External quality control, Proficiency testing, Z-score

平成17年度の改正薬事法の全面施行により医薬品の完全委受託製造が可能となって以降，富山県内にもその動きが盛んであり，県内医薬品製造企業の受託生産額は伸びると共に競争も激しくなっている。今後もその生産額を拡大し維持していくには，製造技術だけでなく原料受入，生産工程及び出荷判定のそれぞれの段階での試験検査の信頼性を高め，製造から出荷までの一貫した工程を高い技術力でやっていることを示す必要がある。その一環として，富山県薬業連合会との共同事業として，加盟している医薬品製造企業の品質管理部門を対象とし外部精度管理を実施し，県内医薬品製造企業の試験検査能力の調査及び技術指導を行う分析データ信頼性確保事業を平成21年度から実施した。

品質管理部門は原材料の受入試験，製造工程のバリデーション及び製品の適否試験を行う極めて重要な部門である。そのため各試験室ではGMP省令に適合したシステム

に従い試験を行っているが，その分析データの信頼性に関して第三者による比較検証が実施されたことはない。このような比較検証は，環境及び食品分野の試験検査機関では外部精度管理が行われているが，製薬企業は試験品目及び試験項目が各社異なるため統一した試験方法を行う機会はない。そこで，薬事研究所で試料及び試験方法を選定し，薬業連合会で募った参加者に試料等を配布した。集まった結果の集計及び解析は当所で行い，結果報告会において参加企業への報告を行った。

### 1. 調査方法

対象は富山県薬業連合会に加盟する県内製薬企業約60社の品質管理部門の試験室とし，試験項目を記載した実施要領と共に参加希望を募った。平成21年度から23年度までの各年度の試験品目，試験項目，試験法，試験手順及び参加企業数は表1に示す。



参加した医薬品製造企業は、平成21年度は58社、平成22年度は45社、平成23年度は48社であった。

21年度はHPLCによる定量試験のみであったが、これに加え22年度は製剤のTLC及び製剤均一性試験、23年度は製剤の製剤均一性試験及び溶出試験、医薬品原料のTLC及び融点を試験項目とした。HPLCによる定量は必須項目であるが、他は自社の試験室の試験設備に応じて試験項目を選択してもらった。

試料については、平成21年度は同一ロットのアセトアミノフェン0.08mg/mL及びカフェイン0.17mg/mL含有の小児用内服液剤を均一に混合した後、分注したものを試料として配布した。22年度のウルソデオキシコール酸錠及び23年度のクロルフェニラミンマレイン酸塩錠は、同一ロットの製剤を試料とした。

標準物質、TLC板のほか、試験室に常備されていないと思われる試薬については一括して購入及び小分けをし、参加企業には実施説明会において実施要領と共に配布した。

平成22年度及び23年度の試験方法は日本薬局方医薬品各条に従ったが、平成21年度の小児用内服液剤は以下の試験方法を当所で作成した。

試料約2.5gを精密に量り移動相で希釈し正確に50mLとした液5mLを正確に量り、内標準溶液（グアイフェネシン0.150gを正確に量り、移動相を加えて正確に200mLとした液）5mLを正確に加え、さらに移動相を加えて正確に50mLとする。この液をフィルターでろ過し、初めのろ液5mLを除き、次のろ液を試料溶液とする。乾燥したアセトアミノフェン約50mg及びカフェイン標準品約10mgを精密に量り、移動相を加えて溶かし正確に100mLとし標準原液とする。標準原液5mLを正確に量り、内標準溶液5mLを正確に加え、移動相を加えて正確に50mLとし標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液10 $\mu$ LずつをHPLCで分析する（ $n=3$ ）。なお1回試験後に1週間以上の間を置き、試料の調製と標準溶液の調製からもう一度試験を行う。HPLC条件は検出器：紫外吸光光度計（測定波長：273nm）、カラム：ODSカラム（4.6mm $\times$ 150mm, 5 $\mu$ m）、カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度、移動相：薄めたリン酸（1 $\rightarrow$ 1000）/メタノール混液（3：1）、流量：カフェインの保持時間が約6分、システムの性能：標準溶液10 $\mu$ Lにつき、アセトアミノフェン、カフェイン、グアイフェネシンの順に溶出し分離度は3.0以上、システムの再現性：標準溶液10 $\mu$ Lにつき試験を6回繰り返すとき、アセトアミノフェン及びカフェインの内標比の相対標準偏差は1.0%以下とした。

平成22年度は、日本薬局方医薬品各条ウルソデオキシコール酸錠のうち製剤均一性試験、確認試験及び定量を試験項目とした。製剤均一性試験は含量均一性試験である

が、質量偏差試験についても同時に報告を行ってもらった。定量法は $n=3$ とし、システムの性能の分離度8以上がカラムの種類によっては達成困難であることから、5以上に引き下げた。

平成23年度は、日本薬局方医薬品各条クロルフェニラミンマレイン酸塩の確認試験及び融点、日本薬局方医薬品各条クロルフェニラミンマレイン酸塩錠の製剤均一性、溶出性及び定量、USPプレドニゾン錠の溶出性を試験項目とし、定量法は $n=3$ とした。ただし局方各条クロルフェニラミンマレイン酸塩錠の製剤均一性試験は含量均一性試験であるが、操作の煩雑さから質量偏差試験に変更した。

なおクロルフェニラミンマレイン酸塩錠の規格93.0 $\sim$ 107.0%を超えた試験室で再試験を希望するところには、再度、試料を配布し再試験の結果を報告とした。また、システムの性能にある内標準物質とクロルフェニラミンの溶出順が逆になった試験室もあったが、これらを含めてデータ処理を行った。

試料配布後、約1ヶ月半までに報告をしてもらった。全データのうち繰り返しを行った試験はCochranの方法により分散が同じであるか検定し、JIS8402-2の1%の表に従い棄却した。次に棄却された試験室のデータを除いた残りの各試験室の平均値、又は $n=1$ の試験方法で行ったデータは危険率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、平均及び平均の標準偏差を求めた。全データについてZスコアを計算し、 $|Z| \leq 2$ を満足、 $2 < |Z| \leq 3$ を疑わしい、 $|Z| > 3$ を不満足として判定基準とした。

まとめた結果については、結果報告会において全体の結果、Zスコアのグラフ、指摘事項等を説明すると共に、各企業にはそれぞれのZスコア及び個別の指摘事項等の結果表を渡し、業務の参考としてもらった。

## 2. 結果

3年間に実施した試験のZスコアの順位を図1から図4に、各試験結果の $|Z| > 3$ 、 $2 < |Z| \leq 3$ 、 $|Z| \leq 2$ の数をそれぞれ表2から表5に示す。不満足とされた試験室の参加試験室全体に対する割合は、クロルフェニラミンマレイン酸塩のTLC並びにUSPプレドニゾン錠の溶出試験が高い結果となった。

### 【定量】

HPLCによる定量試験結果の平均値等を表6に示す。1社がクロルフェニラミンマレイン酸塩錠の規格からはずれていた以外は、定量値は規格内の結果であった。各試験室の分析精度は試験対象の試料及び試験方法により高低があり、室間再現性は1.0 $\sim$ 2.6%、室内再現性は0.4 $\sim$ 1.2%の範囲であった。

HPLCの定量において3年間を通して $|Z| > 3$ となり不満足と判定された試験室は、のべ4社(1社は2回)であった。なお平成22年度の参加45社のうち1社は $n = 1$ の報告であったため、Zスコアの判定は行わず44社のデータで解析を行っている。

#### 【TLC】

TLCのRf値の結果を表7に示す。HPLCは各試験方法とも相対標準偏差が2.5%以下であったのに対し、TLCはウルソデオキシコール酸錠、クロロフェニラミンマレイン酸塩のどちらも相対標準偏差が非常に高い結果となった。クロロフェニラミンマレイン酸塩は試験室1カ所が外れ値となり、これを抜いた平均は0.41、標準偏差は0.064、相対標準偏差は15.6%である。 $|Z| > 3$ となり不満足と判定された試験室は、クロロフェニラミンマレイン酸塩の確認試験の2社であった(表3)。

#### 【融点】

融点は測定方法が試験室で異なり、その加熱方式及び判定方式を表10に示す。ブロックヒーター方式のうち目視及び自動判定が同時に可能で両方の結果を報告した試験室が6社、電熱方式とブロックヒーター方式の別々の機器で報告した2社があり、合計43社から51データが報告された。

融点の規格131~135°Cを外れていたのは3社で、いずれも加熱方式はバーナーであり、標準偏差も3通りの加熱方式のうちバーナーが最も標準偏差が高い結果となった。融点で $|Z| > 3$ となり不満足と判定された試験室は2社である(表8)。

#### 【溶出試験】

溶出試験のうちクロロフェニラミンマレイン酸塩錠は、Zスコアが不満足となる試験室はなかったが、USPプレドニゾン錠は3社のZスコアが8以上と非常に大きくはずれた。また、相対標準偏差も高い結果となった(表9)。

以上の3年間実施した8項目、11試験を通して、8社(のべ10社)が $|Z| > 3$ と判定された。

#### 【製剤均一性】

製剤均一性試験は報告された1錠あたりの定量(%),並びに質量偏差試験は1錠の質量(mg)から再度、判定値を計算し直した。その結果と付き合わせて計算間違い等の指摘事項があった件数を表11に示す。初年度は何らかの指摘事項があった試験室は参加の半数以上に上ったが、次年度は実施要領の不備から未記入が5社あったものの、計算間違い等は1/4に半減した。

