

# IV 研究報告

# ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討

小笠原 勝, 松永 孝之, 大戸 幹也, 川筋 透, 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

## Anti-tumor effects of a betulin derivative in a tumor-burden mouse model.

Masaru OGASAWARA, Takayuki MATSUNAGA, Mikiya OTO, Toru KAWASUJI  
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

前報において、植物成分ベツリンが、B16F10細胞の皮下移植マウスモデルにおいて、腫瘍の増殖を50%程度抑制することを報告した。ベツリンは難水溶性の化合物であることから、動物実験において有効性を高めるには水溶性を向上させる必要がある。そこで本研究では、カルバメート化したベツリン誘導体6種を開発し、これらについて抗腫瘍効果を比較検討した。その結果、BD-23が顕著な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。BD-23の抗腫瘍メカニズムとして、細胞増殖に対する影響を検討したところ、ベツリンよりも明らかに強い阻害作用が認められた。また、ベツリンの抗腫瘍メカニズムには腫瘍内に浸潤した白血球の関与が示唆されていたことから、BD-23についても同様に検討したところ、白血球の顕著な増加が認められた。ところが、ベツリンの場合とは異なり、好中球、マクロファージ、及び、T細胞の増加は認められたが、NK細胞はむしろ減少した。これらのことから、BD-23の抗腫瘍メカニズムには、がん細胞に対する直接的な増殖阻害作用と腫瘍内に集積したこれらNK細胞以外の免疫細胞を介する作用が関与していると考えられた。

### Summary

We have previously reported that betulin, a plant constituent, inhibits the growth of B16 melanoma in a subcutaneously inoculated murine model. As betulin is practically insoluble in water, it is needed to improve its water solubility to enhance the anti-tumor effect in mice. In this study, we developed 6 carbamate derivatives of betulin and identified that BD-23 inhibited tumor growth in mice most effectively among them. Then, to reveal the mechanism of action of BD-23, we examined its effect on *in vitro* proliferation of B16 melanoma and found that it inhibited the tumor growth more markedly than betulin. As the anti-tumor mechanism of betulin is suggested to involve tumor-infiltrated leucocytes, we additionally examined the effect of BD-23 on accumulation of leucocytes at tumor sites in mice and found that administration of BD-23 induced remarkable infiltration of leucocytes into tumor. Detailed examination revealed that the increased accumulation of leucocytes consisted of neutrophils, macrophages, and T cells, and NK cells were rather decreased, unlike the case of betulin. These results suggest that the antitumor mechanism of action of BD-23 is ascribed to its direct and indirect cytotoxicity to tumor cells. Indirect cytotoxicity is considered to mediate the killing activity on tumor cells of leucocytes, except NK cells, accumulated into tumor tissues.

キーワード：ベツリン誘導体；悪性黒色腫；増殖抑制；immune cells

Keywords：betulin derivative；melanoma；growth inhibition；免疫細胞

がんの局所では、がん細胞から分泌される様々な免疫抑制因子（TGF- $\beta$ 、PGE<sub>2</sub>等）が複雑に絡み合い免疫抑制環境が形成されている。近年、このことが、がん治療、とりわけ、がん免疫療法の治療効果を低下させる要因となることが分かってきた。そのため、治療効果の向上には免疫抑制因子の作用を効果的に阻止する薬剤が必要とされ

ている<sup>1)</sup>。本研究では上記課題を解決するため、平成20年度より、ほくりく健康創造クラスター事業（～24年度）において「免疫抑制因子」の働きを解除（阻止）する物質の探索研究に着手した<sup>2)</sup>。

免疫抑制に対する解除作用を示す化合物を見出すため、本研究ではTGF- $\beta$ あるいはPGE<sub>2</sub>により抑制されたマウスNK

細胞のがん細胞傷害活性を指標に約800種の天然物をスクリーニングした。その結果、白樺成分のベツリンに目的とする有効性を見出した<sup>3)</sup>。ベツリンは既知化合物であったが、免疫抑制解除作用については報告がなされておらず、新しい作用機序に基づくがん治療薬になる可能性があると考え特許を取得した<sup>4)</sup>。

一方で、ベツリンは水に非常に溶けにくい性質であるため、マウス体内では消化管からの吸収や血液への移行性が極めて低く、その血中濃度が有効域に到達しないことが懸念された。実際、LC/MS/MSを用いた分析から、経口投与されたベツリンは消化管からほとんど吸収されないこと、静脈内に投与しても血液中にはほとんど移行しないこと（未発表データ）、さらに、がん移植マウスモデルにおいて、ベツリンを腫瘍内に直接投与しても、その抗腫瘍効果は50%程度しか認められないこと等を明らかにしてきた<sup>5)</sup>。このため、動物実験においてより高い有効性を得るには、水に溶けやすく血液や組織への移行性が良好な誘導体を開発する必要があった。ベツリンの水溶性や有効性を向上させる方法として、アミノ酸の付加やカルバメート構造への変換による誘導体化が報告されている<sup>6,7)</sup>。そこで今回、カルバメート化に着目してベツリン誘導体6種を開発し、がん移植マウスモデルを用いて有効性を比較検討した。

## 実験方法

### 1. 実験試薬

ベツリン誘導体は神戸天然物化学株式会社に合成委託した。シスプラチンは和光純薬工業株式会社より購入し、ベツリンはExtrasyntheseより購入した。試験管内の実験ではいずれもジメチルスルホキシドに溶解して用いた。マウスに投与する場合はいずれも0.1% Tween 80を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁して実験に供した。

### 2. 細胞及び細胞培養

マウスB16F10悪性黒色腫細胞は、涌沢伸哉先生（北陸大学）より恵与された。細胞は、10%の非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、0.1 mg/mlのストレプトマイシン及び55  $\mu$ 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. がん移植マウスモデルを用いた評価

マウス悪性黒色腫細胞 (B16F10) を  $2 \times 10^5$  個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス (8週令, 雌, 8匹/群) にマウス当たり0.05 mlずつ下腹部皮下に接種した。化合物はがん接種後2日目から16日目まで1日1回、腫瘍内に投与した。対照群には溶媒 (0.1% Tween 80を含むPBS) を

同様に投与した (50  $\mu$ l/マウス)。腫瘍径は2日あるいは3日ごとに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2で算出した。

### 4. 細胞毒性の評価

10% FBSを含むDMEM培地 (GIBCO) でB16F10細胞を  $4 \times 10^4$  個/mlに調製し、96ウェルプレート (Corning) に各ウェル当たり  $4 \times 10^3$  個を播種した。細胞がプレートに接着後、化合物を各濃度で添加し、インキュベーター内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) で48時間培養した。コントロールにはジメチルスルホキシドを同様に添加した。培養終了後、各ウェルの培地を、WST-1 (Wako) を5%含む10% FBS-DMEM培地に交換し、さらに4時間培養した後、波長450 nmにおける吸光度を測定した。

### 5. がん組織に集積した免疫細胞の解析

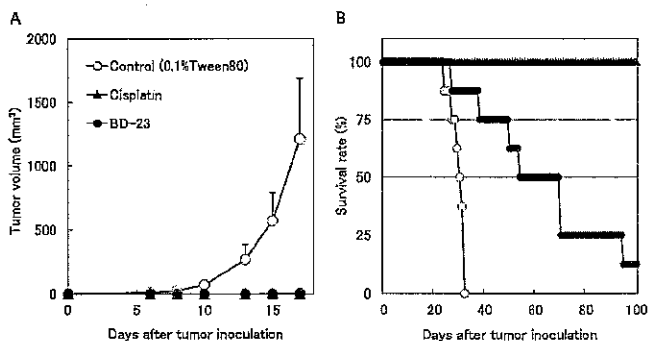
マウス悪性黒色腫細胞 (B16F10) を  $2 \times 10^5$  個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス (8週令, 雌, 3~6匹/群) にマウス当たり0.05mlずつ下腹部皮下に接種した。がん接種後2日目から9日目まで1日1回、化合物をマウス当たり45 nmolの用量で腫瘍内に投与した。対照群には溶媒 (0.1% Tween 80を含むPBS) を同様に投与した。がん組織は、がん接種後3日目、実験によっては6日目、あるいは、10日目に採取した。採取したがん組織を1 mg/mlコラゲナーゼA (ロシュ) 及び200 U/ml DNase I (Sigma) で処置 (37°C, 30分間) し、ハサミで細切後、ナイロンフィルター (70  $\mu$ mポアサイズ) (Falcon) を通してデブリスを除去した。遠心 (1500 rpm, 10 min) 後、上清を除去し、得られた細胞を  $10^5$  個/mlとなるように調製した。細胞を抗CD16/32抗体 (2.4G2) で処置 (1.5  $\mu$ g/ml, 4°C, 15 min) しFc受容体をブロックした後、各種の蛍光色素で標識された抗CD19抗体 (1D3), 抗CD3e抗体 (145-2C11), 抗NK1.1抗体 (PK136), 抗CD11b抗体 (M1/70), 抗Gr-1抗体 (RB6-8C5), 抗CD11c抗体 (HL3), 抗CD45抗体 (30-F11) で処置 (0.25-1.25  $\mu$ g/ml, 4°C, 0.5時間) した。細胞を洗浄後、7 AADを添加してフローサイトメーター (FACSCanto II, 日本BD) により測定した。

## 結 果

がん皮下移植マウスモデルにおけるベツリン誘導体の抗腫瘍効果

B16F10細胞の皮下移植モデルを用いて、ベツリン誘導体6種の抗腫瘍効果を比較検討した。その結果、BD-23が腫瘍移植後17日目において、コントロール群に比較して90%以上の顕著な抑制効果を示した (Fig. 1)。また、生存日数

を調べたところ、生存率が50%になるまでの日数は、コントロール群では30日であったのに対して、BD-23投与群では54日であり、約1.8倍に延長した。この効果は、前報で示したベツリンの抗腫瘍効果に比較して明らかに強い効果であった。しかし、汎用抗がん剤のシスプラチンを同様の条件で投与したところ、全例で腫瘍の消失が認められたことから、BD-23の抗腫瘍効果はシスプラチンほど強くないことが分かった。

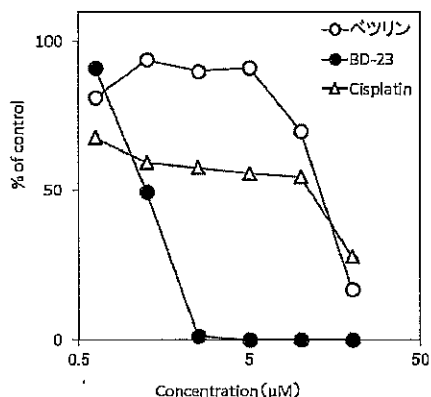


**Fig. 1. Effects of BD-23 and cisplatin on the growth of B16 melanoma in mice.**

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. BD-23 or cisplatin was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume (A) and survival rate (B) were evaluated. Data are expressed as mean±S.D. of 8 mice.

### がん細胞の増殖能に対するベツリン誘導体の抑制作用

ベツリンは様々ながん細胞に対して細胞増殖阻害作用を示すことが報告されており、ベツリンをカルバメート化することで、さらに、細胞増殖阻害作用が強くなることが報告されている<sup>7)</sup>。そこで、BD-23の作用機序の解析として、試験管内でのB16F10細胞の増殖能に与える影響を検



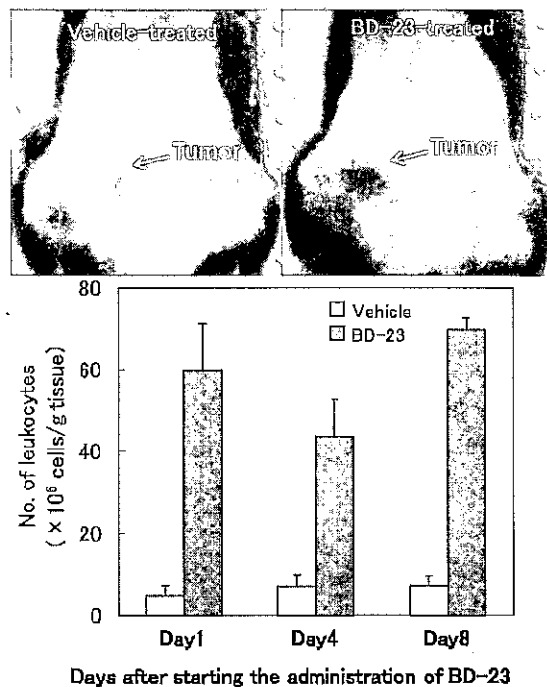
**Fig. 2. Effects of betulin, BD-23 and cisplatin on the *in vitro* proliferation of B16 melanoma cells.**

Tumor cells were cultured in 10% FBS-medium containing various concentrations of betulin, BD-23 or cisplatin for 48 h. After that, WST-1 solution was added into each well, and cells were incubated for an additional 4 h. Absorbance of each well was measured at 450 nm. Data are expressed as mean±S.D. of triplicate wells.

討した (Fig. 2). その結果、BD-23は濃度に依存した顕著な阻害作用を示し、50%阻害濃度は1.24 µMであった。一方、ベツリン及びシスプラチンの50%阻害濃度は、それぞれ13.0 µM及び11.2 µMであった。これらのことから、BD-23の細胞増殖阻害効果は、ベツリンの約10倍に亢進しているとともに、シスプラチンよりも明らかに強いことが分かった。

### ベツリン誘導体の投与部位への白血球の集積

前報で示したように、ベツリンを腫瘍内に投与したところ、腫瘍局所での白血球数はコントロール群に比較して約3倍に増加した<sup>5)</sup>。そこで、BD-23についても同様に腫瘍内投与後の白血球の集積について検討した (Fig. 3). その結果、投与の翌日 (day 1) において、投与部位では明らかな浮腫が認められるとともに、腫瘍内及び周囲に集積した白血球の数はコントロール群に比較して約12倍に増加した。そこで、この増加した白血球が何であるのかを明らかにするため、フローサイトメトリーを用いて各種免疫細胞について解析した (Fig. 4). その結果、BD-23を投与した翌日 (day 1) において、腫瘍内に浸潤した白血球の大部分は、マクロファージと好中球であることが分かった。



**Fig. 3. Accumulation of leukocytes to the site of administration of BD-23 in mice.**

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice. BD-23 was intratumorally administered for 1 to 8 consecutive days starting 2 days after tumor inoculation. On day 1, 4, or 8 of post of the initial injection of BD-23, leukocytes accumulated in tumor sites were analyzed as CD45 positive cells in a flow cytometer. Data are expressed as mean±S.D. of 3 mice. Photos indicate representatives of vehicle-treated or BD-23-treated mice one day after the initial injection of BD-23.