### 3. 考察

#### 【定量】

HPLCによる定量法は、参加した医薬品製造企業の試験室のうち95%以上は分析の技能について問題はなく、非常

に良好な結果であった。 $|Z| > 3$ となり不満足となった試験室のうち2社は、試験者が一人で他に試験操作に習熟した者がいない小規模製造所、及び医薬品製剤を試験した経験がない製造所であった。これらの会社については、機会をとらえ個別に技術指導や実習を行った。

平成22年度と23年度は液剤ではなく内服固形製剤を試料としたが、医薬品各条にある「粉末とし」の操作を各社でどう行うかで結果が異なり、分析能力以外の要素が入ることとなった。特にクロロフェニラミンマレイン酸塩錠は、乳鉢で粉碎する際に力を入れ過ぎると含量が低下するという現象が起き、磁製乳鉢には成分が付着し易い性質があると考えられた。規格を外れた数社には、この点に注意して再試験を行った結果を採用したため、厳密な試験所間の比較とはなっていない。

HPLCは定量結果以外にシステムの性能及び再現性の報告を求めたところ、内標準物質のピークの溶出順を確認せずに定量を行っている会社や再現性を満たしていないにも関わらずデータを採用している会社があり、結果報告会を通じて注意喚起を行った。

#### 【TLC】

TLCのRf値はばらつきが大きくなると予想されたため、試験時の細かい条件(気温、湿度、展開槽の大きさ等)も同時に報告してもらったが、このうち相関がやや認められたのは展開時間であった( $r = 0.605$ )。展開時間が長くなる要因のひとつとして展開槽内の溶媒の飽和度が関係することから、23年度の試験方法の説明会では一般試験法のTLC法を改めて解説を行い、特に中に入れるろ紙の重要性について喚起したが、Rf値のばらつきは、それほど改善しなかった。これは各社の展開槽の大きさや形がまちまちであること、蓋と本体との密閉度が高くない展開槽も中にはあるためと考えられる。Rf値のばらつきを小さくするには同じ展開槽を揃えることが理想であるが、それが不可能であれば密閉度に注意して試験を行うことがまず必要である。

#### 【融点】

融点は表10に示すように、一般試験法の図2.60-1にあるシリコン浴をバーナーで加熱する方式、シリコン浴を電熱ヒーターで加熱する方式、シリコン浴を使用せずブロックヒーターで直接加熱する方式の3種類の方式があった。そのうちブロックヒーター方式は、拡大鏡で融解を観察するタイプ、透過度や反射率で自動判定だけをするタイプ、自動判定と同時に観察窓で目視判定が可能なタイプが市販されている。シリコン浴を加熱する方式は温度調整が難しいことから、習熟していない試験者が実施すると精度や正確さで問題があると言える。ブロックヒーター方式は精度が他方式より良い上、デジタルカメラによる録画機能付き機

種では品質管理上の記録の作成及び保管が可能であるという点で非常に優れている。

各社でどのように装置の点検を行っているか報告してもらったところ、日局融点標準品又は他の標準物質による性能確認は、シリコン浴加熱方式では3割に対しブロックヒーター加熱方式では7割の試験室が行っていた。ブロックヒーターは温度調節には温度センサーを使用することから、温度計のキャリブレーションは外部委託になり、自社で可能なのは標準物質による装置適合性になるためである。融点は加熱速度による影響が大きいことを考慮すると、バーナー及び電熱加熱であっても局方温度計の校正だけでなく、融点標準品で装置適格性をチェックする必要があると思われる。

#### 【溶出試験】

クロルフェニラミンマレイン酸塩錠及びUSPプレドニゾン錠の溶出性は、溶出試験器を所有している試験室だけが対象となるため、参加企業は16社と少なかった。クロルフェニラミンマレイン酸塩錠の溶出規格45分75%以上を満たし、Zスコアも1社のやや不満足以外は良好な結果であることから、この製剤の溶出試験について問題はないと言える。USPプレドニゾン錠の溶出試験は、定期的にキャリブレーターとして使用している試験室は、溶出率が低く6槽のばらつきも非常に小さいという特徴があった。各試験室保有の溶出試験器の機種による溶出率の違いは見られなかったが、溶出率が高かった2社は試験液の脱気方法が超音波であり、脱気方法の違いによりUSPプレドニゾン錠の溶出率は影響を受けるという報告<sup>1)2)</sup>を裏付けていた。溶出試験は脱気以外にも振動、回転軸のぶれ、中心軸からのずれが変動要因になり、機械的な校正の他にキャリブレーターを用いた試験を行うことは、溶出試験器の装置適格性を判断する上での参考となる。

#### 【製剤均一性試験】

製剤均一性試験は、平成22年度は含量均一性試験及び質量偏差試験、平成23年度は質量偏差試験を実施したが、日常業務において内服固形製剤の製剤均一性試験を実施していない原薬、液剤又は外用剤の製造を主とする企業は、判定値の計算に馴染みがないことから間違いが多かった。内服固形製剤を製造している企業であっても、15改正以降の計算式の違い、記号に違う数値を代入、単純な計算ミス等が何社かあった。平成22年度の結果報告会及び23年度の実施説明会において、判定値の計算式について説明したところ、表11に示すように21年度に比較して23年度の計算間違いは約半数に減少し、製剤均一性試験への理解が進んだことが伺える。

他に報告データ全体を通しては、計算ミス、データ写し間違い、エクセル関数の間違い、セル範囲の指定間違い等

の単純ミスが散見されたが、これらについては報告する前に再度のチェックをすれば容易に是正できるものであり、試験検査結果の報告書を作成したあとのチェックが大切であることを再度認識させられることとなった。

#### 4. まとめ

環境や食品分野における試験検査所間で行われている手法に倣い県内製薬企業の品質管理部門を対象にして外部精度管理を行ったところ、ほとんどの試験室の試験検査能力は、ほぼ満足のいくものであった。Zスコアが不満足となった試験室のうち問題点が見えるものについては指導、助言を行っている。他の試験室についてもHPLCのシステム適合性の確認、計算の間違い、薄層クロマトグラフィーの基本操作、融点測定装置の装置適格性、溶出試験器の稼働性能適格性といった問題点も明らかになった。

製薬企業の品質管理部門が行う医薬品分析は、同一の試験項目を公定書に従って行うのではなく、各社で試験項目、試験項目並びに試験方法は全く異なっている。また、3年間に実施した試験項目及び試験方法は、主として内服固形製剤を製造する製薬企業を対象としたもので、原薬のみの製造で製剤試験の経験がない企業、内服液剤や外用剤のみの製造で内服固形製剤の試験経験がない企業などには対応していないという不十分な点がある。

なお参加企業に対して行ったアンケートにおいて、普段行っている試験の基礎が学べた、日本薬局方一般試験法の再確認が出来た、他社との試験結果との比較により自社のデータの信頼性の確認が出来た、といった回答から、この事業が県内医薬品製造企業の一定以上のレベルアップに繋がっているものと考えられる。

- 1) 四方田千佳子：厚生科学研究費補助金医薬安全総合研究事業、溶出試験の変動要因の解明及びその制御に関する研究、平成13年度総括研究報告書、2002
- 2) 渡会三千代：溶出試験器のカリブレーション（Ⅲ）－溶出液の脱気方法が錠剤の溶出率に与える影響－、富山県薬事研究所年報、30、56-63（2003）

表 1 試験品目及び試験項目

年度	試験品目	試験項目	試験法	試験手順	参加企業	参加試験室
平成21年度	小児用内服液剤(アセトアミノフェン,カフェイン)	定量法	高速液体クロマトグラフィー	薬事研究所で作成	58	60
平成22年度	ウルソデオキシコール酸錠	製剤均一性試験	含量均一性試験	日本薬局方医薬品各条	45	45
			質量偏差試験	日本薬局方一般試験法	45	45
		定量法	高速液体クロマトグラフィー	日本薬局方医薬品各条	45	45
		確認試験	薄層クロマトグラフィー	日本薬局方医薬品各条	40	40
平成23年度	クロルフェニラミンマレイン酸塩	確認試験	薄層クロマトグラフィー	日本薬局方医薬品各条	47	47
		融点	融点測定法	日本薬局方一般試験法	47	47
	クロルフェニラミンマレイン酸塩錠	製剤均一性試験	質量偏差試験	日本薬局方一般試験法	48	48
		定量法	高速液体クロマトグラフィー	日本薬局方医薬品各条	48	48
		溶出性	溶出試験	日本薬局方医薬品各条	16	16
	USPプレドニゾン錠	溶出性	溶出試験	USP Certificate	16	16

表 2 HPLCによる定量試験のZスコア結果

Zスコア	アセトアミノフェン		カフェイン		ウルソデオキシコール酸錠	クロルフェニラミンマレイン酸塩錠
	1回目	2回目	1回目	2回目		
$ Z  \leq 2$	56	56	56	56	41	45
$2 <  Z  \leq 3$	3	3	4	3	2	3
$ Z  > 3$	1	1	0	1	1	0
総数	60	60	60	60	44	48
$ Z  > 3$ 割合 (%)	1.7	1.7	0.0	1.7	2.3	0.0

表 3 TLCのRf値のZスコア結果

Zスコア	ウルソデオキシコール酸錠	クロルフェニラミンマレイン酸塩
	$ Z  \leq 2$	38
$2 <  Z  \leq 3$	2	1
$ Z  > 3$	0	2
総数	40	47
$ Z  > 3$ 割合 (%)	0.0	4.3

表 4 融点のZスコア結果

Zスコア	クロルフェニラミンマレイン酸塩
$ Z  \leq 2$	46
$2 <  Z  \leq 3$	3
$ Z  > 3$	2
総数	51
$ Z  > 3$ 割合 (%)	3.9

表 5 溶出試験のZスコア結果

Zスコア	USPプレドニゾン錠	クロルフェニラミンマレイン酸塩錠
$ Z  \leq 2$	11	15
$2 <  Z  \leq 3$	2	1
$ Z  > 3$	3	0
総数	16	16
$ Z  > 3$ 割合 (%)	18.8	0.0

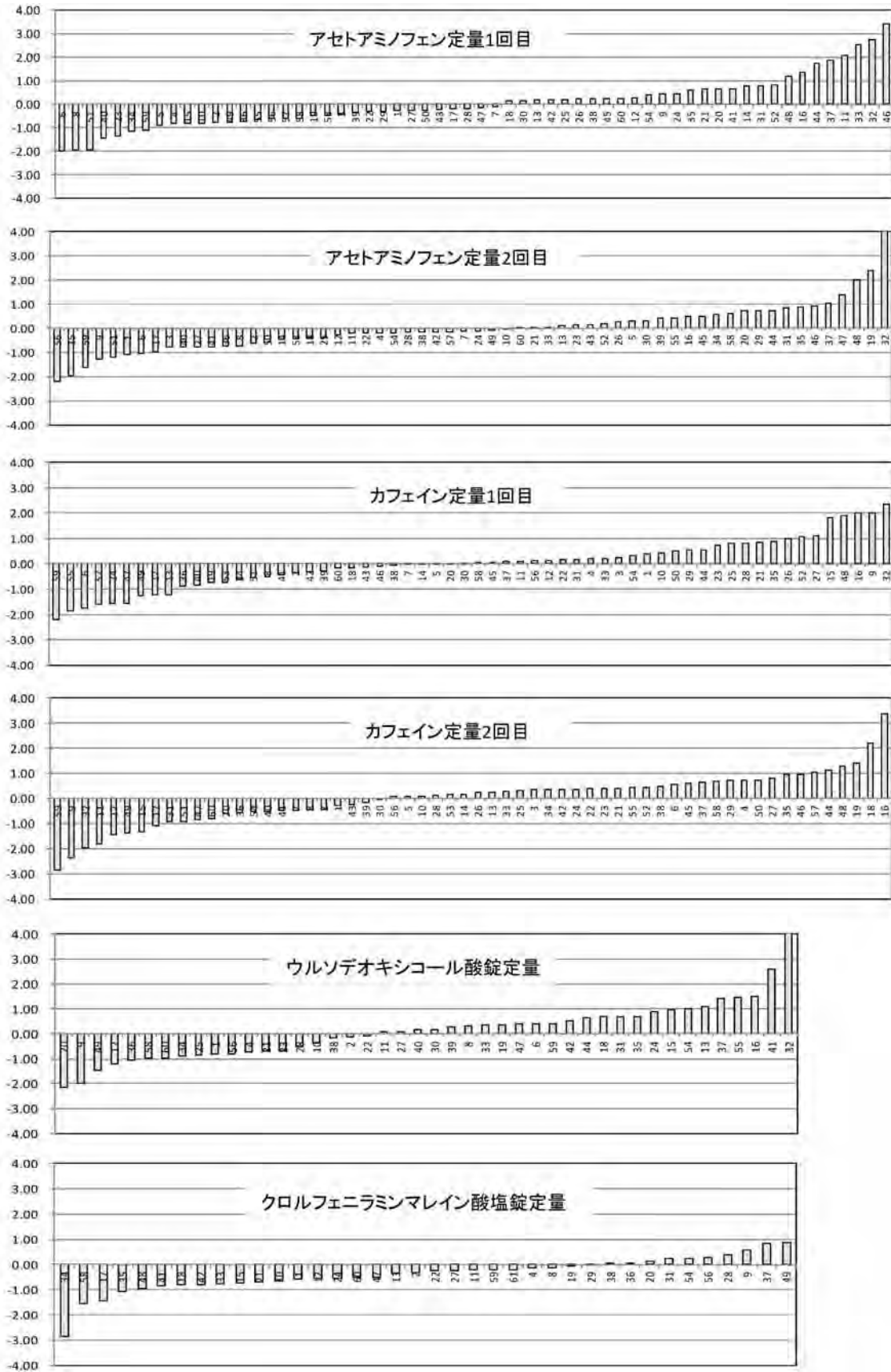


図1 HPLCによる定量試験結果のZスコア（横軸は試験室番号）



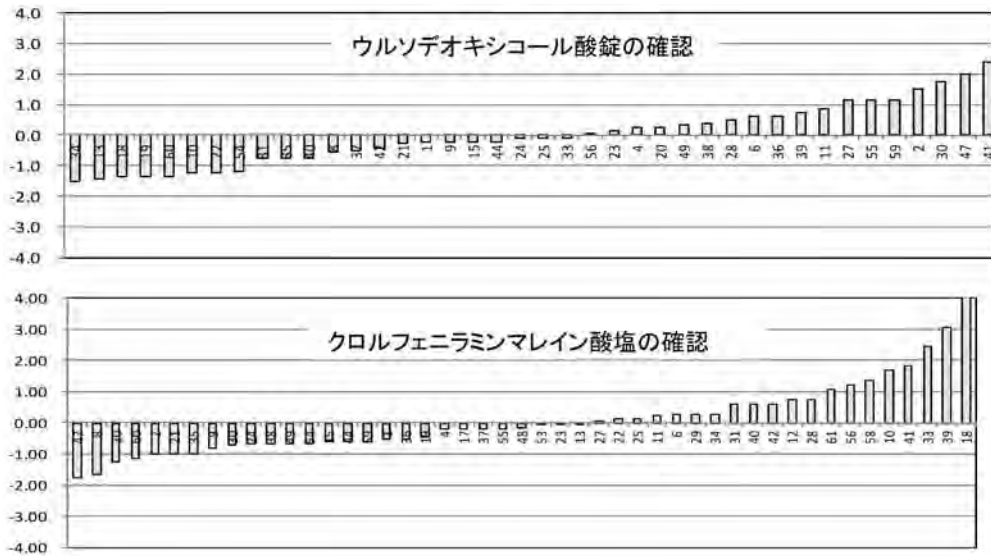


図 2 TLCによる確認試験結果のZスコア（横軸は試験室番号）

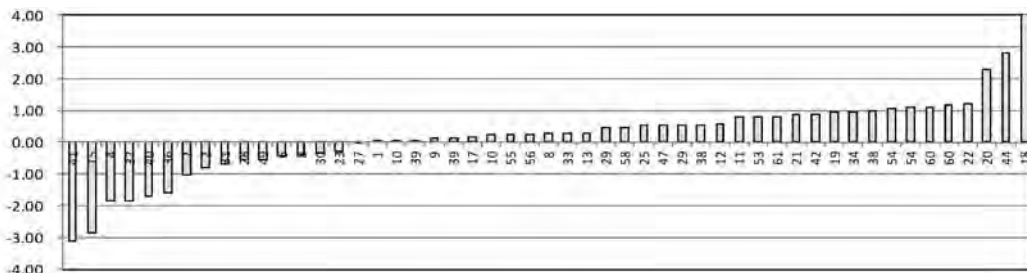


図 3 クロルフェニラミンマレイン酸塩の融点のZスコア（横軸は試験室番号）

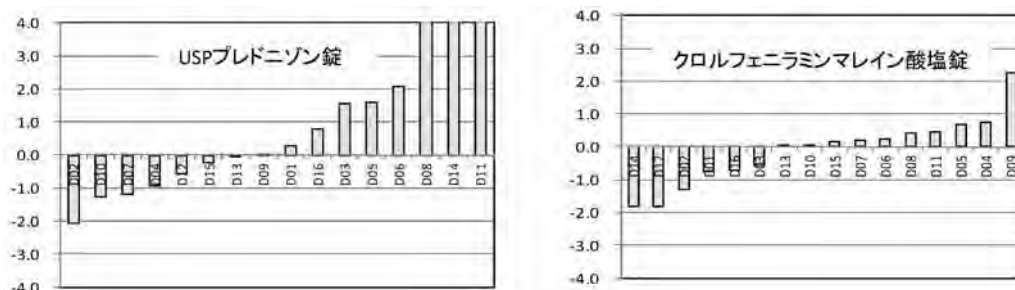


図 4 溶出試験結果のZスコア（横軸は試験室番号）

表 6 HPLC による定量試験

	アセトアミノフェン		カフェイン		ウルソデオキシコール	クロルフェニラミンマレイン
	1回目	2回目	1回目	2回目	酸錠	酸塩錠
参加試験室数	60	60	60	60	44	48
平均(%)	100.1	100.1	100.5	100.7	97.9	97.1
最大値(%)	102.7	103.8	105.4	106.7	98.0	103.3
最小値(%)	98.4	97.9	95.9	95.4	95.6	90.2
中央値(%)	99.8	99.9	100.5	100.9	97.8	96.7
標準偏差(%)	0.90	0.96	2.05	1.57	1.33	2.40
相対標準偏差(CV%)	0.9	1.0	2.0	1.6	1.4	2.5
室間再現性(%)	1.08	1.02	2.15	1.97	1.32	2.59
室内再現性(%)	0.80	0.49	0.81	0.67	0.40	1.21