投与を継続してもマクロファージは徐々に減少したが、好中球は投与後8日目(day 8)において再び顕著に増加し、コントロール群の約50倍に達した。また、前報<sup>5)</sup>で示したベツリンの場合とは異なり、ナチュラルキラー細胞の増加は認められなかった。これらのことから、BD-23の抗腫瘍効果には、これら腫瘍内及び周囲に集積したマクロファージ、好中球が関与していることが示唆された。

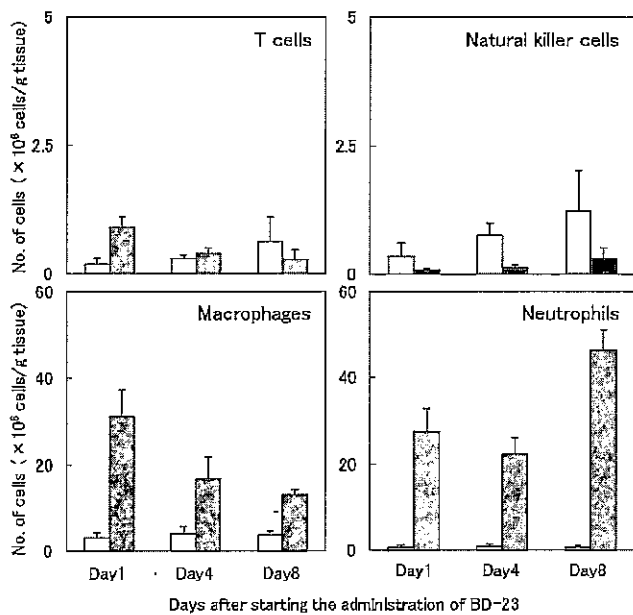


Fig. 4. Comparison of each immune cell population accumulated to the site of administration of BD-23 in mice.

The absolute cell number of each population of immune cells in the leukocytes accumulated in tumor sites as shown in fig. 3 were evaluated by a flow cytometer. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of 3 mice.

## 考 察

本研究では、ベツリンをカルバメート化することにより有効性の向上を期待した6種の誘導体について、担癌マウスモデルにおける抗腫瘍効果を比較検討し、BD-23が最も顕著な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。また、その抗腫瘍効果は、前報で示したベツリンの抗腫瘍効果よりも明らかに強力であった。さらに、BD-23の作用機序について検討したところ、がん細胞の増殖能に対する阻害効果はベツリンよりも10倍程度に亢進するとともに、腫瘍局所への白血球の浸潤もベツリンに比較して4倍程度に亢進したところが、集積した白血球について解析したところ、ベツリンを投与した場合とは異なり、NK細胞の集積の増大は認められなかった。

ベツリンの抗腫瘍効果は、これまでも報告されており、その作用機序はがん細胞の増殖能に対する阻害作用である

と報告されている<sup>8)</sup>。一方、我々の一連の研究においては、ベツリンは、脾臓細胞のNK活性を指標としてTGF- $\beta$ あるいはPGE<sub>2</sub>の抑制作用を解除する天然化合物として見出された<sup>3)</sup>。さらに前報では、担がんマウスモデルにおいてベツリンを腫瘍内に投与すると、腫瘍局所への好中球、マクロファージ、T細胞、及び、NK細胞の集積が、対照群に比較してより高く認められることを報告した<sup>5)</sup>。また、集積したNK細胞の多くは活性化していたことから、ベツリンはがん局所で認められる免疫抑制状態の解除に寄与していると考えた。一方、本研究においてBD-23を腫瘍内に投与した場合、腫瘍局所への好中球、マクロファージ、及び、T細胞の集積の増大は認められたが、NK細胞の集積はむしろ低下した。この点は、ベツリンの作用と大きく異なる点であり、このことは、BD-23の作用機序がベツリンとは異なる可能性を示していると考えられた。

当初、ベツリンはTGF- $\beta$ あるいはPGE<sub>2</sub>の免疫抑制作用を解除する天然化合物として見出されたことから、新しいタイプのがん治療薬の開発に有用である可能性があると考えた<sup>3)</sup>。しかし、本研究において見出したBD-23は、上述のようにベツリンとは異なる作用機序を有している可能性が示された。現時点において、BD-23の作用機序は十分に解明されていないが、がん治療薬開発における当該化合物の有用性について、以下のように考えた。まず、試験管内での細胞毒性については、ベツリンよりも飛躍的に強くなり、また、シスプラチンと比較しても明らかに強かった。しかし、BD-23は培養ヒト線維芽細胞に対しても同程度の細胞毒性を示したことから(データ省略)、正常細胞への毒性が懸念されるとともに、がん細胞への選択性は全く認められなかった。また、担癌マウスにおけるBD-23の抗腫瘍効果は、ベツリンよりは優れていたが、シスプラチンよりは明らかに劣るものであった。これらのことから、がん治療薬開発におけるBD-23及びその標的分子の有用性は、残念ながら期待されたほどは高くないと考えられた。

今後は、ベツリンよりも細胞毒性が低く、かつ、より高い抗腫瘍効果を有する化合物の開発、及び、その標的分子の解析を目指したい。

## 謝 辞

本研究の一部はJSPS科研費 24590109の助成を受けて実施された。

## 文 献

- 1) Teicher B.A.: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.*, **13**(21), 6247-6251 (2007)
- 2) 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)
- 3) 小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (2), 富山県薬事研究所年報, **39**, 21-25 (2012)
- 4) 高津聖志, 小笠原勝, 松永孝之: 発明の名称「がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物」(特許第5548874号、平成26年5月30日登録)
- 5) 小笠原勝, 松永孝之, 長井良憲, 高津聖志: がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍メカニズムの解析, 富山県薬事研究所年報, **42**, 17-22 (2015)
- 6) 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)
- 7) Kommera H., Kaluderović G.N., Dittrich S., Kalbitz J., Dräger B., Mueller T., Paschke R.. Carbamate derivatives of betulinic acid and betulin with selective cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**(11), 3409-3412 (2010)
- 8) Soica C., Dehelean C., Danciu C., Wang H.M., Wenz G., Ambrus R., Bojin F., Anghel M.: Betulin complex in  $\gamma$ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in in vitro and in vivo tumor models. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**(11), 14992-15011 (2012)

# シンナムアルデヒド及びケイヒ酸の Maus 精管電気刺激収縮に対する作用及び Maus における体内動態の検討

川筋 透, 石黒 尋保<sup>1</sup>, 松永 孝之

<sup>1</sup>リードケミカル株式会社

## Effect of Cinnamaldehyde and Cinnamic Acid on the Twitch Response to Electrical Stimulation in the Isolated Mouse Vas Deferens and Pharmacokinetic Studies in Mice

Toru KAWASUJI, Hiroyasu ISIGURO<sup>1</sup>, Takayuki MATSUNAGA

<sup>1</sup>Lead Chemical Co. Ltd.

### 要 約

桂皮の主成分であるシンナムアルデヒドは、鎮痙作用を有するとされている。シンナムアルデヒド及びケイヒ酸の Maus 精管の電気刺激収縮に対する抑制作用を検討した。また、それらの化合物の Maus の消化管吸収性を HPLC/PDA を用いて検討した。シンナムアルデヒドは、低濃度 (1-3 µg/mL) で Maus 精管の twitch 収縮反応を顕著に抑制した。ケイヒ酸は、比較的高濃度 (30-300 µg/mL) で twitch 収縮抑制作用を示した。また、ケイヒ酸 (30-300 mg/kg) 又はシンナムアルデヒド (100-300 mg/kg) の経口投与後、Maus 血漿中にケイヒ酸が検出された。これらの結果から、シンナムアルデヒド及びケイヒ酸は、Maus 精管における神経刺激性収縮に対する抑制作用を有することが示唆された。ケイヒ酸は Maus の消化管から吸収され、また Maus に経口投与されたシンナムアルデヒドはケイヒ酸に代謝されることが示唆された。

### Summary

Cinnamaldehyde, a main constituent of Cinnamomi Cortex, is known to possess antispasmodic effect. Effect of cinnamaldehyde and cinnamic acid on the twitch response to electrical stimulation in the isolated mouse vas deferens were examined. In addition, the absorption of those compounds on the mouse digestive tract was studied using HPLC/PDA. Cinnamaldehyde showed the twitch-inhibitory effect at low concentration (1-3 µg/mL). Cinnamic acid showed the twitch-inhibitory effect at relatively high concentration (30-300 µg/mL). Cinnamic acid was detected in mouse plasma after oral administration of cinnamic acid (30-300 mg/kg) or cinnamaldehyde (100-300 mg/kg). These results suggest that cinnamaldehyde and cinnamic acid may possess the inhibitory effect on the neurogenic contraction in the mouse vas deferens. Cinnamic acid is absorbed on digestive tract of mouse and orally administered cinnamaldehyde may be metabolized to cinnamic acid in mice.

キーワード：シンナムアルデヒド, ケイヒ酸, 精管, 電気刺激, 血漿

Keywords : Cinnamaldehyde, Cinnamic acid, Vas deferens, Electrical stimulation, Plasma

ケイヒ (桂皮) は、かぜ薬、鎮痛鎮痙薬、解熱鎮痛消炎薬、動悸抑制薬、保健強壯薬、婦人薬とみられる漢方処方などに高頻度で配合される生薬であり<sup>1-3)</sup>、また、芳香性健胃薬、矯味矯臭剤として広く使用されている<sup>1,3,5)</sup>。主たる精油成分であるシンナムアルデヒドと不揮発性のフェニルプロパノイドであるケイヒ酸は、漢方エキス剤等の品質評価のための指標成分として用いられている<sup>2,4,5)</sup>。

シンナムアルデヒドは、健胃作用、鎮痙作用、血管拡張作用、カテコールアミン遊離作用などを示すとされている<sup>1,4,6-8)</sup>。ケイヒ酸の薬理作用については、走化性ペプチド刺激によるモルモット腹腔マクロファージの O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生を阻害することなどが報告されている<sup>1,9)</sup>。

Maus 精管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。代表的な鎮痙薬であるパパベリン、血管拡張作用を有するカルシウム拮抗薬のニフェジピン、神経伝達抑制薬などが顕著な抑制作用を示し、種々の天然成分物質にも収縮抑制作用がみられている<sup>10-12)</sup>。

天然成分物質の有用性評価においては、吸収・代謝などの体内動態データは有用である。Maus の場合、少量の検体で実験できるメリットがある。これまでに経口投与後の血漿中濃度を HPLC で測定する方法を用いて、生薬成分の Maus における体内動態の検討を行っている<sup>13)</sup>。シンナムアルデヒド及びケイヒ酸については、富山県薬事研究会生

物部会 (H26年度) の場でも検討を行った。

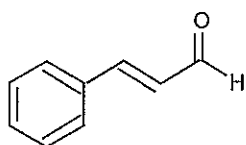
シンナムアルデヒド及びケイヒ酸のラットでの体内動態についての報告はみられるが<sup>14,15)</sup>、マウスでの体内動態の報告はほとんどみられない。ラットの場合、シンナムアルデヒドは、血液中では不安定であり<sup>14,16)</sup>、ラットへの静脈内投与後、大部分が速やかにケイヒ酸に酸化されることが報告されている<sup>14)</sup>。また、ケイヒ酸は、ラットへの経口投与後速やかに吸収され、その後、主として馬尿酸に代謝されるとの報告がある<sup>15)</sup>。

今回、鎮痙作用を有するとされるシンナムアルデヒドと、成分分析で用いられるケイヒ酸について、マウス精管での電気刺激収縮抑制作用を検討した結果とマウスでの体内動態を検討した結果を合わせて報告する。

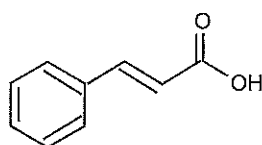
## 実験材料及び実験方法

### 1. 使用薬物

シンナムアルデヒド (東京化成, trans-Cinnamaldehyde), ケイヒ酸 (関東化学, trans-Cinnamic Acid), メタノール (関東化学, 高速液体クロマトグラフィー用), リン酸 (和光純薬), ツイーン80 (関東化学) を使用した。また, HPLC 分析での水は超純水を使用した。



Cinnamaldehyde



Cinnamic acid

Fig. 1. Chemical structures of cinnamaldehyde and cinnamic acid

### 2. マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対する作用の検討

ICR系雄性マウスを頸椎脱臼で致死し、精管を摘出した。マウスの精管1本では発生張力が小さいので、同じマウスからの2本の精管を並列につないで使用した。すなわち、2本の精管の下端は固定棒と一緒に結びつけ、上端は小さい金属リングに通した糸で2本の精管を連結した。小リングは糸を介してアイソメトリックトランスジューサー (TB-651T, 日本光電) に連結した。精管標本は、1対のリング状白金電極の中に通した状態で、34°CのMcEwen液 (130 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 13.1 mMスクロース及び11.1 mMグルコース) を満たした30 mLのマグナス槽内に懸垂した。電気刺激装置 (バイオメディカルサイエンス社) で発生した矩形波パルス (持続時間1 msec, 刺激頻度0.1 Hz) を栄養液中に通電し、電場刺激によって生じる一過

性の単収縮 (twitch) を等尺性に記録した。なお、白金電極のリングの外側は、ポリエチレン樹脂で被覆し、外側に電流が流れないようにした。標本を懸垂し、約0.15 gの静止張力のもとで電気刺激を開始した。30分後に栄養液を1回交換し、その後、電気刺激を行いながら30分経過してから検体を適用し、twitch収縮反応の変化を60分間記録した。

検体適用直前のtwitch収縮反応の振幅に対する振幅減少率から抑制率を算出した。

シンナムアルデヒド及びケイヒ酸は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用し、マグナス槽内でのDMSOの終濃度は、0.33%とした。

### 3. 投与・採血

ICR雄性マウス (6-7週齢) を用いた。検体は0.5%ツイーン80水溶液に懸濁し、ゾンデを用いて強制経口投与し、一定時間経過後 (~2時間) に採血を行った。なお、溶媒投与群には0.5%ツイーン80水溶液を10 mL/kgの割合で経口投与した。採血前に麻酔薬のペントバルビタールナトリウムを約25 mg/kg背部皮下投与し (5 mg/mL液, 約5 mL/kg), 10-15分後にマウスの眼窩静脈叢をヘパリン処理ガラス毛细管 (先端破損) で傷つけ、マイクロチューブ (EDTA-2Na添加・乾燥, 0.25 mg入) に血液を採取した。血液は3,000rpmで10分間遠心し、遠心上清を再度遠心し、血漿を得た。血漿はHPLC分析当日まで-80°Cで保存した。

### 4. HPLC条件

HPLCカラムは、L-column ODS ((財) 化学物質評価研究機構, 4.6 mm×150 mm) を使用し、移動相には、20mM リン酸とメタノールの混液を用いた。2液を送液ポンプ内で等量混和し、各50%の割合で30分間 (0-30分) 送液して分析し、その後の30-45分は、カラム洗浄のため90%メタノールとなるように20mM リン酸/メタノール (1:9) を送液した。流量は0.8 mL/分、カラム温度は34°C、注入量は20 μLとし、オートインジェクタでHPLCカラムに注入した。

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (島津製作所, SPD-M10Avp; PDA) を用い、溶出時間と吸収スペクトル (最大吸収波長) でピークの確認を行った。ケイヒ酸の定量には検出波長は275 nmに設定した。HPLC装置の制御・データ処理には、島津製作所のクロマトグラフィデータシステムCLASS-VPを使用した。

### 5. 血液試料のHPLC分析

マウス血漿にメタノールを添加して抽出・除蛋白し、遠心上清をHPLCで分析した。血漿40 μLの場合、メタノール210 μL (血漿量×5.25) を添加・混和し、4,000 rpmで10分間遠心し、遠心上清を0.2 μmのシリンジフィルター



(ワットマン, 13mm, プロピレン樹脂製) でろ過し, HPLC分析試料とした。

ピークの同定のため, ケイヒ酸及びシナムアルデヒドのメタノール溶液を調製し, 0.2 $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過し, HPLC分析に供した。

HPLC分析試料は, 血漿量に対して6.25倍希釈 (40 $\mu$ L $\rightarrow$ 250 $\mu$ L) となるので, この希釈倍率に基づいて, ケイヒ酸の検量線から血漿中濃度を算出した。

## 6. 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収縮反応に対するシナムアルデヒド及びケイヒ酸の作用

シナムアルデヒドは, 1-3  $\mu$ g/mLで, マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対して顕著な抑制作用を示した (Fig.2, Fig.3)。10  $\mu$ g/mLでは, 最大抑制を示した後, 顕著な収縮の戻りが観察された。60分間の最大抑制率に基づ



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

Cinnamaldehyde was dissolved in DMSO and was added to the bath at the point indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) was stopped at the point indicated.

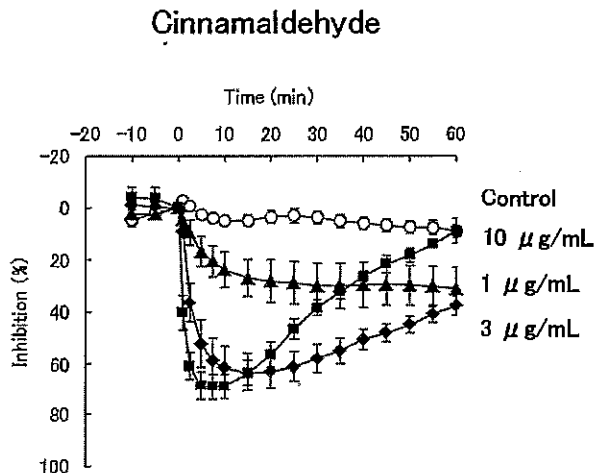


Fig. 3. Effect of cinnamaldehyde on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Cinnamaldehyde was dissolved in DMSO. Vertical bars indicate the SE from the mean of 4-5 experiments.

づき算出した50%抑制に要する濃度であるIC50値は1.9  $\mu$ g/mL (14.4  $\mu$ M) であった。

ケイヒ酸は, 30-300  $\mu$ g/mLでtwitch収縮反応を抑制し, IC50値は133.3  $\mu$ g/mL (900  $\mu$ M) であった (Fig.4)。

### 2. シナムアルデヒド及びケイヒ酸の経口投与後の血漿のHPLC分析

シナムアルデヒドとケイヒ酸の1  $\mu$ g/mLメタノール溶液をHPLCに注入し, 得られたピークのUV吸収スペクトルを比較すると, シナムアルデヒドとケイヒ酸は, 異なる極大吸収波長を示し, シナムアルデヒドは291nm前後であり, ケイヒ酸は277nm前後であった (Fig.5)。また, シナムアルデヒドの溶出時間 (約9.5分) は, ケイヒ酸 (約10.4分) よりも早かった。

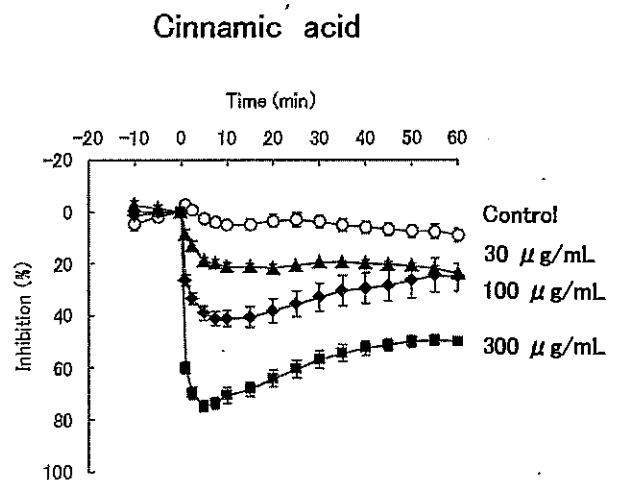


Fig. 4. Effect of cinnamic acid on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Cinnamic acid was dissolved in DMSO. Vertical bars indicate the SE from the mean of 4 experiments.

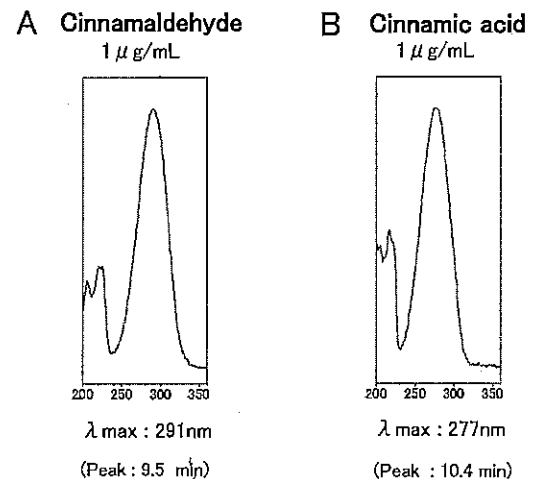


Fig. 5. UV spectra of cinnamaldehyde and cinnamic acid  
Cinnamaldehyde and cinnamic acid were dissolved in MeOH. UV spectrum data was obtained by HPLC-PDA method.

シンナムアルデヒド300 mg/kg経口投与1時間後のマウス血漿のHPLCクロマトグラムには、シンナムアルデヒドの溶出位置にピークは検出されなかった (Fig.6). 一方、ケイヒ酸の溶出時間にピークが検出され、極大吸収波長はケイヒ酸と同じ277nm前後であった (Fig.6).

ケイヒ酸の30, 100及び300 mg/kg経口投与後1時間の時点での血漿中ケイヒ酸濃度 (平均) は、それぞれ0.4  $\mu$ g/mL, 3.2  $\mu$ g/mL 及び 22.7  $\mu$ g/mLであった (Fig.7A). また、シンナムアルデヒド100及び300 mg/kg経口投与後1時間の時点での血漿中ケイヒ酸濃度 (平均) は、それぞれ1.4  $\mu$ g/mL及び41.6  $\mu$ g/mLであった (Fig.7B). ケイヒ酸及びシンナムアルデヒドは、300 mg/kgで血漿中ケイヒ酸濃度がかなり高い値を示した.

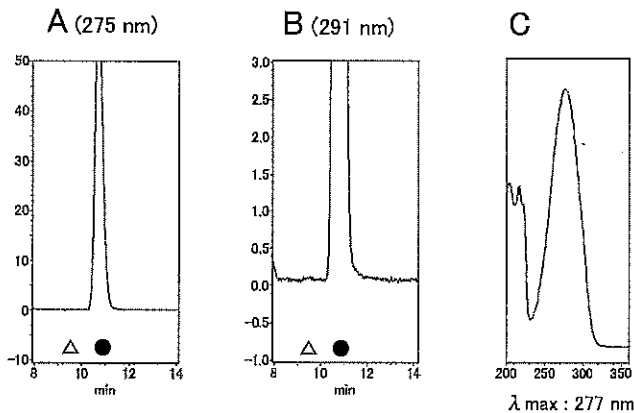


Fig. 6. HPLC chromatograms (A,B) and UV spectrum (C) of the plasma of cinnamaldehyde-administered mice. Blood was collected 1 h after oral administration of cinnamaldehyde at 300 mg/kg. Symbols show the retention time of cinnamaldehyde ( $\Delta$ ) and cinnamic acid ( $\bullet$ ).

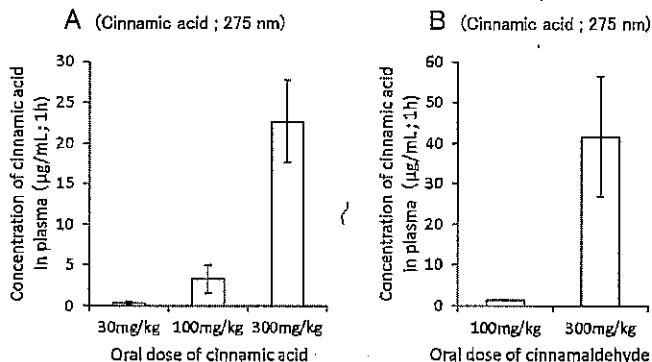


Fig. 7. Concentration of cinnamic acid in the mouse plasma obtained after oral administration of cinnamic acid (A) or cinnamaldehyde (B). Blood was collected 1h after oral administration of cinnamic acid (A) and cinnamaldehyde (B). Vertical bars indicate the SE from the mean of 3-5 mice.

ケイヒ酸100 mg/kg経口投与後30分, 1時間及び2時間の時点での血漿中ケイヒ酸濃度 (平均) は、それぞれ4.5  $\mu$ g/mL, 3.2  $\mu$ g/mL及び0.5  $\mu$ g/mLであった (Fig.8). 投与後30分で最高濃度に達し、2時間では大きく低下するという血中濃度推移を示した.

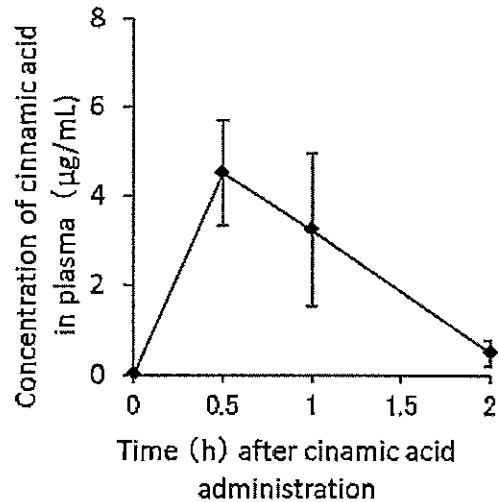


Fig. 8. Concentration of cinnamic acid in the mouse plasma. Blood was collected after oral administration of cinnamic acid at 100 mg/kg. Vertical bars indicate the SE from the mean of 4-5 mice.

## 考 察

マウス精管の電気刺激収縮に対して、非特異的な鎮痙薬であるパパベリンは低濃度で抑制作用を示し、L型カルシウムチャネル遮断薬で血管拡張薬であるニフェジピンはさらに低濃度で抑制作用を示すことなどから<sup>10)</sup>、パパベリン様の鎮痙作用やカルシウム拮抗薬様の収縮抑制を検出し、効力比較するのに適した評価系であると考えられ、天然成分物質の生物活性試験として用いてきている<sup>10-12)</sup>.

シンナムアルデヒドは、マウス及びモルモットの摘出腸管の自発性収縮をわずかに低下させ、アセチルコリンやヒスタミンによる収縮を抑制し、パパベリン様の非特異的な鎮痙作用を有するとされている<sup>6,7)</sup>。また、シンナムアルデヒドの抑制効力は、パパベリンの約7-10%に相当すると報告されている<sup>6,7)</sup>。今回、シンナムアルデヒドは、マウス精管の電気刺激収縮に対して顕著な抑制作用を示した。シンナムアルデヒドの抑制効力 (IC<sub>50</sub>値:14.4  $\mu$ M) は、以前実施のパパベリン (IC<sub>50</sub>値:1.6  $\mu$ M)<sup>10)</sup> よりも弱く、約9倍高い濃度が必要であり、腸管標本で報告されている効力差とほぼ同程度と考えられた。

シンナムアルデヒドは、水に溶けにくい揮発性の精油成分であり、適用後の時間経過で電気刺激収縮抑制作用がある程度低下することが考えられるが、シンナムアルデヒド

の10 $\mu$ g/mLを適用した場合は、最大抑制を示した後、低濃度適用の場合と異なり、大きな収縮の戻りが観察された。抑制作用とその反対の作用も有している可能性があると考えられた。

シンナムアルデヒドは、モルモット摘出心房に対して10-100 $\mu$ g/mLで約1分程度の潜時の後、心収縮力の増加と拍動数の増加が起こし、反復投与により、抑制に転じることが報告されている<sup>6,7)</sup>。このシンナムアルデヒドの強心作用には内因性カテコールアミンの遊離作用が関与していると考えられている<sup>6,7)</sup>。精管では、交感神経の終末部からノルアドレナリン(カテコールアミン)とATPが遊離し、twitch収縮反応が生じているとされている<sup>17)</sup>。シンナムアルデヒドの10 $\mu$ g/mLで、電気刺激収縮に対する最大抑制の後に大きな収縮の戻りがみられたのは、シンナムアルデヒドのカテコールアミン遊離作用が関係している可能性があるかもしれない。

シンナムアルデヒドは、ラット胸部大動脈の収縮反応に対して、一酸化窒素NOが関与する血管内皮依存性の弛緩作用と内皮非依存性の弛緩作用を示すことが報告されている<sup>8)</sup>。シンナムアルデヒドは前述の腸管や血管において収縮抑制作用が報告されていることから、今回の精管においてみられた収縮抑制作用も、共通の平滑筋収縮機構に対する非特異的な抑制作用が関与している可能性が考えられた。

ケイヒ酸は、マウス精管の電気刺激収縮に対して抑制作用を示した。ケイヒ酸の抑制効力は、IC50値の比較では、シンナムアルデヒドよりもかなり弱く60倍以上高い濃度が必要であった。またパパベリンよりも500倍以上高い濃度が必要であり、ケイヒ酸の鎮痙作用は弱いものと考えられた。

今回、マウス血漿のHPLC分析でのスペクトル解析では、シンナムアルデヒドとケイヒ酸の極大吸収波長は、それぞれ、291nm前後と277nm前後であり、今回の血漿中のケイヒ酸の定量には275nmの波長を用い、シンナムアルデヒドの検出のために291nmも使用した。なお、ラット血中のシンナムアルデヒドとケイヒ酸の分析法が報告されており<sup>16)</sup>、その中では290nmと276nmが用いられている。今回の波長とほぼ同じであった。

ラットにおけるシンナムアルデヒドの体内動態が報告されており<sup>14,15)</sup>、シンナムアルデヒドはラットの血液中では不安定であり、静脈内投与後に、大部分のシンナムアルデヒドは速やかに酸化されてケイヒ酸になるとされ、静脈内投与後のシンナムアルデヒドの半減期は1.7時間であると報告されている<sup>14)</sup>。また、シンナムアルデヒドの250または500mg/kgの経口投与での最高血中濃度は1 $\mu$ g/mLのオーダーであり、50mg/kgでは検出されなかったことが報告されている<sup>14)</sup>。また、シンナムアルデヒドは3.79 $\times$ 10<sup>-4</sup>mol/kg(50mg/kg)の胃内投与後、胃腸管において少なく

とも一部がケイヒ酸に代謝され、肝臓でほぼ完全にケイヒ酸に代謝され、ラットの血液中に入ることが報告されている<sup>15)</sup>。なお、血液中での不安定の原因は酵素的酸化によるケイヒ酸への変化と血液タンパクのアミノ酸との結合が考えられている<sup>16)</sup>。

ラットにおけるケイヒ酸の体内動態については、ケイヒ酸は、経口投与後に速やかに吸収され、その後、主として馬尿酸に代謝されると報告されている<sup>15)</sup>。

今回、マウスにおけるシンナムアルデヒドの体内動態を検討したところ、シンナムアルデヒドの100-300mg/kg経口投与後1時間の時点の血漿中には、シンナムアルデヒドは検出されず、異なるピークが検出された。保持時間と最大吸収波長がケイヒ酸と一致し、検出されたピークはケイヒ酸と判断された。

ケイヒ酸の100mg/kg経口投与後30分の時点でマウス血漿中にケイヒ酸が検出され、投与後2時間の時点のケイヒ酸濃度は、1時間の時点の値と比較して大きく減少した。ケイヒ酸は、マウスにおいて吸収性が高く、代謝が早いと考えられた。一方、シンナムアルデヒドは、マウス体内においてもケイヒ酸に変化するものと考えられた。今回のマウスにおけるシンナムアルデヒドとケイヒ酸の体内動態は、報告されているラットにおける体内動態の結果と類似性が高いと思われる。