表 7 TLC による確認試験

	ウルソデオキシコール酸錠	クロルフェニラミンマレイン酸塩
	参加試験室数	40
平均(Rf値)	0.61	0.43
最大値	0.80	0.79
最小値	0.49	0.30
中央値	0.60	0.40
標準偏差	0.080	0.084
相対標準偏差(CV%)	13.1	19.6

表 8 融点

	クロルフェニラミンマレイン酸塩
	参加試験室数
平均(°C)	134.0
最大値(°C)	138.1
最小値(°C)	133.9
中央値(°C)	130.8
標準偏差(°C)	1.22
相対標準偏差(CV%)	0.91
室間再現性(%)	1.36
室内再現性(%)	0.64

表 9 溶出試験

	USP プレドニゾン錠	クロルフェニラミン マレイン酸塩錠
	参加試験室数	16
平均(%)	35.5	88.6
最大値(%)	53.4	92.3
最小値(%)	31.0	81.4
中央値(%)	33.1	89.5
標準偏差(%)	6.03	4.40
相対標準偏差(CV%)	17.00	4.97
室間再現性(%)	8.69	6.75
室内再現性(%)	2.05	3.19

表 10 融点の加熱方式別結果

加熱方式	シリコンオイルとバーナー	シリコンオイルと電熱	ブロックヒーター	
			目視判定	自動判定
参加試験室数	11	15	12	12
平均	134.7	133.6	134.0	
標準偏差	1.76	1.37	0.68	
相対標準偏差(CV%)	1.30	1.03	0.51	

ブロックヒーター方式の内訳

使用機器数19 (目視と自動の同時測定可能な機種 9, 目視のみ 3, 自動のみ 7)

表 11 製剤均一性試験の指摘事項数

	ウルソデオキシコール酸錠		クロルフェニラミンマレイン酸塩錠
	含量均一性試験	質量偏差試験	質量偏差試験
参加試験室数	44	44	48
指摘数(のべ数)	27	27	12
指摘試験室数	23	23	12
未記入	0	0	5

# サジオモダカの栽培研究 (第 1 報) —塊茎の分割数, 収量及び成分に及ぼす肥料の影響—

田村 隆幸, 内 正人, 村上 守一

## Studies on Cultivation of *Alisma orientale* Juzepczuk —Effects of chemical fertilizer on division, weight and constituents of rhizome—

Takayuki TAMURA, Masato UCHI, Morikazu MURAKAMI

### 要 約

サジオモダカの国内栽培が定着しなかった原因として、良品とされる球状の生薬「タクシャ (沢瀉)」が得られなかったことが考えられる。そこで、新たな栽培法を確立し、高品質で多収量の生薬を県内で生産することを目指し、本研究では肥料の影響について検討した。その結果、追肥中のリン酸及びカリウムを除外することにより、花茎数及び塊茎の分割数が減少し、収量が増加する傾向が見られた。また、生薬中の Alisol A, Alisol B 及び Alisol B monoacetate を定量したところ、追肥中のリン酸及びカリウムを除外しても各成分含量に大きな影響は認められなかった。市販品との比較では、市販品に含有される Alisol A が試験栽培品には検出されなかったが、Alisol B 及び Alisol B monoacetate の含量については、試験栽培品が市販品を上回った。これらの結果は、サジオモダカの栽培法を確立するうえで有用であると考えられた。

### Summary

As the cause that cultivation of *Alisma orientale* did not take root in Japan, it is thought that spherical crude drug “*Alisma Rhizome*” considered to be high quality was not provided. Therefore, for the purpose of establishing the new cultivation method and producing the crude drug showing high quality and high yield in this prefecture, influence of fertilizer was examined. Plants were cultivated excluding phosphoric acid and potassium in additional fertilizer. As a result, the number of both division of rhizome and flower stalk tended to decrease, and yield tended to increase. Furthermore, the contents of Alisol A, B and B monoacetate in *Alisma Rhizome* were examined. The exception of phosphoric acid and potassium hardly ever effects on these contents. By the comparison with a commercial sample, Alisol A contained in a commercial sample was not detected in the examined samples, but Alisol B and B monoacetate in the examined samples was contained more. It was thought that these results were useful in establishing the cultivation method.

キーワード：サジオモダカ, 栽培, タクシャ (沢瀉)

Key words : *Alisma orientale*, Cultivation, *Alisma Rhizoma*

サジオモダカ *Alisma orientale* Juzepczuk は、日本 (北海道, 本州北部), 中国, 朝鮮等の沼沢地に自生する多年草で、その塊茎を調製加工 (乾燥, 周皮の除去) したものを生薬「タクシャ (沢瀉)」という<sup>1)</sup>。タクシャは利尿, 止渴の薬効があり、当帰芍薬散, 八味地黄丸, 五苓散等の漢方処方配合される。年間約360トンある国内需要の全ては、現在のところ中国から安価で安定的に輸入されている。しかし今後、中国国内の消費拡大による価格の高騰等により、わが国に必要量が輸入されなくなることが想定される。このような事態に備え、原植物であるサジオモダカの県内での栽培法を確立し、高品質なタクシャを安定供給できる体制を整えておくことが必要である。

タクシャの国内生産が定着していない<sup>2)</sup>理由として、主産地である中国四川省及び福建省では球形又は卵形で高品質とされる生薬が生産されるが、国内栽培では不定形となって商品価値が著しく低下すること<sup>3)</sup>、が挙げられる。

平成 21 年度、文献<sup>4, 5)</sup>の栽培法を参考に当センターで予試験を行ったところ、塊茎の周囲から次々に発生する花茎の位置で新たな塊茎が形成され、不定形の塊茎と多数の球形の塊茎が得られた。不定形又は小さな塊茎は、その後の生薬への調製加工の段階で周皮を除く際、作業効率及び歩留まりが低下するため、生産効率の面でも大きく球状の塊茎が有利であると考えられた。

そこで本研究では、既存の栽培法を改良することによ

り、品質的に優れ、球状で高収量のタクシャを県内で生産するための新たな栽培法の確立を目指し、栽培試験を行った。良品とされるタクシャの成分的な要件が定まっていなため、成分については、市場品と同等以上の含量を目標とした。

## 調査方法

### 1. 実験材料植物

当センター標本園で栽培しているサジオモダカから得た種子を試験に供した。

### 2. 栽培場所

薬用植物指導センター地内  
(中新川郡上市町広野 2732)

### 3. 栽培方法

#### (1) 育苗

湿らせた苗床に200粒を播種し、ガラスハウス内で育苗した。最初の3日間は土の表面が湿っている状態を保ち、その後は、毎日午前7時及び午後5時に各15分間のミスト散水を行った。地上部が15cm以上の苗を植付け用の苗とした。

苗床 育苗箱(幅35cm×奥行25cm×高さ20cm)に用土を深さ17cmまで入れたもの  
用土 圃場の土と化成肥料(N:P:K=15:15:15)を混合したもの(20g/育苗箱)

#### (2) 試験田への定植

ガラスハウス南側の側溝(幅0.75m×長さ20m)に暗渠排水を施し、圃場の土壌を約30cmの深さまで入れ、鶏糞20kgを施肥し、試験田とした。

定植は、株間30cm、条間30cmの2条植えとした。

#### (3) 試験区

試験田を6.5m間隔で3区画(4.9㎡/区画)に仕切り、A区、B区、C区の試験区を設定した。

#### (4) 追肥

3つの試験区には、6～10月の各月の初め頃に、表1の追肥を5回に分けて施した。

表1 各試験区の追肥量

試験区	硫安 (窒素分)	過磷酸石灰 (リン酸分)	硫酸加里苦土 (カリウム分)	ヨークイン
A区	600(126)g	721(126)g	586(126)g	630g
B区	600(126)g	240(42)g	196(42)g	630g
C区	600(126)g	—	—	630g

#### (5) 摘花

上がった花茎を、その下端で摘み取った。なお、各試験区の5株については、花茎を摘み取らなかった。

#### (6) 調査

##### ア 花茎の数

植付けから掘り取りまでの期間に上げた花茎の数を、1株ごとに集計した。

##### イ 塊茎の収量、歩留まり、分割数

8月上旬、10月上旬には各3株、また、12月上旬には5株を掘り取り、葉及び根を除いた塊茎を、当センター順化室で、20℃で45日間、除湿器により乾燥した。周皮を除去した後、重量を測定し、この値を収量とした。1株から得られた塊茎の数を分割数とした。

##### ウ 生薬の成分含量

生薬中の、Alisol A、Alisol B 及び Alisol B monoacetate について、文献<sup>6)</sup>の方法を一部改変した下記の方法により定量した。なお、市販品の中国四川省産のタクシャ(株式会社延寿堂)も同様に分析した。

#### 【試料の調製方法】

各試料を粉末(中末)とし、2gを正確に秤量する。メタノール15mLを加え、30分間超音波処理する。遠心分離(2,500rpm)した後、その上澄液を分取する。残留物に対し同様に操作し、合計3回抽出する。

内標準物質(terephthalic acid diethyl ester)を添加し、メタノールを加えて正確に50mLとし、0.45μmのメンブランフィルターを通し、試料溶液とする。

#### 【分析法(HPLC法)試験条件】

検出器：紫外吸光度計(測定波長：210nm)

カラム：Mightysil RP18(内径4.6mm、長さ250mm、粒子径5μm)