シンナムアルデヒドの300mg/kgの経口投与後1時間の時点では、ケイヒ酸の濃度は非常に高い値を示したが、100mg/kgに投与量を下げた場合には、ケイヒ酸の濃度はかなり低い値となった。シンナムアルデヒドは、揮発性が高く、アルデヒド基は反応性が高いために、低用量であるほど、生体内で影響を受けて、血漿中のケイヒ酸の濃度が低くなる可能性が考えられた。

マウスにケイヒ酸を経口投与した場合の血漿中濃度は、300mg/kgの1時間の時点で、20 $\mu$ g/mL程度と高い濃度に達した。一方、ケイヒ酸の電気刺激収縮抑制作用のIC50値は133 $\mu$ g/mLであり、またケイヒ酸100mg/kgの実験では、投与後2時間で大きく血漿中濃度は低下することから、ケイヒ酸及びシンナムアルデヒド由来のケイヒ酸による鎮痙作用の発現と持続性には、大きな期待はできないものと思われる。

マウス精管の電気刺激収縮実験は、神経または筋肉に作用して生物活性を示す物質を高感度に検出できる評価系であると考えられることから、インビトロの薬効評価系として緩和な薬理作用が期待される生薬成分の生物活性の評価に有用であると思われる。また、インビトロでの評価と合わせて、どの程度の血中濃度に達するかをみるために、マウスでの体内動態の検討を必要に応じて行っていく予定である。

謝辞：体内動態研究の一部は、平成26年度富山県薬事研究会の生物部会において実施したものであり、関係各位に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 第十六改正日本薬局方解説書，廣川書店 (2011)，D-221 (ケイヒ)
- 2) 日本生薬関係規格集2014 (監修:合田幸広,袴塚高志)，じほう (2014)，p.117, 129, 256
- 3) 原田正敏, 尾崎幸紘: 桂皮の薬理学的研究 (第1報) Cinnamaldehydeの中樞作用, 薬学雑誌, 92, 135-140 (1972)
- 4) 常用生薬の成分定量—天然薬物分析データ集— (編集: 原田正敏), 廣川書店 (1989), p.134
- 5) 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.191
- 6) 和漢薬物学 (編集: 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男), 南山堂 (1982), p.60
- 7) Harada M., Yano S.: Pharmacological studies on Chinese Cinnamon. II. effects of cinnamaldehyde on the cardiovascular and digestive systems, Chem. Pharm. Bull. 23, 941-947 (1975)
- 8) Yanaga A., Goto H., Nakagawa T., Hikiami H., Shibahara N., Shimada Y.: Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta, Biol. Pharm. Bull., 29, 2415-2418 (2006)
- 9) Imamichi T., Nakamura T., Hayashi K., Kaneko K., Koyama J.: Different effects of cinnamic acid on the  $O_2^-$  generation by guinea pig macrophages stimulated with a chemotactic peptide and immune complex, J. Pharmacobio-Dyn., 13, 344-352 (1990)
- 10) 川筋 透: マウス精管の電気刺激収縮に対するシャクヤク成分及び関連化合物の作用, 富山県薬事研究所年報, 42, 27-32 (2015)
- 11) 川筋 透, 横田洋一, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別薬理試験 (3) マウス精管の電気刺激収縮に対するシャクヤクエキスの作用, 富山県薬事研究所年報, 39, 51-60 (2012)
- 12) 川筋 透: マウス精管での電気刺激収縮反応に対する芍薬甘草湯の作用, 富山県薬事研究所年報, 40, 46-50 (2013)
- 13) 川筋 透, 松永孝之: マウスにおけるジオスメチン及びジオスミンの体内動態の検討, 富山県薬事研究所年報, 41, 26-32 (2014)
- 14) Yuan J., Dieter M.P., Bucher J.R., Jameson C.W.: Toxicokinetics of cinnamaldehyde in F344 rats, Food Chem. Toxicol., 30, 997-1004 (1992)
- 15) Chen Y., Ma Y., Ma W.: Pharmacokinetics and bioavailability of cinnamic acid after oral administration of Ramulus Cinnamomi in rats, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 34, 51-56 (2009)
- 16) Yuan J., Bucher J.R., Goehl T.J., Dieter M.P., Jameson C.W.: Quantitation of cinnamaldehyde and cinnamic acid in blood by HPLC, J. Anal. Toxicol., 16, 359-362, (1992)
- 17) 毒性試験講座7 機能毒性学 (責任編集: 福原武彦, 小野宏), 地人書館 (1990), p.67-68, p.229-233

# V 資 料

# 富山シャクヤクのブランド化推進事業報告（平成24－26年度） 選抜品種の特性比較

## Comparative Study on Property of the Selected Cultivars of *Paeonia lactiflora*

川筋 透, 田村 隆幸, 横田 洋一, 宮本 (山口) 朋美, 本田 裕恵, 竹林 憲司,  
大江 勇, 高田 正明, 松永 孝之

Toru KAWASUJI, Takayuki TAMURA, Yoichi YOKOTA, Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO, Hiroe HONDA,  
Kenji TAKEBAYASHI, Isamu OE, Masaaki TAKATA, Takayuki MATSUNAGA,

### 1. はじめに

シャクヤク（芍薬）の根は、多くの漢方処方に配合されている重要生薬であり、花を観賞する目的でも栽培されることから多くの品種が作出されている。切花用品種の中に、薬用としても利用価値の高い品種の存在が、これまでの品質調査研究から明らかになっている。

富山シャクヤクのブランド化推進事業では、薬用植物指導センターで栽培しているシャクヤクの中から、優れた品種を探し出し、「富山シャクヤク」としてブランド化（差別化）を図り、「富山のくすり」の原料となるシャクヤクの県内における栽培普及と利用促進を目指している。

現在、国内で流通している薬用シャクヤクの9割以上は安価な中国産であり、経済成長を続ける中国での需要増で、価格高騰がさらに進んでいくと、使用が困難になるリスクがある。この事業によって、価格高騰のリスクを下げ、安定供給の維持につながることを期待される。また、高品質で安心の富山県産シャクヤクを使用した製品への期待がある。さらに、耕作放棄地や休耕田の有効活用につながることも期待されている。

全所的に取り組んでおり、薬効評価は、薬剤薬理研究課とバイオテクノロジー和漢薬研究課が担当し、成分分析は、医薬品試験課が担当し、栽培等は薬用植物指導センターが担当している。

ブランド化、すなわち差別化のために、薬効、成分及び栽培面で優れた品種を探し出し、富山ブランド用推奨品種を選定するための調査研究を行っている。優良な薬用品種としては、大和シャクヤクの「梵天」があるので、梵天と比較したデータを収集している。

シャクヤクの薬効としては、消炎鎮痛作用、鎮痙作用、血管拡張作用などがあり、分担して薬効評価を行っている。また、成分分析では日本薬局方の品質規格成分であるペオニフロリンなどの成分定量を行っている。

平成22・23年度の前事業では、まず62品種（8年栽培品等）について、エキスを調製し、試験管内レベルでの複数の薬理試験と成分分析を行い、その結果に基づいて、ペオニフロリン含量が十分に高く、優良薬用品種とされる「梵天」よりも薬効が強い可能性のある6品種をブランド候補品種として一次選抜した。図1では、品種1から品種6までの番号で表している。

平成24年度から平成26年度までの事業（第1期）では、選抜された6品種の中から、生産性や商品性も良好で、高い薬効が期待できる品種をさらに絞り込むため、6品種を同じスタートラインに置き、同じ生育条件下で栽培の本試験を行い、新たに掘り取った4年栽培品（平成25年産）で、薬効の再評価・成分の再分析等を実施し、品質の安定性・再現性を検討した。栽培面・成分含量・生物活性の観点から、ペオニフロリンを3.0%以上含有し、十分な薬効が期待できるブランド候補品種であることが確認された。

平成27年度からは主として栽培普及・利用促進のための事業を進めている。

今回、第1期において一次選抜品種を栽培し、成分分析と薬効評価を実施した結果について報告する。

### 2. 栽培面での評価（図2）

栽培面での有用性については、評価項目としては、「梵天」と比較し、根の太さが十分にあり、根の病害虫や根の腐り・黒色化が少ないこと、根の取扱いやすさなどを点数付けして合計点で比較した。切花としての有用性については、販売

実績等に基づき、梵天を1としたときに3点ないし2点として点数付けをして評価に加えた。

病害虫被害の程度や、腐りが生じる頻度が高かった品種は、推奨品種とするには問題があり、点数が低くなった。収量は、乾燥していない根の重量で評価した。

合計点から、栽培面での順位は、品種1, 3, 2, 4, 6, 5の順となった。2品種（品種1と3）は、梵天とほぼ同等の収量があり、根の病虫害等が少なかった。

### 3. 成分分析及び薬効評価の方法

#### (1) エキスの調製 (図3)

薬効評価と成分分析のためのサンプル調製では、日本薬局方のペオニフロリン定量法での抽出法を準用し、50%メタノールエキスを調製した。

平成25年の秋に根を掘り取り、日陰で3カ月風乾し、その後凍結乾燥し、粉碎して粉末を得た。粉末を50%メタノールで加熱還流抽出し、減圧濃縮と凍結乾燥で、エキスを調製した。

#### (2) 成分分析の方法 (図4)

成分分析では、定量に必要な標準品が入手可能であった代表的な10成分について含有量の測定を行った。UPLCで一斉分析し、エキス中の含量%を求め、それにエキス収率をかけて生薬中の含量%を求めた。ペオニフロリン類の4成分、没食子酸類の3成分、それ以外にカテキン、安息香酸及びペオノールについて含有量測定を行った。

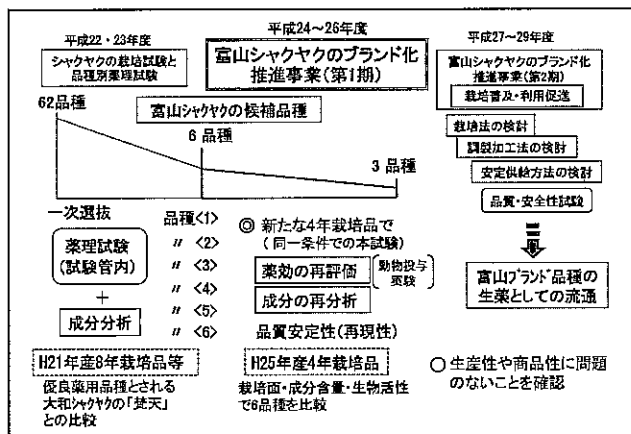


図1 富山シャクヤクのブランド化推進事業の第1期(平成24-26年度)の概要

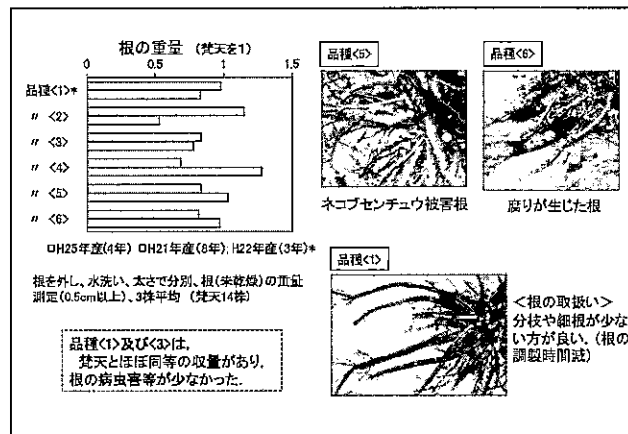


図2 根の重量、病虫害及び外観

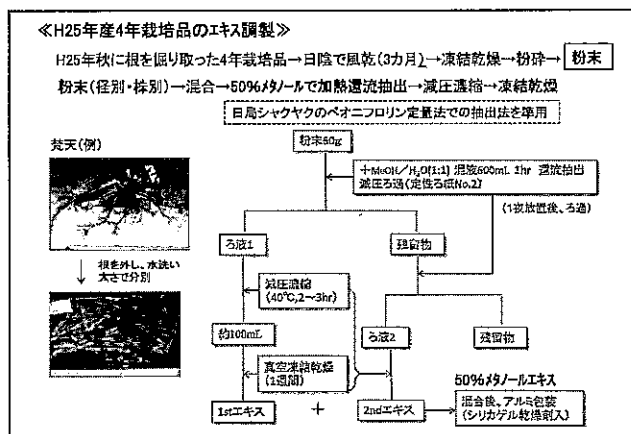


図3 薬効評価・成分分析のためのサンプル調製

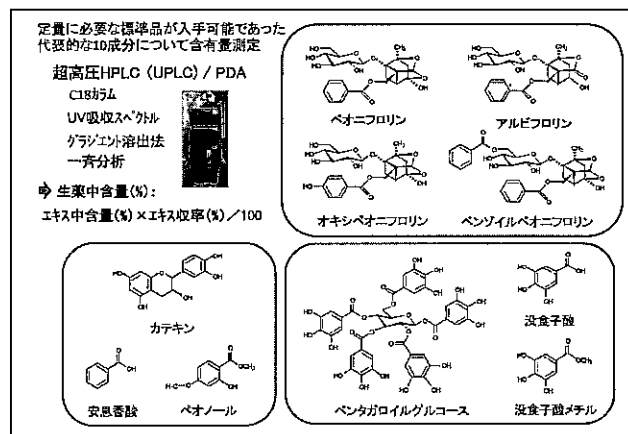


図4 成分分析の方法

(3) 薬効評価の方法 (図5)

図5に示す複数のインビトロ試験で、薬効の再評価を行った。また、動物に投与してインビボでの効果も検討し、品種選抜での参考データとした。なお、インビトロの実験方法の詳細については、成分分析方法の詳細とともに、これまでに平成21年産8年栽培品等を用いた研究報告(薬事研究所年報)の中で記載した。

4. エキス収率 (図6)

エキス収率について採取年別のデータを比較したところ、平成22年産の1品種については、エキス収率が特別に低いことがわかった。これは、他のエキスと異なり3年栽培品を用いたことなどが影響したものである。そのため、生物活性の評価においては、同一条件で栽培したH25年産4年栽培品でのデータを重視して評価を行った。

5. 薬効評価結果

(1) 電気刺激収縮抑制作用 (図7)

マウス精管を用いた電気刺激収縮実験では、神経刺激によって筋肉の収縮が生じており、神経と筋肉に対する薬物の作用を評価することができる。抑制作用がみられた場合には鎮痙鎮痛作用を有する可能性があり、こむら返りや腹痛に対する改善効果のあることが期待される。

図7に採取年別のデータを示す。同一条件で栽培した平成25年産のデータは、濃い色のカラムで表している。図の下で幅を示した線では、梵天の活性のバラツキの範囲を表している。また、矢印で幅を示した破線は、梵天と同等またはそれ以上の活性であった範囲を表している。

2つの範囲は重なっており、結論として、6品種エキスは、梵天とほぼ同程度の活性であった。

薬効評価		
評価項目	インビトロ試験 (試験管内)	インビボ試験 (動物投与)
血管作用 消化管作用 (川筋)	ラット胸部大動脈での血管弛緩作用	血圧降下作用
抗炎症作用 (本田)	マウス精管での電気刺激収縮抑制作用	消化管運動機能調整作用
鎮痛作用 (宮本)	マクロファージ培養細胞株でのIL-6産生抑制作用	エンドキシンショックマウスでの効果
抗酸化作用 (松永)	マクロファージ培養細胞株でのPGE2産生抑制作用	ホリマリン疼痛に対する効果
	ラジカル消去作用 安定化ラジカル化合物ジフェニルピクリルヒドrazil (DPPH) の還元能	酸化ストレスにより発症する腎障害モデルでの効果