カラム温度：50℃付近の一定温度

移動相：直線グラジエント法

時間 (min)	水 (%)	アセトニトリル (%)
0	50	50
60	0	100

流量：1.0mL/min

注入容量：10μL

内標準物質：terephthalic acid diethyl ester

## 結 果

### 1. 試験経過

播種	H22. 2. 23
発芽	H22. 3. 18
試験田への定植	H22. 5. 25
追肥 (1 回目)	H22. 5. 29
摘花	H22. 6. 19 ~ 10.22
追肥 (2 回目)	H22. 7. 1
掘り取り調査	H22. 8. 2
追肥 (3 回目)	H22. 8. 3
追肥 (4 回目)	H22. 9. 1
掘り取り調査	H22. 10. 5
追肥 (5 回目)	H22. 10. 6
掘り取り調査	H22. 12. 7
塊茎の乾燥	H22. 12. 8 ~ H23. 1. 31
塊茎の周皮除去	H23. 2. 1 ~ H23. 3. 18
成分分析	H24. 1. 12 ~ 3. 7

### 2. 花茎の数

予試験での観察結果及び文献<sup>3)</sup>から、花茎の形成が塊茎部の分割を促し、不定形を呈する原因の1つであることが推測された。そこで、追肥の要素のうち、花の形成に関与が大きいリン酸及びカリウムの分量を試験区によって減量し、花茎数の違いを調査した。

結果を図1に示す。窒素、リン酸、カリウムを等量に追肥したA区では43.7本であったが、リン酸及びカリウムを3分の1に減量したB区では39.1本、リン酸及びカリウムを除いたC区では31.8本となり、追肥においてリン酸及びカリウムを除くことにより、花茎数を減少させる傾向が見られた。

また、花茎を摘み取らなかった場合の花茎数は、A区で15.0本、B区で12.8本、C区で11.0本であり、花茎を摘み取った場合と同様の減少傾向が見られた。

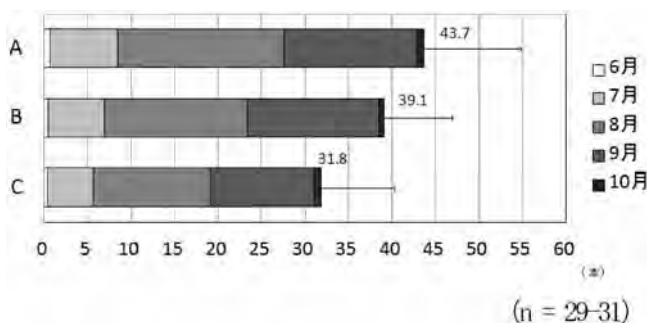


図1 摘み取った花茎の数 (1 株あたり)

### 3. 収量, 歩留まり, 分割数

8月, 10月及び12月における乾燥後の収量並びに12月における塊茎の分割数と掘り取り調査した個体が上げた花茎の数を表2に示す。

#### (1) 収量

8月には試験区間でほとんど差がなかった(A区:9.4g, B区:9.8g, C区:10.0g)が, 10月にはA区で52.7gとなりB区又はC区の約1.5倍となった。しかし12月においては, B区が64.3gで最大となり, C区も同程度の収量であった。一方, 10月に最大であったA区は53.6gで, 10月からの2ヶ月間でほとんど増加しなかった。

なお, 花茎を摘み取らなかった株の12月における収量は, A区で28.1g, B区で18.4g, C区で22.3gであり (n = 5), 花茎を摘み取った場合の3割から5割程度しか得られなかった。

#### (2) 歩留まり (12月)

A区及びC区でそれぞれ39.7%及び39.5%と同程度であったが, B区では36.0%でやや低い値であった。

#### (3) 分割数 (12月)

A区及びB区では, それぞれ17.4個, 17.6個で両者に差はなかったが, C区では15.0個と少なくなる傾向が見られた。このため, 収量を分割数で割って求めた「塊茎1個あたりの重量」は, C区が最大となり, B区, C区の順となった。

表2 塊茎の収量, 歩留まり及び分割数

調査項目	掘り取り調査						花茎数調査
	8月 (n=3)	10月 (n=3)	12月 (n=5)				
	収量 (g)			歩留まり (%)	分割 (個)	塊茎1個あたりの乾燥重量 (g)	12月の掘り取り調査株の花茎の数 (本) (n=5)
A区	9.4	52.7	53.6	39.7	17.4	3.1	42.2
B区	9.8	36.6	64.3	36.0	17.6	3.8	46.4
C区	10.0	34.4	62.0	39.5	15.0	4.1	33.8

#### (4) 生薬中の成分含量 (12月)

Alisol B については, C区の0.15%が最高値で, 市販品の1.8倍の含量であった。他の試験区でも0.1%前後が含有され, 市販品の値を上回った。

Alisol B monoacetate については, B区の0.60%が最高値で, 市販品の5.4倍の含量であった。他の試験区でも0.5%以上含有され, 市販品の4.7~4.9倍であった。

Alisol A については, どの試験区のものも検出されなかった。なお, 市販品は0.11%含有していた。



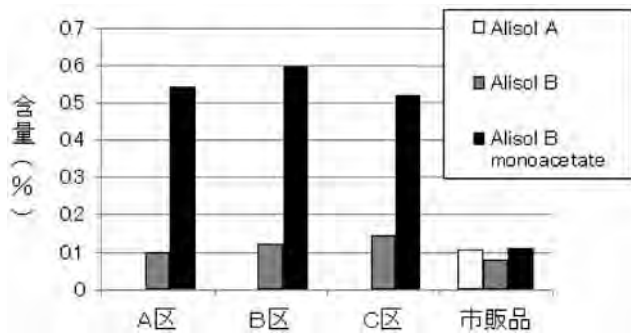


図2 各試験区及び市販品の成分含量

## 考 察

本研究では、球状で大きく、高品質なタクシャを生産することを目的として、県内でのサジオモダカの栽培法における肥料体系の検討を行った。国内栽培する上で問題となる塊茎が分割されて不定形となる現象は、花茎の形成が影響していることが予試験等から推測された。そこで、6月から10月に次々と上がる花茎の数を減少させることが塊茎の不定形を解消すると考え、花の形成に関与が大きい要素であるリン酸及びカリウムの追肥量を減量又は除外した試験区を設定し、花茎の数、根茎の分割数及び収量、生薬中の成分含量への影響を調査した。

追肥としてリン酸及びカリウムの量を除外したC区では、サジオモダカの花茎数及び塊茎の分割数が減少した。花茎数と塊茎の分割数とに正の相関があった(相関係数: 0.89)ことから、花茎の形成が塊茎の分割を促すという推測を支持する結果となった。リン酸及びカリウムの追肥を減量又は除外したところ、収穫時期である12月の収量がやや増加したが、これは、花茎の形成が抑制されたことにより養分が温存され、塊茎の生長が促進されたものと考えられる。収量を塊茎の分割数で除した「生薬1個あたりの重量」は、リン酸及びカリウムを追肥で与えないことにより増加したが、生薬への調製加工での作業効率を考えると、重量は不十分で、不定形もあまり解消されていない。肥料体系をさらに詳細に検討することによって、生薬の重量をさらに増加させることはある程度まで可能と思われるが、肥料体系だけでなく、他の栽培条件も組み合わせればその可能性が広がる。川西等は、播種時期を大幅に遅らせて、6月下旬から7月上旬に播種すると、不定形が少なくなると球状の塊茎の数が増えるが、収量が半分以下となったことを報告している<sup>3)</sup>。また、この原因として、播種を遅くすることにより日長の影響で花茎数は減るが、栽培期間が短くなり、塊茎が肥大する前に地上部が枯れるためであると推定している<sup>3)</sup>。本県の気候では、秋には地上部が枯れるため、播種を遅らせてもこの報告と同様の結果しか

得られない可能性が高い。しかし、不定形を解消し、球状の塊茎を多く得るための方法として大変有用であるため、この生態学的特徴を利用した栽培法も今後の検討課題である。

花茎を摘み取らずに残した場合、各試験区での花茎数は3分の1程度に減少したが、12月の収量も3分の1から2分の1程度にそれぞれ減少した。花茎は摘み取ることによって新たな花茎の形成を導いているともいえるが、少ない花茎数でも開花・結実まで進んでしまうと、塊茎部の充実が抑制された。よって、収量を増加させるためには、花茎の小さいうちに摘み取る必要がある。

各試験区が生薬中のAlisol A, Alisol B及びAlisol B monoacetateの含量を定量した結果、Alisol Aはどの試験区でも検出されなかった。Alisol Bについては、リン酸及びカリウムの追肥量が減ると含量が増加する傾向があったが、Alisol B monoacetateについてはそのような傾向は見られなかった。これらの成分に関しては、試験区間で大きな差異が認められなかったことから、追肥においてリン酸及びカリウムを減量又は除外することによる成分含量に与える影響はないものと考えられる。

試験栽培で得られた生薬(以下、「試験栽培品」という。)と市販品の成分含量を比較すると、試験栽培品には検出されなかったAlisol Aが、市販品には含有されていた。また、試験栽培品のAlisol B monoacetate含量は市販品の5倍前後であった。今回、試験栽培品の乾燥は、20℃で45日間としたが、市販品の乾燥方法については正確な情報が得られていない。第16改正日本薬局方解説書<sup>1)</sup>には、調製加工の際に火熱乾燥をする場合があるとの記載がある。このことから、今回の市販品と試験栽培品との含有成分の相違は、乾燥方法の違いに起因することも考えられる。