平成25年産4年栽培品でのインビトロ試験(薬効の再評価)  
品質安定性(再現性)の確認

インビボでの効果検討  
品種選抜での参考データ

図5 薬効評価(生物活性試験)の方法

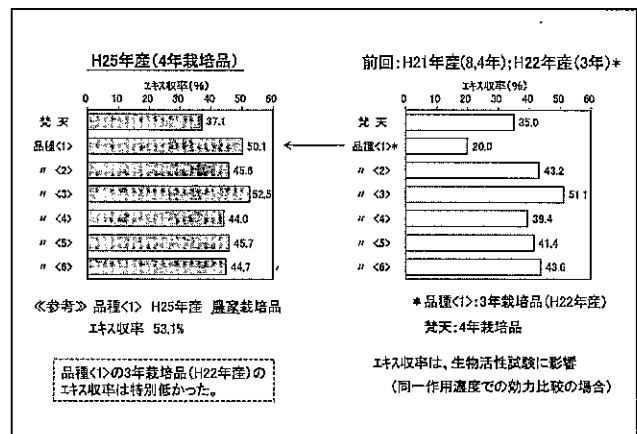


図6 採取年別データの比較 <<エキス収率>>

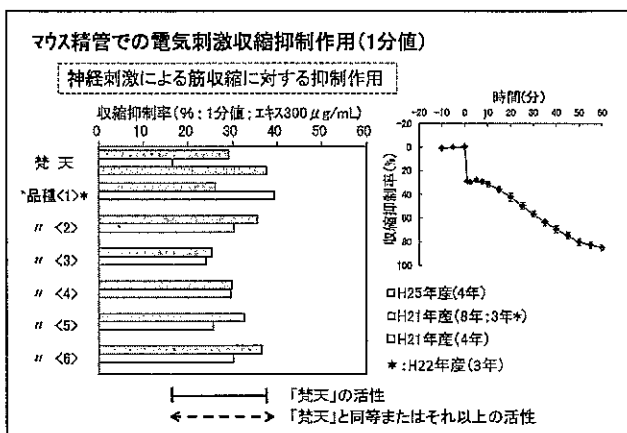


図7 採取年別データの比較 <<電気刺激収縮>>



(2) 血管弛緩作用 (図 8)

ラット胸部大動脈を用いた実験での「血管弛緩作用」についても、2つの範囲は重なった。

(3) 抗炎症作用 (図 9)

マクロファージ培養細胞株を用いた実験での「抗炎症作用」についても、梵天と同等レベルの活性であった。

(4) 鎮痛作用 (図10)

IC50値は、値が小さいほど活性が強いことを意味する。マクロファージ培養細胞株を用いた実験での「鎮痛作用」については、いくつかの品種で、梵天よりも活性が強い可能性がみられた。

(5) 抗酸化作用 (図11)

安定ラジカル化合物を用いた「抗酸化作用」についても、2つの幅は重なっており、活性は梵天と同等レベルであった。

6. 成分分析結果

(1) 梵天の成分パターン (図12)

図12の左下に、平成25年産の梵天中の成分含量を示す。ペオニフロリンは生薬中に2.5%存在していた。ペオノールはエキス中にほとんど検出できなかったため、9成分についてレーダーチャートで成分特性を表した。

一般に天然物は収穫時期や調製加工条件などの違いによって成分量が変化する。梵天についても成分含量に、ある程度のバラツキがみられた。

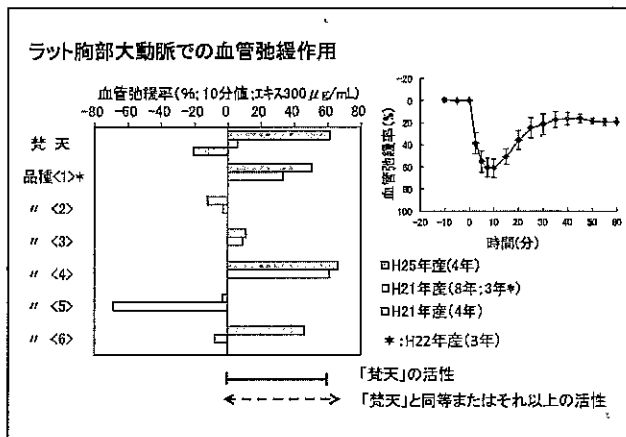


図 8 採取年別データの比較 <血管弛緩>

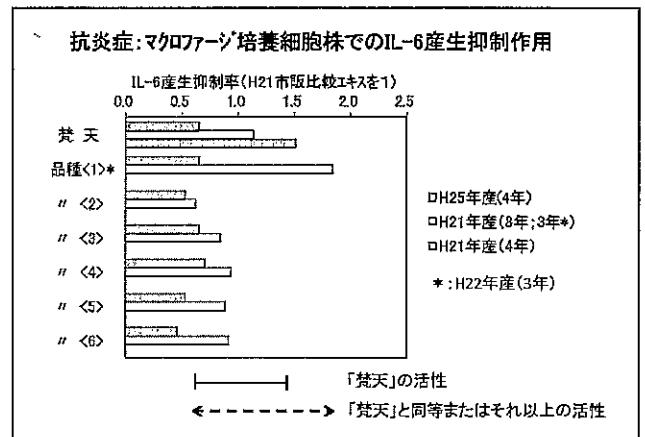


図 9 採取年別データの比較 <抗炎症>

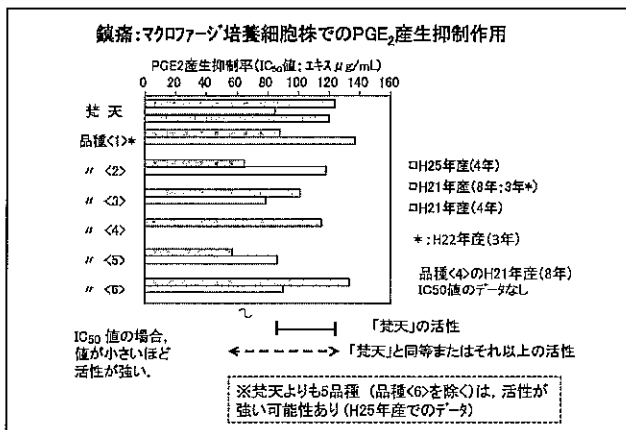


図10 採取年別データの比較 <鎮痛>

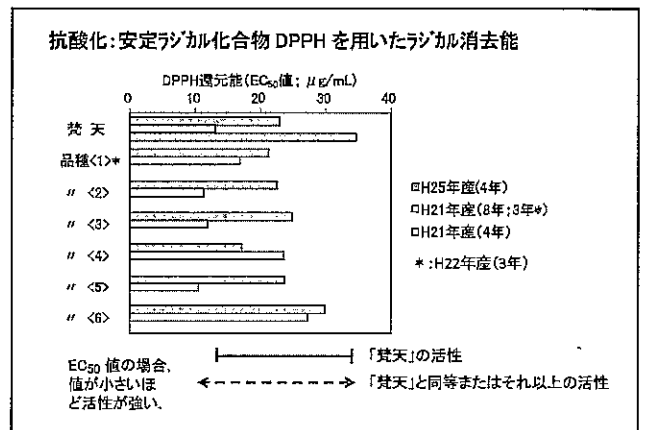


図11 採取年別データの比較 <抗酸化>

梵天の平成25年産4年栽培品の成分含量は、ほぼ中間的な値であったので、レーダーチャートではその値を基準にして相対比で表している。以下の図においても、梵天のH25年産のデータを基準として用いている。

(2) 選抜品種の成分パターン (図13, 14)

一次選抜品種6品種のうち、2品種は、梵天と比較して、カテキンが多い品種ということがわかった。別の2品種は、アルビフロリンを含まない品種であり、再現性がみられた。

(3) ペオニフロリンとアルビフロリン (図15)

ペオニフロリン含量は安定して2.0%以上が求められる。6品種はいずれも3.0%以上であり、ペオニフロリン含量が十分に高い品種であることが再確認された。一方、梵天のペオニフロリン含量は低値であった。

アルビフロリンは、桂枝茯苓丸など、いくつかの漢方エキス製剤において、シャクヤクの特異的成分として確認試験に用いられている。

6品種の中にはアルビフロリンをほとんど含まない品種があり、それらの品種は、利用範囲が狭くなるので、広く流通させる品種としては望ましくない品種と考えられる。

アルビフロリン含量が十分に高いことが望ましく、アルビフロリンが十分に高い品種は、3品種であった。

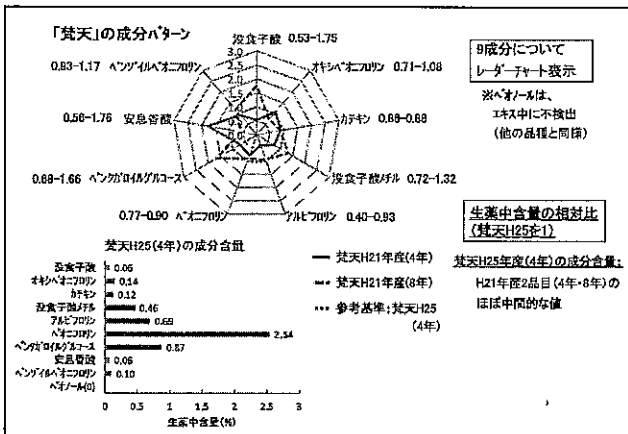


図12 「梵天」の成分パターン

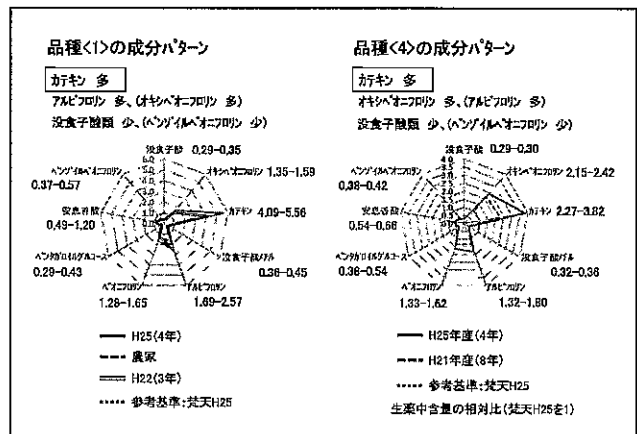


図13 品種<1>・品種<4>の成分パターン

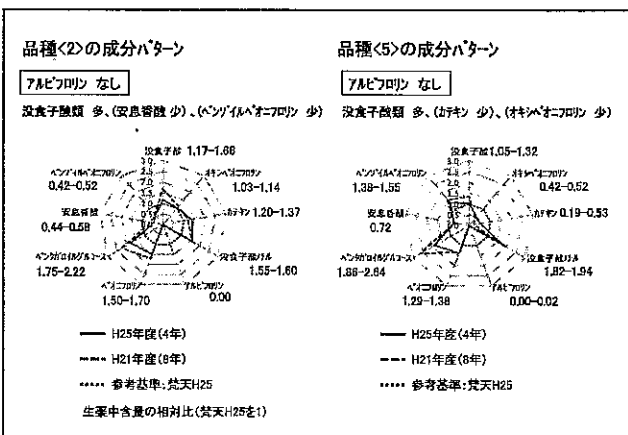


図14 品種<2>・品種<5>の成分パターン

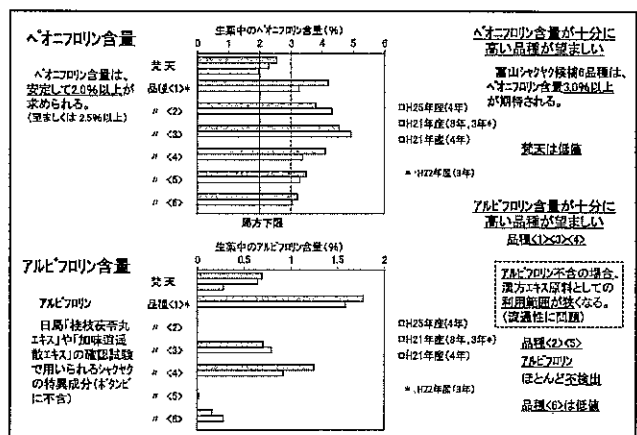


図15 採取年別データの比較 <<ペオニフロリン・アルビフロリン>>

## 7. まとめ

一次選抜 6 品種からの絞込みにおいては、便宜上、栽培面・成分含量・生物活性について順位点をつけて合計点を比較し、臨床研究（県から富山大学に委託；H26～28）への品種選定の時点で、3 品種に絞り込んだ。新たに掘り取った平成25年度 4 年栽培品を用いた薬効の再評価、成分の再分析に関する試験は、平成26年度に実施した。

薬効評価については、梵天とほぼ同等または、一部のインビトロの試験では、梵天よりも活性が強い可能性がみられた。

選抜品種のペオニフロリン含量は、局方下限の2.0%を超えて3.0%以上であり、品質安定性（再現性）が確認された。

以上のことから、選抜品種は、成分や生物活性の点から十分な薬効が期待できる品種であると考えられた。また、アルビフロリンを十分に含む品種は、流通性の点から好ましい品種と考えられた。

第1候補品種については、臨床研究用に局方規格に適合する製品が作られている。アルビフロリンを含み、カテキンが多いという成分特性を有する品種である。

平成27年度から平成29年度までの第2期の事業では、実生産規模での調製加工法等を確立し、高品質の生薬の安定供給体制の構築に向けて調査研究を行っていく予定である。

# 「平成27年度分析データ信頼性確保事業」事業報告

External quality control for laboratories of pharmaceutical companies in 2015

竹林 憲司, 横田 洋一, 大戸 幹也

Kenji TAKEBAYASHI, Yoichi YOKOTA and Mikiya OHTO

富山県における医薬品生産金額は近年順調な伸びを示しており、平成26年で全国第2位（6,163億円）となり、さらなる躍進が期待されている。その躍進のために取り組むべき戦略の1つとして、平成25年富山県医薬品産業活性化懇話会では「製造技術力等の強化」（品質管理技術力の向上など）が提言されており、県内製薬企業の技術力を向上させるため、様々な施策を実施しているところである。その一環として、一般社団法人富山県薬業連合会との共同事業で、県内製薬企業の品質管理部門を対象に外部精度管理を実施し、県内製薬企業の試験検査能力の調査及び技術指導を行う本事業を平成21年度から実施している<sup>1,2)</sup>。

平成26年度においては、pH測定、水分測定、融点測定、定量（HPLC法）及び溶出試験について実施したところ、「満足」「疑わしい」の割合が92%であったが、単純な操作の試験においても不満足な結果となる事例などがあったことから、今後さらに改善すべき課題があると考えられた<sup>3)</sup>。そのため平成27年度においては、前年度に問題があった試験項目を中心とし、定量（UV法）を追加して実施し、結果解析、原因調査及び改善指導を行ったので、その概要について報告する。

## 1. 実施方法

### (1) 試験項目及び試験方法

試験項目は、L-パリンのpH測定、(+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定、イノシンの定量（UV法）、日局ピオグリタゾン塩酸塩錠の定量（HPLC法）、日局アラセプリル錠50mgの溶出試験とした（下表参照）。なお、pH測定、水分測定及び定量（UV法）については、市販試薬を対象品目として用い、参加企業に対象品目名を知らせなかった。

イノシンの定量（UV法）は、局外規の試験方法の一部（希釈方法等）を変更して実施した。水分測定は試料0.1gを直接滴定で測定した。その他の試験項目については、日本薬局方に準じた試験方法とした。

表：試験項目及び参加企業数等について

試験種別	試験項目	対象品目	主な使用機器	参加企業数
原薬試験	pH測定	L-パリン	pH計	40
	水分測定	(+)-酒石酸ナトリウム二水和物	水分計（容量滴定法）	31
	定量（UV）	イノシン	分光光度計、乾燥機、pH計	40
製剤試験	定量（HPLC）	日局ピオグリタゾン塩酸塩錠	HPLC	34
	溶出試験	日局アラセプリル錠50mg	溶出試験器、分光光度計	15

### (2) スケジュール

平成27年11月4日に実施説明会を開催し、参加企業に試験方法等を説明して試料等を配布し、当所への試験結果報告期限を12月18日とした。報告内容を取りまとめて下記(3)の方法により評価し、その評価結果に応じて原因調査、改善指導及び再試験依頼等を実施した。また、平成28年3月22日に報告会を開催し、参加企業に対して結果を説明し、改善指導を行った。

なお、実施説明会においては、試験機器メーカー（平沼産業㈱）の技術担当者を外部講師として、水分計の適切な管理方法及び使用方法に関する講習会も併せて開催した。

(3) 評価方法

危険率1%でGrubbsの方法により検定を行い、異常値と判断されたデータを棄却した後、ISO/IEC Guide 43 (JIS Q 0043) に従い、ロバスト法の第1四分位数Q1, 第3四分位数Q3及びメジアン Q2 から次のようにZスコアを求めて判定した。

$$Z = (X_i - Q_2) / \{(Q_3 - Q_1) \times 0.7413\}$$

- |Z| ≤ 2 満足
- 2 < |Z| ≤ 3 疑わしい
- |Z| > 3 不満足

※Xi: 各参加企業の報告値

ただし、定量 (HPLC法) は「平均値±1%以内」の場合、水分測定は「平均値±0.5%以内」の場合、Zスコアの値に関わらず「満足」と判定することとした。

(4) 評価結果に基づく対応

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

2. 結果及び考察

(1) L-バリンのpH測定

報告されたpH値を評価したところ、L-バリンのpH測定については、40社のうち、29社が「満足」であり、6社が「不満足」、5社が「疑わしい」であった。また、そのうち9社は、再試験にて「満足」と判定される結果が得られた。(図1～3参照)

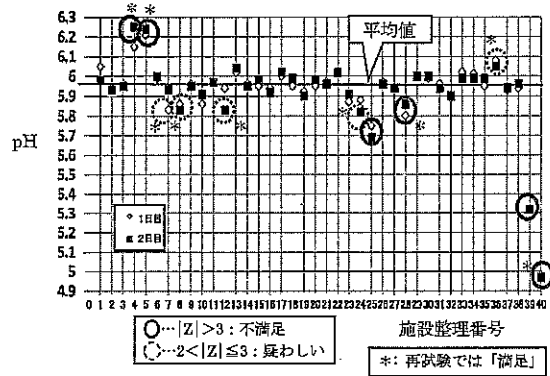


図1 L-バリンのpH測定の報告値

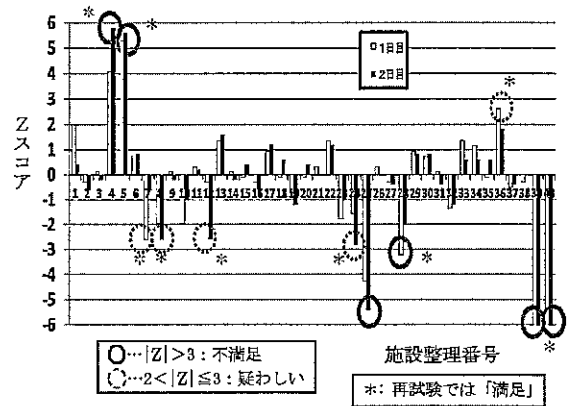


図2 L-バリンのpH測定のZスコア

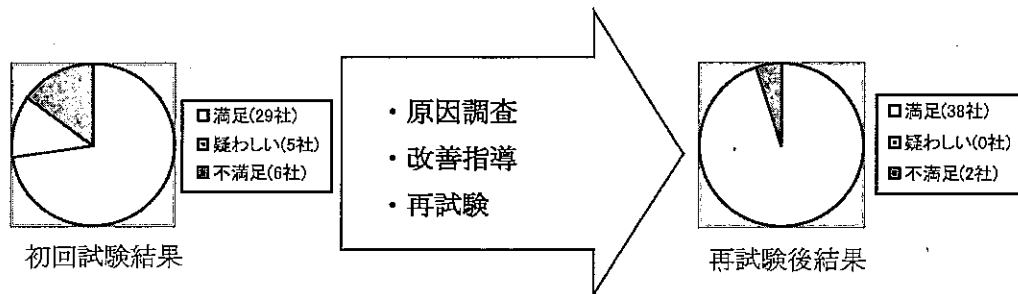


図3 L-バリンのpH測定の評価結果

原因調査を実施したところ、「電極感度が低かった」「器差があった」「電極を交換すると改善した」「最初は良好な値を示していたが徐々に値が下がっていった」などの事例があったことから、主に装置又は電極の異常が原因であったと考えられた。電極の汚れ、内部液量及び応答性等について日常点検を実施し、必要に応じて、内部液交換、電極洗浄又は電極交換等の対応を行うことが望ましいと考えられた。また、装置を2台以上所有している場合は、定期的に器差を確認することが望ましいと考えられた。

(2) (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定

31社のうち、27社が平均値±0.5%以内で「満足」であり、残り4社が「不満足」であった。また、その4社は再試験にて「満足」と判定される結果が得られた。(図4～6参照)

原因調査を実施したところ、適さない滴定溶媒を使用した事例(試料投入から完全溶解まで30分もかかり、水分値が高くなった)や、試料の結晶が完全に溶解していない状態で滴定を開始した事例(試料投入から滴定まで5分以内であり、水分値が低くなった)などがあった。試料が完全に溶解したことを確認して水分を測定すること、及び適した滴定溶媒を選択することが重要であると考えられた。また、装置状態を確認するために、今回は試料測定後に水を投入して測定した値を報告することとしたが、今後の使用においても同様の方法で装置状態を確認することが望ましいと考えられた。

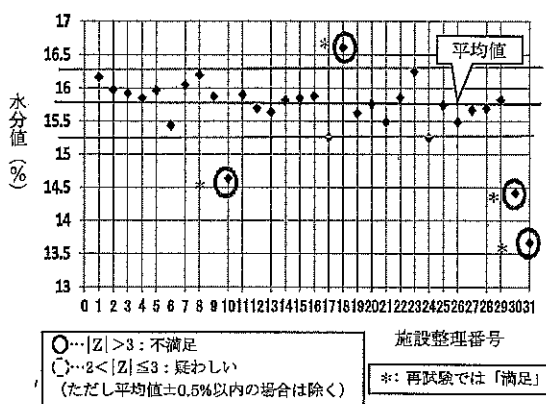


図4 (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定の結果値

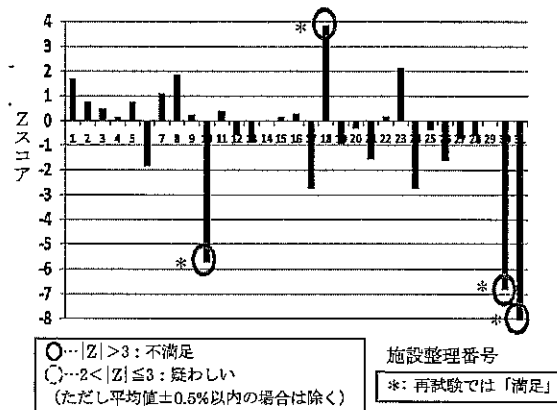


図5 (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定の結果Zスコア

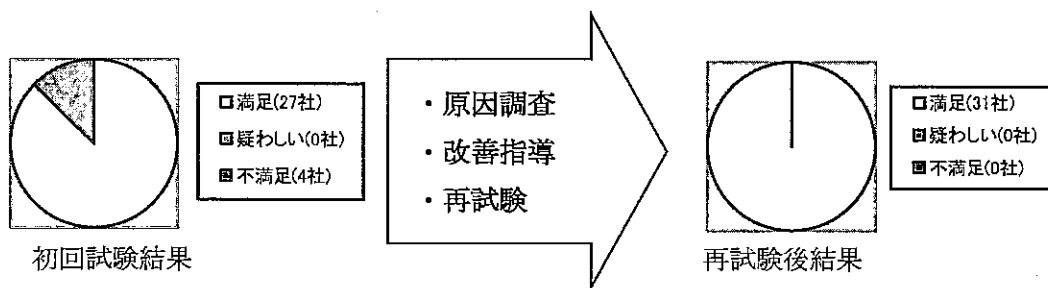


図6 (+)-酒石酸ナトリウム二水和物の水分測定の評価結果

(3) イノシンの定量 (UV法)

40社うち、「不満足」が3社、「疑わしい」が3社であった。また、そのうち3社は再試験にて「満足」と判定される結果が得られた。(図7～9参照)

原因調査を実施したところ、校正用光学フィルターを測定したときの吸光度値が異常であった事例、ブランク測定セルと異なるセルで試料測定していた事例などがあった。また、器具等からの汚染や不正確な調製作業は定量値に大きく影響する。校正用光学フィルターを用いて分光光度計を定期点検すること、装置を適切な方法で使用すること、器具等由来の汚染に注意して正確に調製することが重要と考えられた。

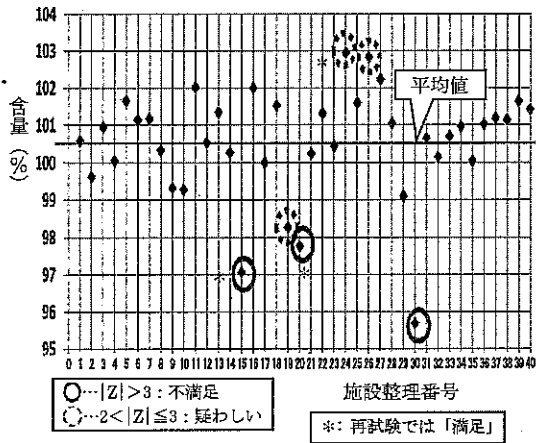


図7 イノシンの定量 (UV法) の報告値

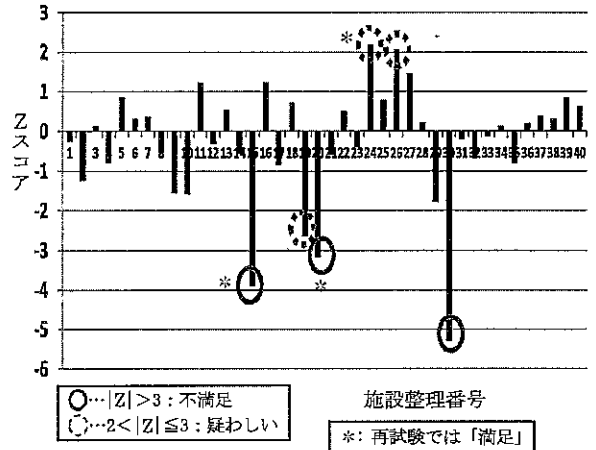


図8 イノシンの定量 (UV法) のZスコア

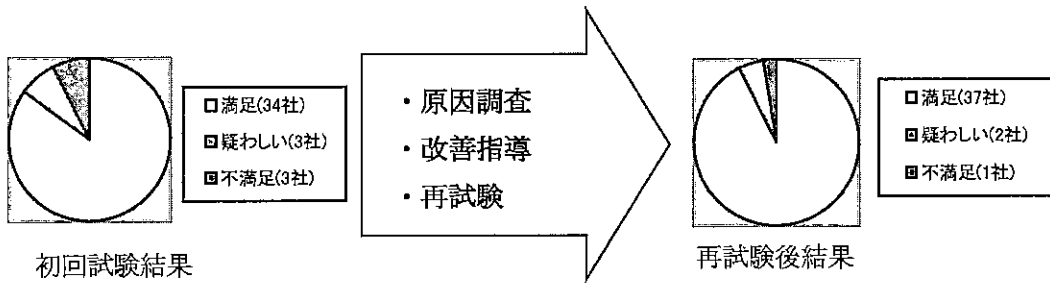


図9 イノシンの定量 (UV法) の評価結果

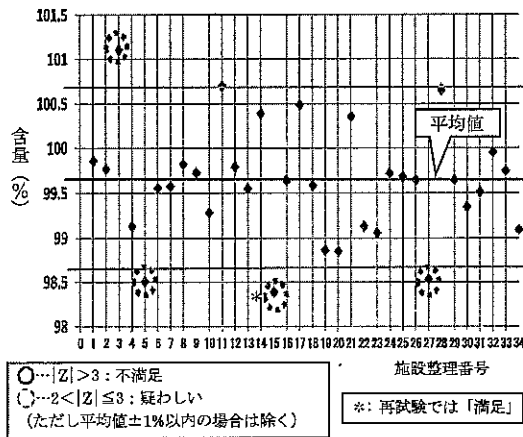


図10 日局ピオグリタゾン塩酸塩錠の定量試験 (HPLC法) の報告値

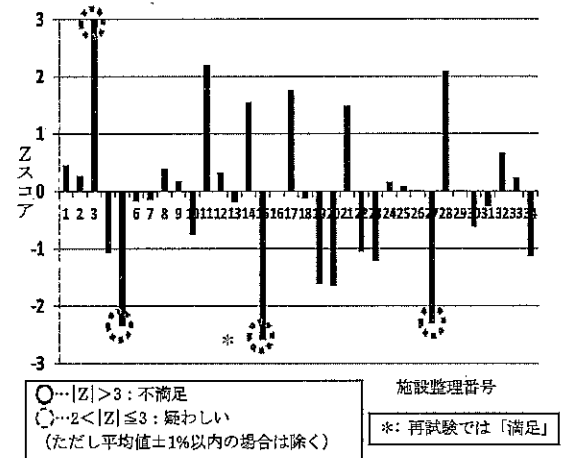


図11 日局ピオグリタゾン塩酸塩錠の定量試験 (HPLC法) のZスコア

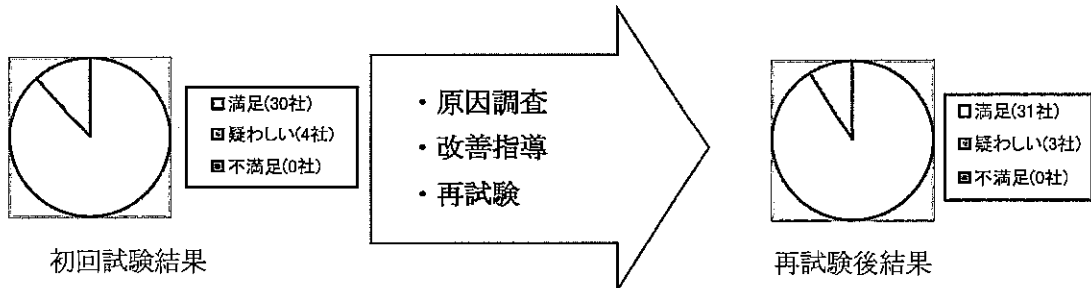


図12 日局ピオグリタゾン塩酸塩錠の定量試験 (HPLC法) の評価結果

(4) 日局ピオグリタゾン塩酸塩錠の定量試験 (HPLC)