一方、第16改正日本薬局方解説書<sup>1)</sup>には、「四川省産の川沢瀉も福建省産の建沢瀉も日本産の沢瀉とは形状が異なるが、原植物は一種とみなし*A.orientale* Juzep.を規定している。」との記載がある。また、和漢薬百科図鑑<sup>7)</sup>には、「中国産の等外品タクシャは日本産タクシャと似ており、栽培法の違いにより形態が異なるものと思われる」と記載されている。しかしながら、中国で栽培されるサジオモダカが今回試験に用いた植物と異なる性質を持つ可能性があるため、両者を同一条件で栽培及び調製加工し、その形態と成分含量の相違について今後明らかにしたい。

以上のことから、追肥中のリン酸及びカリウムを除外した肥料体系でサジオモダカを栽培することにより、分析した3成分の含量に大きな影響を及ぼすことなく、生薬の収量を増加させる傾向が見られた。しかし、塊茎の不定形を解消し、さらに高収量で高品質のタクシャを生産するための栽培法を確立するためには、幾つもの検討すべき課題が

あり、今後も継続して栽培試験を実施する予定である。

## 文 献

- 1) 第16改正日本薬局方解説書，広川書店，D-537 (2011)
- 2) 勸日本特産農産物協会；薬用作物（生薬）に関する資料（平成21年産），13-14（2011）
- 3) 川西史明，藤田嘉治，渡辺斉；サジオモダカ根茎の形状に及ぼす栽培条件の影響について，生薬学雑誌，38（1），65-69（1984）
- 4) 藤田早苗之助；薬用植物栽培全科，42-48（1972）
- 5) 勸日本公定書協会；新しい薬用植物栽培法，143-147（1970）
- 6) 吉川雅之，山口祥子，茶谷展安，西野由貴江，松岡敏郎，山原條二，村上啓寿，松田秀秋，久保道德；水生植物を基原とする天然薬物（第3報）高速液体クロマトグラフィーを用いた沢瀉トリテルペン成分の定量分析，薬学雑誌，114（4），241-247（1994）
- 7) 難波恒雄；和漢薬百科図鑑〔I〕，99-101（1993）

# V 資 料

# 平成 23 年度 製剤技術実習報告 — 洗浄バリデーションの実施方法について —

永井 秀昌，明 長良，横田 洋一，大岸史和<sup>1</sup>

<sup>1</sup>株式会社島津製作所

## Methods of Cleaning Validation

Hidemasa NAGAI, Nagayoshi MYO, Yoichi YOKOTA, and Fumikazu OGISHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SHIMADZU CORPORATION

本県の医薬品製造に従事する技術者の製剤製造技術力の向上を図ることを目的として、昨年度から(株)富山県薬業連合会が県の補助事業として製剤技術実習を実施することになった。今年度は、打錠工程、コーティング工程及び洗浄バリデーションに関する実習が行われた。そのうち、本年の12月に薬事研究所において実施された洗浄バリデーション実習についてその概要を報告する。

医薬品の製造において、洗浄工程は設備・機械類の残留物に起因する交叉汚染や異物汚染を防止するために重要であり、その洗浄手順の妥当性が検証されている必要がある。今回、洗浄バリデーションにおいてスワブ法による回収率測定の方法をHPLC法とTOC法により検討するため、分析機器メーカーの(株)島津製作所と(株)T&Cテクニカルの協力を得て「洗浄バリデーションの実施方法」をテーマに下記のとおり実習を行った。

テーマ：洗浄バリデーションの実施方法

月 日：平成23年12月7日，8日

場 所：富山県薬事研究所

講 師：富山県薬事研究所

明 長良 製剤技術アドバイザー

横田 洋一 医薬品試験課長

永井 秀昌 研究員

株式会社島津製作所

大岸 史和 分析計測事業部 環境ビジネスユニット

株式会社T&Cテクニカル

魚路 康幸 技術営業部

受講者：富山県内の製薬企業に勤務する実務経験が5年以上の技術者 20名



## 実験内容

### 1. 機器と試薬

(使用機器)

- ・高速液体クロマトグラフ (型式：アライアンス 2695 システム, 日本ウォーターズ(株))
- ・燃烧酸化方式全有機体炭素 (TOC) 分析計 (型式：TOC-L, (株)島津製作所)
- ・固体試料燃烧装置 (型式：TOC-L, (株)島津製作所)
- ・流動層造粒機 (型式：FL-LABO, フロイント産業(株))
- ・攪拌造粒機 (型式：FS-GS-5, 深江パウテック(株))
- ・照度計 (型式：LX-204, (株)カスタム)
- ・高純水製造装置 (型式：Elix UV 5, 日本ミリポア(株))

(その他器具)

- ・ステンレス板 (10 × 10 cm, バフ研磨 # 200 及び # 300)
- ・コットンボール (トリコーム, 直径 10 cm 及び直径 7 cm, 竹下製薬(株))
- ・石英ろ紙 (QR - 100, アドバンテック東洋(株))
- ・1000  $\mu$ l マイクロピペット
- ・20ml サンプル瓶

(試薬)

- ・日本薬局方アセトアミノフェン 微粉 (山本化学工業(株))

### 2. 実習方法

#### 1) スワブ法による添加回収実験

ア) HPLC での回収率の添加・回収実習

- ① 5 種類のアセトアミノフェンエタノール溶液 (0, 1, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml EtOH) をそれぞれマイクロピペット (m-line, バイオヒットジャパン(株)) で 1 ml 吸い上げ, 微量ずつ 10 × 10 cm のステンレス板 (バフ研磨 # 200) に滴下した。
- ② ステンレス板をステンレス容器にのせ, 乾燥機 (迅速乾燥機, 木村化学器械(株)) にて, 温度約 60°C で 1 時間乾燥した。
- ③ 乾燥済みのステンレス板に精製水を染みこませた直径 10 mm のコットンボールを用いて, 図 1 の方法でスワブし, ふき取ったコットンボールを 20ml サンプル瓶に入れた。次に新しいコットンボールを用いて同様のスワブ操作を繰り返した後, さらに新しいコットンボールを用いてステンレス板上の水滴を吸着させた。また, スワブ操作の際はあらかじめコットンボールとサンプル瓶の合計重量を計測しておき, コットンボールに吸着した水量を記録した。コットンボールに吸着した水量 + 1 (ml) を希釈倍率とし, 回収率の計算時に用いた。
- ④ コットンボールを入れたサンプル瓶に精製水 1 ml をマイクロピペットで滴下し, 密栓して超音波洗浄機 (US-102, (株)エスエヌティ) で 10 分間抽出した。その後, コットンボールをサンプル瓶壁面にスパーテルで押し付け, 吸着した溶媒を絞り出した。1 ml 注射筒にて絞り出した抽出溶媒を吸い取り, 0.20  $\mu$ m フィルター (アドバンテック東洋(株)) でろ過し, HPLC 分析用試料とした。
- ④ HPLC の分析条件として, 表 1 の条件で分析を行った。また, あらかじめ測定したアセトアミノフェン標準溶液の検量線 (アセトアミノフェン標準溶液 1-100  $\mu$ g/ml) を図 2 に示した。
- ⑤ HPLC により測定したピーク面積と既知濃度を用いて, 次式により回収率 R を算出した。

$$R = \frac{\text{ピーク面積} \times \text{希釈倍率}}{\text{アセトアミノフェン標準溶液の検量線から求めたピーク面積}} \times 100$$



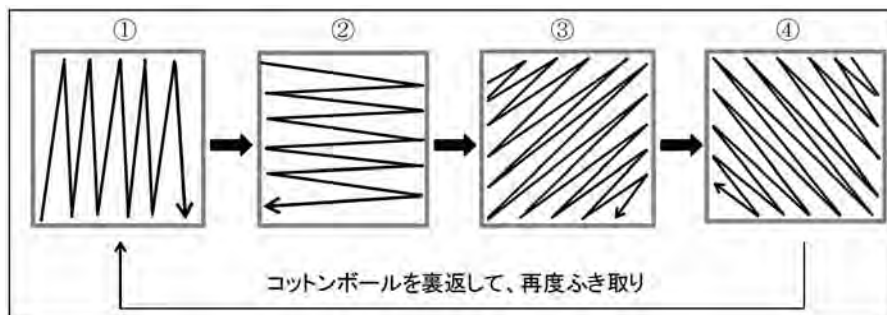


図 1. コットンボールによるステンレス板のスクラブ法

- ①上下方向にふき取る
- ②左右方向にふき取る
- ③左上から右下に向かって斜め方向にふき取る
- ④右上から左下に向かって斜め方向にふき取る

表 1. HPLC 分析条件

検出器	紫外吸光光度計 (測定波長245 nm)
カラム	4.6×150 mm, L-column (化学物質評価研究機構)
カラム温度	40℃
移動層溶媒	0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /MeOH (75 : 25)
注入量	10 μl
流速	1.0 ml/min
溶出時間	3.1 min