34社のうち、30社が平均値±0.1%以内であり、残り4社が「疑わしい」であり、「不満足」はなかった。また、その「疑わしい」の4社のうち1社は、再試験にて「満足」と判定される結果が得られた (図10~12参照)。

原因調査を実施したところ、粉碎方法の違いや篩過の有無による影響は少なかったため、他の要因によるものと考えられた。秤量及び調製作業が含量値に大きく影響するので、基本的な操作を正確に実施するよう注意することが重要であると考えられた。

(5) 日局アラセプリル錠50mgの溶出性

15社のうち、「不満足」が1社、「疑わしい」が2社であった。また、そのうち2社は再試験にて「満足」と判定される結果が得られた (図13~15参照)。

原因を調査したところ、試験液を低い温度条件 (37°C 2hr) で加温脱気したために、脱気不足となり溶出率が高くなったと考えられる事例があった (通常は45°C 2hr)。日本薬局方においては試験液の脱気方法の例は記載されているが、実際は各社様々な方法で脱気を行っている。品目によっては、試験液を十分に脱気しないと溶出率が高くなる危険性があるので、適切な方法で試験液を脱気することが重要であると考えられた。

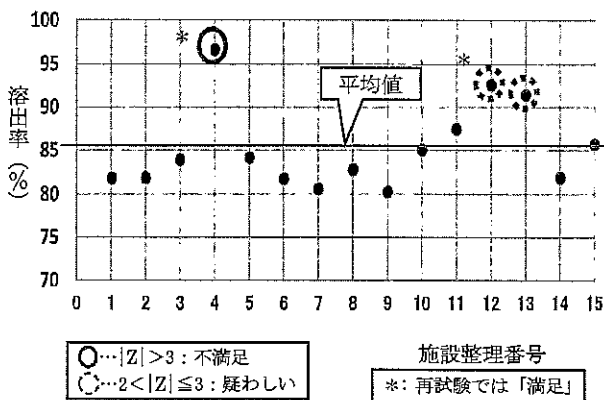


図13 日局アラセプリル錠50mgの溶出試験の報告値

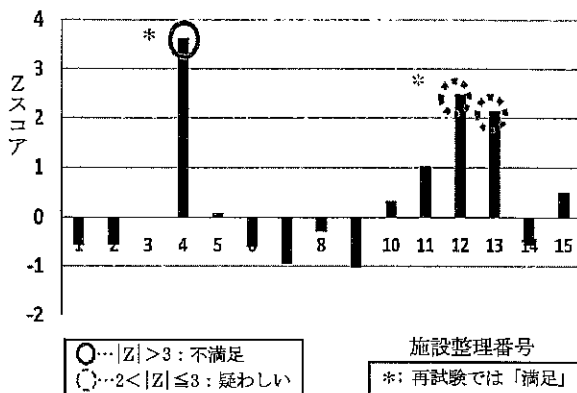


図14 日局アラセプリル錠50mgの溶出試験のZスコア

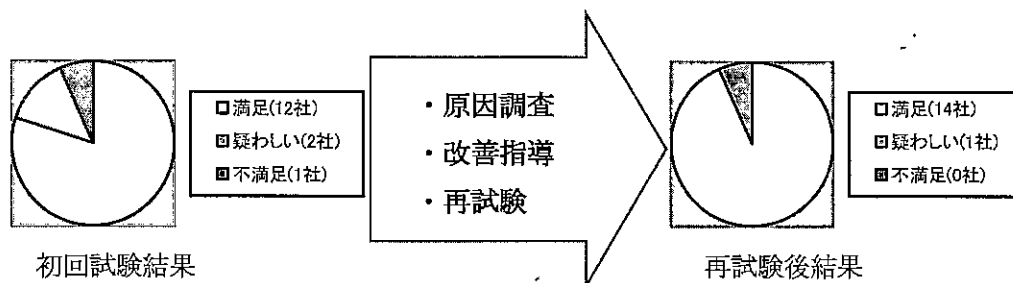


図15 日局アラセプリル錠50mgの溶出試験の評価結果

3. まとめ

今年度5項目の試験について実施したところ、全体として「満足」「疑わしい」の割合は91% (のべ160社中146社)であり、前年度の92% (のべ185社中170社) とほぼ同程度であった。

装置等の異常が原因と考えられた事例が多かったが、もし普段の使用時にその異常を発見することが可能であったならば、未然に防ぐことができたはずである。日常点検や過去のデータとの比較等により、異常の有無を使用の都度確認することが望ましいと考えられた。また、それでも発見することが難しい異常が発生する可能性もあるので、定期的な点検及び器差確認等も実施することが望ましいと考えられた。



今回、「不満足」の全企業が再試験を実施し、さらに「疑わしい」の企業の71%が再試験を希望して実施したことから、参加企業の改善に向けた積極的な姿勢が見られた。また、原因調査、改善指導及び再試験等により、大部分の参加企業は「満足」な結果を得ることができたので、技術の習熟度が上昇したと考えられた。今後とも、本事業及び相談対応などを通して、県内製薬企業の試験技術力の向上とその水準の維持に寄与し、県内医薬品産業のさらなる発展につなげていきたい。

## 文 献

- 1) 寺崎さち子, 横田洋一, 出町幸男, 製薬企業の品質管理部門を対象とした外部精度管理, 富山県薬事研究所年報, 39, 69-76
- 2) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成25年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 41, 41-47
- 3) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成26年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 42, 39-45

# 製剤開発・創薬研究高度化支援事業「トレーニングコース」の 実施について

## Advanced Project of Innovation in Pharmaceutical Development and Drug Discovery and Training Course Report

永井 秀昌

Hidemasa NAGAI

平成27年2月末に竣工した「製剤開発・創薬研究支援ラボ」の利活用を促進するため、平成27年度に実施したトレーニングコースについて紹介する。

### 1. 「製剤開発・創薬研究支援ラボ」設置の概要

#### (1) ラボ設置の経緯

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

#### (2) ラボの概要

- ①所在地 薬事研究所内（射水市中太閤山17-1）
- ②着工 平成26年10月6日
- ③竣工 平成27年2月27日
- ④改修面積 337㎡（薬事研究所1階西側の実験室エリアを改修）
- ⑤事業費 1億2,900万円

・施設改修費	4,600万円（平成26年度当初予算）
・備品購入費	6,900万円（ ” ” ）
・ ”	1,400万円（平成26年度11月補正予算）

#### (3) 活用目的

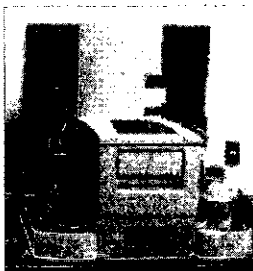
本県の医薬品研究開発及び医薬品産業の活性化に必要な製剤開発力の強化、研究開発の促進、人材の育成を目的とする。

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

## 2. ラボに新しく導入した装置について

### (1) 創薬研究装置

#### **分子間相互作用解析装置** (型式: Biacore T200 GEヘルスケア・ジャパン(株))



表面プラズモン共鳴法によりタンパク質、核酸、低分子化合物や細胞などの相互作用(結合・解離)を非標識でリアルタイムにモニターできる装置。

- ・物質間の結合特異性や結合親和性の解析、試料中の分析対象物質濃度の測定等が可能。
- ・バイオ医薬品や低分子医薬品の開発において初期の探索研究から製造、品質管理にいたるまで幅広い用途に利用可能。

※表面プラズモン共鳴法(Surface plasmon resonance: SPR)法:  
センサーチップ上の質量の変化を、表面プラズモン共鳴により生じる反射光の消失角度の変化として検出する方法

### (2) 製剤開発研究装置

#### **半自動 PTP 包装機** (型式: K-200KS-DK 大和化成工業(株))

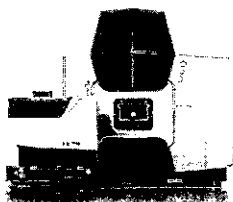


錠剤等をアルミなどの薄い金属とプラスチックで1個ずつ分けて包装(PTP包装)する装置。

包装の試験や包装後の錠剤を用いた安定性試験の実施に利用可能。

※PTP: press through package の略。錠剤やカプセル剤を指で押し出して取り出す包装方式。国内では医療用のほとんどの錠剤・カプセル剤の包装に用いられている。

#### **原子吸光光度計** (型式: AA-7000 (株)島津製作所)



医薬品や医薬品原料中の金属含有量を測定する装置。  
医薬品や医薬品原料の不純物試験等に使用される。

※2階特殊機器室に設置

#### **旋光計** (型式: P-2200 (株)日本分光)



光学活性物質の旋光度を測定する装置。

主に医薬品原料の品質確認に使用される。

光源: ナトリウムランプ(日本薬局方対応機種)

※2階暗室に設置

### 3. トレーニングコースの実施について

県内製薬企業によるラボの円滑な活用を図るため、平成27年度に厚生労働省の補助金を活用し、県内製薬企業の従業員を対象にトレーニングコースを実施したので、全体の概要と製剤技術分野のコースの具体的内容について報告する。

#### (1) トレーニングコースの概要について

分野	コース名	講師	実施日	参加者数
製剤技術	1. 味覚評価技術	(株)インテリジェントセンサーテクノロジー 阿部 憲太郎 氏	6/26(金)	35名
	2. 粒度分布測定技術	(株)島津製作所 洲本 高志 氏	6/24(水)	16名
	3. PTP包装技術	【座学】大和化成工業(株) 【実技】大和化成工業(株) 十川 清己 氏 大澤 伸二 氏	10/21(木)	13名
バイオ技術	1. インビボイメージング装置の操作法	住商ファーマインターナショナル(株) 宮原 瞳 氏	6/16(火)	3名
	2. 共焦点レーザー顕微鏡操作法	ニコンインステック(株) 志谷 健 氏	6/5(金)	4名
	3. 分子間相互作用解析装置	GEヘルスケア・ジャパン(株) 三谷 知也 氏	11/18(水)	8名
分析技術	残留溶媒試験法	【座学】(株)島津製作所 和田 豊仁 氏	6/16(火)	42名
		【実技】(株)島津テクノロジー 西下 満 氏	7/14(火)	35名

#### (2) トレーニングコースの内容（製剤技術分野）

##### ①味覚評価技術研修

###### a. 味認識装置の応用事例の紹介

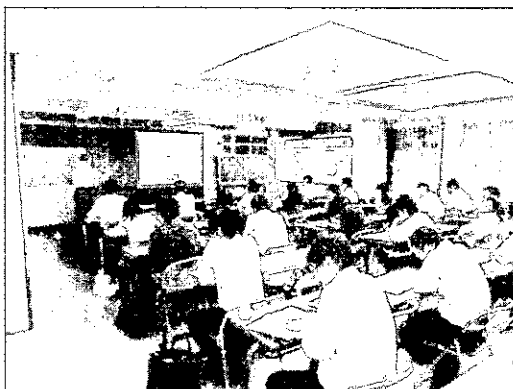
味覚センサーの味覚応答メカニズムや製薬企業における味覚評価の活用事例についての説明。

###### b. 味認識装置「TS-5000Z」を用いた味覚測定法の実習

センサーの取り付け方法、測定プログラムの設定手順等の習得。

###### c. 味覚データの解析方法説明

測定結果に基づき、データの解析やグラフ化の手順等の習得。



味覚評価に関するセミナー



味認識装置の実演

##### ②粒度分布測定技術研修

###### a. 講義「レーザー回折式粒子径分布測定装置SALDシリーズの測定原理とアプリケーション」

レーザー回折式粒子径分布測定装置や関連する粉体測定機器について、原理や活用方法の説明。

###### b. レーザー回折式粒子径分布測定装置「SALD-2300」を用いた実際の粒子径測定実習

湿式（回分セル及び循環ユニット）・乾式法において粒子径分布を測定。



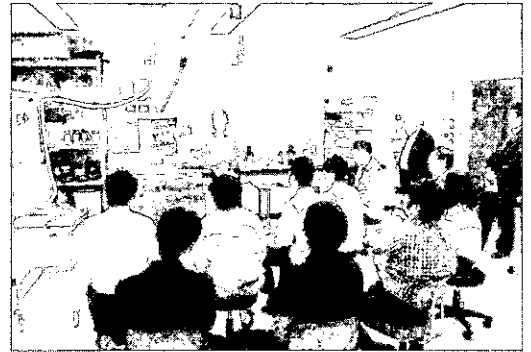
粒度分布測定装置SALD-2300の実演

③PTP包装技術研修

a. 講義「PTP包装の現状と最近の動向」

医薬品業界におけるPTP包装機の現状と最近の動向についての説明。

b. 半自動PTP包装機「K-200KS-DK」を用いたPTP包装の実施

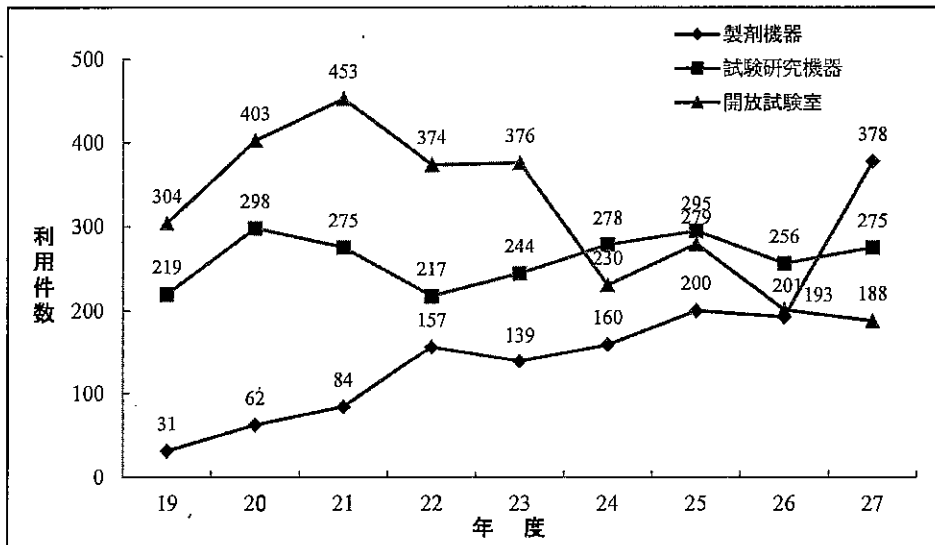


半自動PTP包装機「K-200KS-DK」の実演

(3) トレーニングコースのまとめ

本トレーニングコースは、県内製薬企業による薬事研究所「製剤開発・創薬研究支援ラボ」の円滑な利活用を図るため、平成27年度に実施した事業である。トレーニングでは、ラボに導入した味認識装置、レーザー回折式粒子径分布測定装置、半自動PTP包装機、インポイメージング装置、共焦点レーザー顕微鏡、分子間相互作用解析装置、ヘッドスペース分析システムについて、各装置メーカーの担当者を講師として装置の原理や操作法を学んだ。いずれのトレーニングコースも県内製薬企業の若手従業員が多数参加しており、今後はトレーニングで得られた知識や情報を自社で利用するとともに、当所のラボを十分に活用されることを期待している。