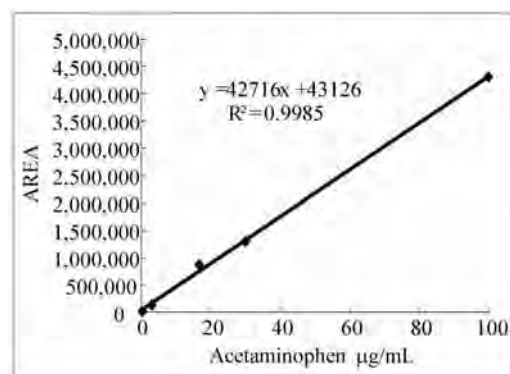


図 2. アセトアミノフェン標準溶液検量線

イ) TOC 計での回収率の実習

- ①超純水及びエタノールで希釈した 5 種類のアセトアミノフェン溶液 (0, 1.6, 15.7, 78.7, 157.4 μg/ml) をそれぞれマイクロピペットで 1 mL 吸い上げ、微量ずつ 10×10cm のステンレス板 (バフ研磨 # 200) に滴下した。なお、TOC 計での実習に用いた水は純度 3M Ω · cm 以上の超純水を用いた。
- ②ステンレス板をステンレス容器にのせ、エタノール溶液を滴下したステンレス板は自然乾燥で 2 時間、水溶液を滴下したものは乾燥機にて 60℃ で 1 時間乾燥した。
- ③乾燥したステンレス板を用いて、超純水 300 μl を染みこませた石英ろ紙 (QR-100, アドバンテック東洋株) でスクラブし、スクラブした石英ろ紙を TOC 計 (島津製作所製 TOC-L) の固体試料測定システムで直接燃焼炭素測定法にて表 2 のとおり測定した。
- ③測定値 (炭素実測量) と炭素理論量を用いて、次式により回収率 R を求めた。

$$R = \frac{\text{炭素実測量}}{\text{炭素理論量}} \times 100$$

※炭素理論量 = アセトアミノフェン溶液濃度 × アセトアミノフェン中の炭素の割合 (0.635)

(アセトアミノフェン中の炭素の割合は、アセトアミノフェン C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub> に含まれる炭素の質量数 (12×8) を分子量 151.2 で除算することによって求めた。)

表 2. TOC 計 分析条件

分析計	島津燃焼酸化方式全有機体炭素計 TOC-L
測定方法	TC (全炭素)

2) スワブ法によるバリデーション実験 (HPLC法)

ア) 試作用造粒機を用いた洗浄バリデーションの実験 (HPLC法)

①流動層造粒機 (FL-LABO) 及び攪拌造粒機 (FS-GS-5) を用いて、下記のアセトアミノフェン標準処方を作成した後、装置を温水で手洗淨し、自然乾燥させた。

(流動層造粒処方)		(攪拌造粒処方)	
処方：アセトアミノフェン	150 g	処方：アセトアミノフェン	500 g
乳糖 (200Mesh)	120 g	乳糖 (200Mesh)	400 g
結晶セルロース	30 g	結晶セルロース	100 g
ヒドロキシプロピルセルロース (8%水溶液として外側添加 90g)		ヒドロキシプロピルセルロース (外側添加)	30 g
合計	300 g	精製水	150 ml
		合計	1,000 g

②表 3, 4 の拭き取り場所において、(1) アと同様の手順で、精製水を染みこませたコットンボールでスワブし、ガラス製のサンプリング容器に回収し、HPLC分析用試料とした。流動層造粒機の缶体Uシール蓋部、攪拌造粒機の蓋板及びアジテーター羽根については、表面部分すべてをふき取った。また、流動層造粒機と攪拌造粒機の缶体側面については、10 × 10 cmにくりぬいたステンレス枠を用いて拭き取りを行った。

表 3. 流動層造粒機の拭き取り場所と面積

場 所	面積 (cm <sup>2</sup> )
缶体円柱部側面※	100
缶体円錐台側面※	100
缶体Uシール蓋部	132

表 4. 攪拌造粒機の拭き取り場所と面積

場 所	面積 (cm <sup>2</sup> )
缶体円柱部側面※	100
蓋板	113
アジテーター羽根	400

※ 10 × 10 cmにくりぬいたステンレス枠を缶体表面にあてて、100 cm<sup>2</sup>の面積を拭き取った

③HPLCで分析後、得られたピーク面積とアセトアミノフェン標準溶液の検量線 (図 7) の回帰直線式 ( $y = 42835x + 42892$ )、及び (1) アで求めた回収率の平均値から残留量 S を次式により算出した。

$$S = \frac{(\text{ピーク面積} \times \text{希釈倍率}) - 42892}{42835} \div \text{回収率の平均値 (86.5\%)}$$

イ) 目視法による許容基準の確認

50, 100, 400 μg/ml のアセトアミノフェンエタノール溶液をマイクロピペットで 1 ml 吸い取り、10 × 10 cm のステンレス板 (バフ研磨 # 300) に微量ずつ滴下後、コットンボール (直径 7 mm) で均一に広げた。自然乾燥を 2 時間行った後、ステンレス板を照度 1000 ルクス程度の光源で照らし、目視で確認した。照度の確認は照度計 (LX-204, (株)カスタム) を用いて行った。

考察

1) スワブ法による添加回収実験

ア) HPLC での回収率の添加・回収実習

実習では A 班と B 班に分かれ、各濃度あたり 1 回ずつ実験を行ったが、両班とも回収率は一般的に妥当とされている 70% 以上となっていることから、今回用いたスワブ剤や抽出溶媒は適切であったと考えられる (表 5, 6)。また、濃度ごとに担当者を変えて回収実験を行ったが、実施担当者間でのサンプリング値の変動は少なく、アセトアミノフェン濃度とスワブ後に測定したピーク面積との間に良好な直線性が認められていることから (図 3, 4)、今回の操作方法に問題はなかつたと考えられる。しかしながら、コットンボールから吸着した溶媒を回収する際、少量の溶媒をスパークルで押し出す操作が困難であったため、溶媒量を増やすなどの工夫をした方がよいと思われた。

表 5. アセトアミノフェン回収実験結果 (A 班)

濃度	面積	希釈倍率	希釈前面積	回収率
1	19,702	3.06	60,289	70.2%
10	153,316	2.75	421,620	89.7%
50	713,372	2.76	1,968,907	90.4%
100	1,157,022	3.04	3,517,347	81.5%
平均				82.9%

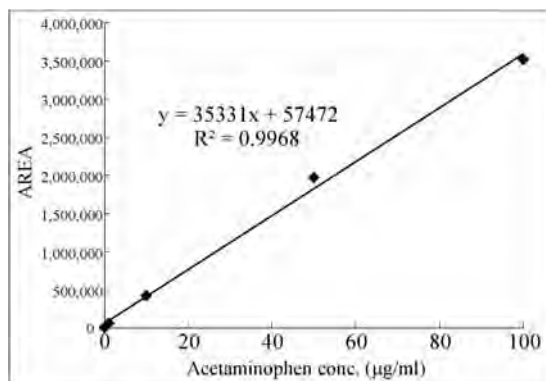


図 3. アセトアミノフェン回収率検量線 (A班)

表 6. アセトアミノフェン回収実験結果 (B 班)

濃度	面積	希釈倍率	希釈前面積	回収率
1	36,714	2.34	85,910	100.1%
10	143,025	2.67	381,878	81.2%
50	696,102	2.57	1,788,982	82.1%
100	1,441,921	2.91	4,195,991	97.2%
平均				90.2%
A班, B班の平均				86.5%

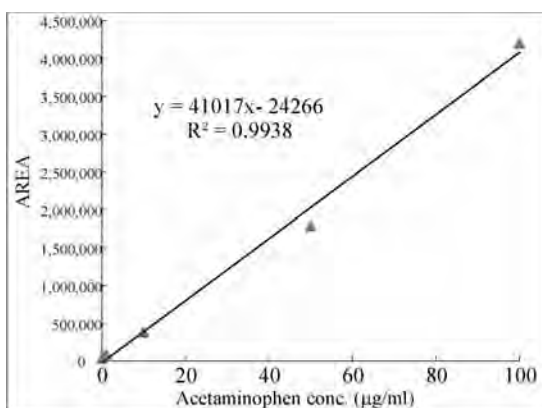


図 4. アセトアミノフェン回収率検量線 (B班)

イ) TOC 計での回収率の実習

アセトアミノフェンの希釈溶媒として超純水とエタノールを用いて実験を行ったが、どちらも検量線の直線性は良好であり、溶媒による差異は認められなかった (図 5, 6)。アセトアミノフェンは水及びアルコールともに溶けやすいため、希釈溶媒としてはどちらを用いても問題はなく、また、TOC 分析による影響も認められなかった。

また、両溶媒とも低濃度域 (アセトアミノフェン 1.57 - 15.7 µg/ml) では、回収率が 100% を超えていた (表 7, 8)。この理由として、低濃度域では炭素量として微量なため、試料片の作成、拭取り作業の過程で、コンタミネーションの影響を受けたと推定される。TOC や TC (全炭素) 測定は、成分を特定できなくても洗浄の評価ができるのが最大の利点であるが、その反面、物質を選ばず検出してしまうため、コンタミネーションの影響を受けやすいことも確認された。

表 7. アセトアミノフェン回収実験結果 (水溶解)

アセトアミノフェン濃度 (µg/ml)	炭素理論量 (µg)	炭素実測量 (µg)	回収率 (%)
1.57	1	3.9	392%
15.7	10	12.5	125%
78.7	50	50.4	101%
157.4	100	93.6	94%

炭素理論量 = アセトアミノフェン濃度 × 0.635

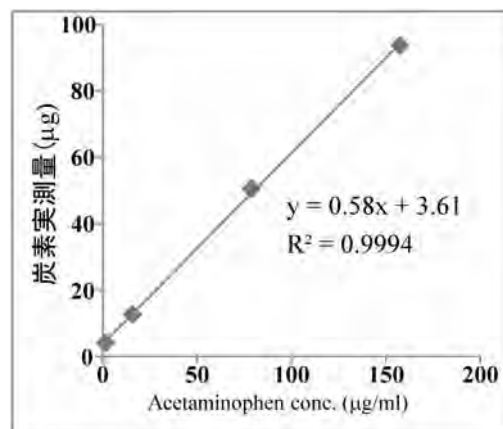


図 5. アセトアミノフェン回収率検量線 (水溶解)

表 8. アセトアミノフェン回収実験結果 (エタノール溶解)

アセトアミノフェン濃度 (μg/ml)	炭素理論量 (μg)	炭素実測量 (μg)	回収率 (%)
1.57	1	2.4	242%
15.7	10	14.6	146%
78.7	50	52.9	106%
157.4	100	96.4	96%

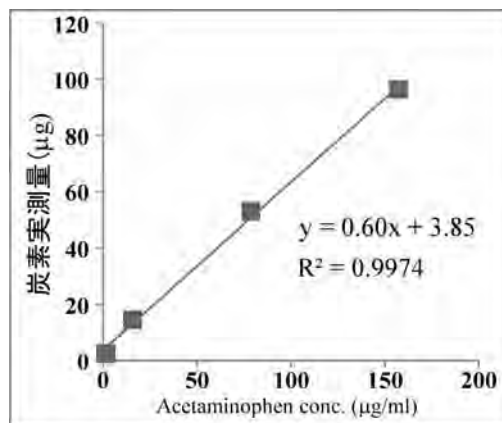


図 6. アセトアミノフェン回収率検量線 (エタノール溶解)

2) スワブ法によるバリデーション実験 (HPLC 法)

ア) ラボ機を用いた洗浄バリデーションの実験 (HPLC 法)

今回スワブ法により測定した装置の残留アセトアミノフェン濃度は、いずれも 1 μg/100cm<sup>2</sup>以下となっており、問題なく洗浄が行われていることが確認できた (表 9, 10)。一般的に、許容基準 (目視法) とされている 400 μg/100 cm<sup>2</sup> よりもかなり低い値となっていたが、今回、洗浄実験を行った装置が試作機であり、かつ測定対象に用いたアセトアミノフェンは水に溶けやすいことから、洗浄が容易であったものと推測される。

表 9. アセトアミノフェン回収実験結果 (流動層造粒機)

場所	計算値 ①ピーク面積	②希釈倍率	③希釈前 面積	④濃度 (μg/ml)	⑤残留アセト アミノフェン量 (μg)	⑥スワブ 面積	⑦残留アセト アミノフェン量 (μg)/100cm <sup>2</sup>
缶体円柱部側面	25,536	2.53	64,606	0.51	0.59	100	0.59
缶体Uシール蓋部	22,807	2.96	67,510	0.57	0.66	132	0.44
缶体円錐台側面	9,906	4.41	43,684	0.02	0.02	100	0.02

残留アセトアミノフェン量は、まず測定した試料のピーク面積①に抽出時に希釈した希釈倍率②を乗じて希釈前面積③を算出した。③をアセトアミノフェン標準溶液で作成した回帰直線式 ( $y = 42835x + 42892$ ) に代入し、アセトアミノフェン濃度④を算出した。さらに (1) アで実施した回収率の平均値 (86.5%) で除算して求めた残留量⑤をスワブ面積⑥を用いて 100 cm<sup>2</sup>あたりに換算した。

表 10. アセトアミノフェン回収実験結果 (攪拌造粒機)

場所	計算値 面積	希釈倍率	希釈前 面積	濃度 (μg/ml)	残留アセト アミノフェン量 (μg)	スワブ面積	残留アセト アミノフェン量 (μg)/100cm <sup>2</sup>
蓋板	20,203	4.19	84,652	0.97	1.13	113	1.00
缶体円柱部側面 1	12,336	3.89	47,987	0.12	0.14	100	0.14
缶体円柱部側面 2	26,937	2.8	75,425	0.76	0.88	100	0.88
アジテーター 羽根	16,770	5.37	90,054	1.10	1.27	400	0.32

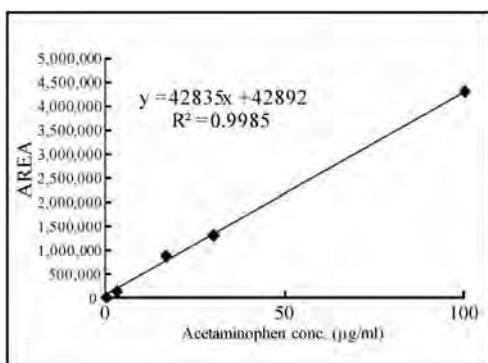


図 7. アセトアミノフェン標準溶液検量線

#### イ) 目視法による許容基準の確認

約1000ルクスの照明の下に各濃度のアセトアミノフェン溶液を塗布したステンレス板を設置し、目視により汚れを確認した結果、 $50\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ 濃度の板でも汚れが確認できた。一般的に目視法での許容基準として、 $400\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ が報告されている<sup>1)</sup>が、今回我々が測定した条件下では、 $50\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ の濃度でも汚れが目視できた。(2)アで実施したラボ機を用いた洗浄バリデーションの実験では、残留アセトアミノフェン濃度が $1\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ 以下となっていたが、拭き取り前に汚れがないことを目視により確認している。このため、アセトアミノフェンの許容基準を目視法とした場合、我々の実施した条件下では $50\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ 以下の低濃度になると考えられる。

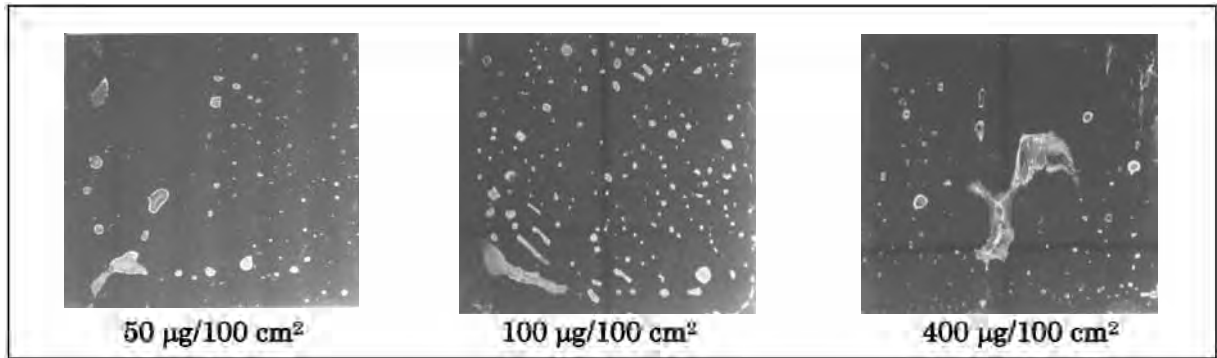


図 8. アセトアミノフェンの目視法による確認

#### まとめ

今回の洗浄バリデーション実習では、「洗浄バリデーションの実施方法」をテーマに、アセトアミノフェンを対象薬物としてスワブ法による回収率測定の方法をHPLC法とTOC法により検討を行った。

HPLCによる回収率の添加・回収実験では、一般的に妥当な回収率とされている70%を上回っており、薬物濃度とスワブ後に測定したピーク面積との間に良好な直線性が認められていたことから、スワブ剤として用いたコットンボールや抽出溶媒、操作法は適切であったと考えられる。

また、同様の添加・回収実験をTOC計で実施した結果においても、検量線の直線性は良好であったが、低濃度域では回収率が100%を超えていた。今回の実習により、TOC計による測定は、成分を特定できなくても洗浄の評価ができることが最大の利点であるが、有機物の総量を定量するという性質についても理解することができた。

ラボ機を用いた洗浄バリデーション実習においては、洗浄バリデーション時に実施する一連の操作を確認し、洗浄方法の検証を実施した。今回対象薬物として用いたアセトアミノフェンは水及びエタノールへの溶解性が高いことから、比較的検出が容易であったが、今後は水に不溶の薬物についても実験を検討したい。

実習後に受講生に対し、実習内容の理解度や自社で取り入れたい技術についてアンケート調査を実施した。その結果によると、実習内容を「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、ほぼ全ての受講者に内容が理解できたものと考えている(図9)。また、自社で取り入れたい技術についての質問では、「スワブ法によるHPLCでの回収率測定」や「TOC計」を記載している受講者が多く、実習で得られた洗浄バリデーションの知識を自社で活用してもらえるものと期待している。

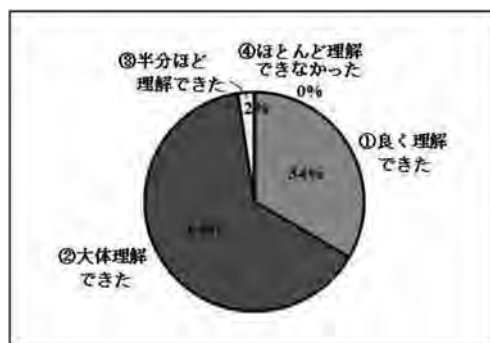


図 9. 受講者の実習内容の理解度



## 謝辞

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

## 引用文献

- 1) G.L. Fourman and M.V. Mullen, “Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations,” Pharm. Technol. 17 (4) , 54-60 (1993) .