なお、平成27年度の当施設の利用状況は、全体で841件となっており、昨年度（650件）と比較して、130%の増加となった。特に製剤機械に関しては約2倍の増加となるなど、多くの県内企業にラボが利用されている。今後も引き続き、施設の利用や技術指導を行うことにより、技術支援を行っていきたい。



## VI 誌上・学会発表など

## HPLC法の分析時間短縮化に関する検討 (第8報) —ウコン中の総クルクミノイドについて—

大根谷 章浩, 堀井 周文, 田中 啓介, 奥野 康之, 野本 有沙,  
菊池 菜々香, 横田 洋一

製造管理及び品質管理における分析では多検体を処理する必要があるため、1検体当たりの分析時間の短縮化が求められている。ウコン中の総クルクミノイドは、JP 16 に記載されている分析法でクルクミンの保持時間が約 11 分とされている。しかし、保持時間が約70分付近にも夾雑ピークが検出されるため、1検体あたりの分析時間は非常に長く、分析時間の短縮化が望まれた。そこで、粒径 5  $\mu\text{m}$ 、内径 4.6 mm、長さ 150 mm の C18 カラムを粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 4.6 mm、長さ 75 mm の C18 カラムに変更した結果、クルクミンの保持時間が半分以下に短縮されることが認められた。さらに、測定波長を 245 nm から 420 nm に変更することで、目的成分に近接する妨害ピークが消失し、定量値のばらつきも小さくなることがわかった。また、目的成分のかなり後に検出されていた不要なピークも消失し、大幅な分析時間の短縮化が可能となった。

## 医薬品試験の効率化に関する検討 (第2報) —超高速液体クロマトグラフ (UHPLC) の汎用性及び優位性について—

飯村 和也, 池崎 富子, 松任 宏子, 森元 久美子, 田中 雄大, 馬渡 暢子,  
山本 豊巖, 新海 邦孟, 小林 夏絵, 前田 渚, 横田 洋一

近年、HPLC分析における分析時間の短縮や移動相溶媒の削減の一例として超高速液体クロマトグラフ (UHPLC) を用いた超高速分析技術が注目されている。今回、UHPLCの汎用性を検証するため、UHPLCを所有する複数の会社で、かぜ薬成分を同一の試験条件で試験を行うことで室間再現性を検証することとした。その結果、本試験条件においてUHPLCは異なる環境下 (企業間、UHPLCメーカー間) でもほぼ同等な結果が得られるということが確認できた。また、UHPLCの優位性を検証するため、HPLC及びUHPLCを所有する複数の会社で、カラムなど同一分析条件で試験を行い、各種パラメータを比較することとした。その結果、溶出の早いアセトアミノフェン、カフェインについては、理論段数、分離度、注入量再現性 (面積) の点でUHPLCの優位性が確認できた。以上のことから、UHPLCは汎用性、優位性が認められ、医薬品試験の効率化に寄与できると考えられた。

## 医薬品試験の効率化に関する検討 (第3報) —HILICカラムを用いた点眼剤中の多成分同時定量法について—

竹村 麻美, 福島 美和, 二谷 智恵, 室谷 亜紀子, 横田 洋一

前報で, HILICカラムを用い, アラントインを含む点眼剤について, その他の有効成分との同時分析について検討したが, カラムの平衡化について問題を残した. そこで, 今回は, 固定相の異なる複数のHILICカラムを用いて, 点眼剤中のアラントイン, ピリドキシン塩酸塩, クロルフェニラミンマレイン酸塩, テトラヒドロゾリン塩酸塩, ネオスチグミンメチル硫酸塩の同時分析について, カラムの平衡化, ピーク分離及び定量性の点から再検討を行った. その結果, 比較的平衡化の早い2種のカラムを選抜し, 移動相等の最適化を行ったところ, Zic-HILIC (Merck) カラムが点眼剤の分析に適していることがわかった. 本条件で, 検量線及びシステム適合性がほぼ良好な結果を示したことから, 市販点眼剤の各成分の分析を行ったところ, いずれも95~100%の定量値を示した.

家庭薬研究35, 29-38 (2016)

## シクロデキストリンを用いた苦味マスキング法の検討と評価

向 勝臣, 森下 佳典, 杉窪 克哉, 牧島 央和, 上西 篤志, 霜鳥 武司, 梶原 隆介,  
栗山 武大, 朝野 裕貴, 八木 清, 安住 新吾, 明官 勇雄, 永井 秀昌

(富山県薬事研究会製剤部会)

口腔内崩壊錠の製剤設計に活用できる効果的な苦味マスキング法の確立を目的として, マスキング法の一つである化学的マスキング法について, 最適なマスキング剤や配合量を検討し, 味を数値化できる味認識装置を用いて評価を行った. 苦味薬物にクロルフェニラミンマレイン酸塩 (CM) 及びアセトアミノフェン (AA), マスキング剤として, 包接化により苦味を軽減させるシクロデキストリン (CyD) を用い, CyDの種類 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  等) や配合量を変化させた場合の苦味強度を味覚センサで測定し評価した.

その結果, CMの苦味マスキングには,  $\alpha$ -CyDに顕著なマスキング効果が認められ, 濃度として, 薬物の4倍モル濃度での包接化が有効であると考えられた. また, AAの苦味マスキングにはCyDのうち,  $\beta$ とHP- $\beta$ -CyDに強い抑制作用が認められていたが, AAの1回当たりの服用量が多く, 等モル量のCyDで包接するには添加量が多くなることから, CyDの種類としては溶解度の高いHP- $\beta$ -CyDが有効であると考えられた.

今回の実験により, 苦味薬物の種類によって応答するセンサは異なるものの, 各種CyDによるマスキング効果を評価することができ, その最適濃度についても評価が可能であった. このため, 今後新たな口腔内崩壊錠を設計する上で, マスキング効果を評価する際に有用な手段であると考えられる.



## 2. 講演・学会発表

「富山県ブランド芍薬の創生に向けた基礎研究」

朱姝, 田村 隆幸, 小松 かつ子

第66回日本東洋医学会学術総会, 2015, 6, 12-14, 富山.

「Revisiting the identification of IL-5 and IL-5R : IL-5-producing innate lymphoid cell and its role in the immunity and inflammation」

高津 聖志

The 5th IRCMS Ad-Hoc Seminar, 2015, 7, 13, 熊本.

「遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症モデルにおける好中球とIL-1 $\beta$ の機能解析」

長井 良憲, 渡邊 康春, 高津 聖志

第36回日本炎症・再生医学会, 2015, 7, 21, 東京.

「IL-33誘発性血管肥厚におけるIL-5産生ILC2と好酸球の役割」

生谷 尚士, 常山 幸一, 中江 進, 有田 誠, 長井 良憲, 高津 聖志

第36回日本炎症・再生医学会, 2015, 7, 21, 東京.

「自然免疫と炎症を制御する天然物：創薬探索へのアプローチ」

高津聖志

第17回免疫サマースクール2015, 2015, 7, 23, 淡路島.

「富山県の気候風土に適合する芍薬の加工・乾燥法の開発—加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化—」

朱姝, 白川 愛扇, 石 燕紅, 田村 隆幸, 吉松 嘉代, 小松 かつ子

第32回和漢医薬学会学術大会, 2015, 8, 22-23, 富山.

「A compound derived from Psoralea glandulosa L. is a novel inhibitor of Toll-like receptor 7」

Okamoto N., Nagai Y., Kawashima H., Fukui R., Miyake K., Kobayashi Y., Takatsu K.

Basel Life Science Week 2015, 2015, 9, 23, Basel.

「遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症における好中球の機能解析遊」

渡邊 康春, 長井 良憲, 高津 聖志:

第36回日本肥満学会, 2015, 10, 3, 名古屋.

「超高速液体クロマトグラフによる医薬品試験の効率化に関する検討」

馬渡 暢子, 松任 宏子, 森元 久美子, 田中 雄大, 山本 豊巖, 新海 邦孟, 小林 夏絵, 前田 渚, 飯村 和也, 池崎 富子, 横田 洋一

第17回富山県薬学会年会, 2015, 10, 17, 富山

「Accumulation of and increased IL-1 $\beta$  production by neutrophils in adipose tissue: roles of free fatty acid and leukotriene B4.」

Watanabe Y., Nagai Y., Takatsu K.

第44回日本免疫学会学術集会, 2015, 11, 18, 札幌.

「Role of IL-5-producing ILC2s in T cell independent-IgA production in the large intestine.」

Yanagibashi T., Ikutani M., Nagai Y., Takatsu K.

第44回日本免疫学会学術集会, 2015, 11, 18, 札幌.

「免疫・炎症の接点：サイトカイン研究から学ぶこと」

高津 聖志

さががけ「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域第10回領域会議 特別講演, 2015, 12, 18, 滋賀

「研究のおもしろみと奥深さ：天然物による免疫・炎症の調節から学ぶこと」

高津 聖志

平成27年度第2回富山県薬学技術公務員協会若年者研修会, 2016, 1, 28, 富山.

「白樺成分ベツリンによるがん免疫の効果増強」

小笠原 勝

平成27年度富山県薬事研究所研究成果発表会, 2016, 2, 16, 富山.

「富山シャクヤクのブランド化推進事業」

川筋 透

平成27年度富山県薬事研究所研究成果発表会, 2016, 2, 16, 富山.

「乾式造粒による漢方エキス含有チュアブル錠に関する製剤設計  
—芍薬甘草湯エキスをモデル薬物として—」

伊東 宏子, 島谷 隆夫, 佐藤 洋子, 和田 直久, 上西 篤志, 木村 隆仁, 明官 勇雄, 永井 秀昌  
第35回家庭薬開発シンポジウム, 2016, 2, 16, 富山

「シクロデキストリンを用いた苦味マスキング法の検討と評価」

向 勝臣, 森下 佳典, 杉窪 克哉, 牧島 央和, 上西 篤志, 霜鳥 武司, 梶原 隆介, 栗山 武大, 朝野 裕貴,  
八木 清, 安住 新吾, 明官 勇雄, 永井 秀昌

第35回家庭薬開発シンポジウム, 2016, 2, 16, 富山

「医薬品試験の効率化に関する検討 (第2報)」

—超高速液体クロマトグラフ(UHPLC)の汎用性及び優位性について—

飯村 和也, 池崎 富子, 松任 宏子, 森元 久美子, 田中 雄大, 馬渡 暢子, 山本 豊蔵, 新海 邦孟,  
小林 夏絵, 前田 渚, 横田 洋一

第35回家庭薬開発シンポジウム, 2016, 2, 16, 富山

「医薬品試験の効率化に関する検討 (第3報)」

—HILICカラムを用いた点眼剤中の多成分同時定量法について—

竹村 麻美, 福島 美和, 二谷 智恵, 室谷 亜紀子, 横田 洋一

第35回家庭薬開発シンポジウム, 2016, 2, 16, 富山

「HPLC法の分析時間短縮化に関する検討 (第8報)」 —ウコン中の総クルクミノイドについて—

大根谷 章浩, 堀井 周文, 田中 啓介, 奥野 康之, 野本 有沙, 菊池 菜々香, 横田 洋一

第35回家庭薬開発シンポジウム, 2016, 2, 16, 富山

「Chemical constituents with anti-allergic activity from the root of *Edulis Superba*, a horticultural cultivar of *Paeonia lactiflora*」

石 燕紅, 朱 姝, 田村 隆幸, 門脇 真, 吉松 嘉代, 小松 かつ子  
日本薬学会第136年会, 2016, 3, 26-29, 横浜.

「薬用植物の化学生態学的応用を用いたトウキの機能性強化に関する研究」

森田 侑介, 神野 拓也, 辰尾 良秋, 田村 隆幸, 金谷 重彦, 田中 謙  
日本薬学会第136年会, 2016, 3, 26-29, 横浜.

「甘草成分イソリクイリチゲニンはNLRP3インフラマソーム活性化を阻害し, 2型糖尿病の慢性炎症を改善する」

本田 裕恵, 長井 良憲, 松永 孝之, 岡本 直樹, 渡邊 康春, 常山 幸一, 林 宏明, 藤井 勲, 平井 嘉勝,  
高津 聖志;

日本薬学会 第136年会, 2016, 3, 29, 横浜.

### 3. 共同研究論文リスト

Takikawa A., Usui I., Fujisaka S., Ikutani M., Senda S., Hattori S., Tsuneyama K., Koshimizu Y., Inoue R., Tanaka-Hayashi A., Nakagawa T., Nagai Y., Takatsu K., Sasaoka T., Mori H., Tobe K.: Deletion of SIRT1 in myeloid cells impairs glucose metabolism with enhancing inflammatory response to adipose tissue hypoxia. *Diabetology International*, 7:59-68, 2015.

Kudo F., Ikutani M., Seki Y., Otsubo T., Kawamura Y.I., Dohi T., Oshima K., Hattori M., Nakae S., Takatsu K., Takaki S.: Interferon- $\gamma$  constrains cytokine production of group 2 innate lymphoid cells. *Immunology*, 147(1):21-29, 2016.

Nakamura T., Nishibu A., Yoshida N., Yasoshima M., Anzawa K., Watanabe Y., Nagai Y., Takatsu K., Ogawa K., Mochizuki T.: Glycyrrhetic acid inhibits contact hypersensitivity induced by trichophytin via dectin-1. *Exp. Dermatol.*, 25:299-304, 2016.

Watanabe Y., Nagai Y., Honda H., Okamoto N., Yamamoto S., Hamashima T., Ishii Y., Tanaka M., Suganami T., Sasahara M., Miyake K., Takatsu K.: Isoliquiritigenin attenuates adipose tissue inflammation in vitro and adipose tissue fibrosis through inhibition of innate immune responses in mice. *Sci. Rep.*, 6, 23097; doi: 10.1038/srep23097.

Ikutani M., Tsuneyama K., Nakae S., Takatsu K.: Emerging roles of IL-33 in inflammation and immune regulation. *Inflam. Regener.*, 35(2):69-77, 2015.

Yan-Hong Shi, Shu Zhu, Takayuki Tamura, Makoto Kadowaki, Zhengtao Wang, Kayo Yoshimatsu, Katsuko Komatsu : Chemical constituents with anti-allergic activity from the root of *Edulis Superba*, a horticultural cultivar of *Paeonia lactiflora*. *J. Nat. Med.*, 70 : 234-240, 2016.

#### 4. 知的所有権

##### (1) 特 許

発 明 の 名 称	登 録 番 号
食後血中中性脂肪濃度上昇抑制剤及び飲食品	特許第4815421号
がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物	特許第5548874号

##### (2) 特許出願

名 称	出 願 ・ 公 開 番 号
抗齶蝕性口腔用組成物及び飲食品	特開2009-221191
抗歯周病性口腔用組成物及び飲食品	特開2009-219484
ラッカーゼ及びそれを用いたエピテアフラガリン類の製造法	特願2012-43815
インフラマソーム活性制御剤	特開2014-94917
I L - 1 及び T N F 活性阻害剤	特願2013-271897 PCT国際出願 (PCT/JP2014/084076)
抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体BD-17】	特願2015-213701
抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体BD-23等】	特願2015-213702
乾式造粒物及び該乾式造粒物を含有する固形製剤並びにそれらの製造方法	特願2016-025366
自然免疫を活性化する粘膜ワクチン用アジュバント	特願2016-072240