

研 究 業 績

IV 研究報告

酸化ストレス病態動物における抗酸化物質の効力の比較検討

松永 孝之

Comparative study of antioxidant on oxidative stress-induced disease mouse

Takayuki MATSUNAGA

要 約

鉄キレート化合物を用いた酸化ストレスモデルを作製した。鉄ニトリロ三酢酸Naを投与した結果、30分後には血中及び腎臓中の過酸化脂質生成が上昇した。これらの上昇は、鉄ニトリロ三酢酸Naの投与量に相関して上昇した。この酸化ストレスマウスにおいて、抗酸化ビタミンであるビタミンEは、血中過酸化脂質の生成を抑制したが、ビタミンC及びN-アセチルシステインは、過酸化脂質生成には影響を及ぼさなかった。また、抗酸化物質であるカテキン類を多く含む緑茶エキスは、用量依存的に血中及び腎臓中過酸化脂質生成を抑制した。

以上の結果から、鉄ニトリロ三酢酸Na投与マウスは、ある種の抗酸化物質の評価に有用であることが示された。

Summary

Oxidative stress model in mouse was prepared by injection of iron chelating agent. Lipid peroxide in blood and kidney in mouse elevated 30min after the administration of iron nitrilotriacetate complex. This elevation was in a dose dependent manner with the complex. In this model, vitamin E, an antioxidative vitamin, inhibited the elevation of lipid peroxide in blood but not vitamin C and N-acetylcysteine. Furthermore, extract of green tea, known to contain antioxidative catechins, inhibited dose-dependently the lipid peroxidation in blood and kidney.

These results show that mouse administered with iron nitrilotriacetate complex is a valuable model to evaluate the efficiency of antioxidative compounds.

キーワード：酸化ストレス、鉄キレート剤、過酸化脂質、抗酸化物質

Keywords：Oxidative stress, Iron chelating complex, Lipid peroxide, Antioxidative compound

生体内の酸化ストレスは、種々の疾患を誘発することから、生体には酸化ストレスを防御するシステムが備わっている¹⁾。これには、ビタミンEなどの抗酸化物質及びスーパーオキシドジスムターゼなどの抗酸化酵素などがある。しかし、これらの抗酸化システムが老化を含めた種々要因により減弱することにより生活習慣病やがんなど種々疾患の誘発につながることになる。そのため、抗酸化作用を有する天然物は、種々疾患発症の予防につながるものと期待されている¹⁾。

先に、我々は薬用植物指導センターにおいて栽培されているシャクヤクの品種別薬理試験を実施し、4種の薬理試験及び成分分析の結果²⁻⁵⁾から6品種に絞り込み、動物モデルを用いて有用性を検証する予定にしている。

酸化ストレスの動物モデルは、種々報告されているが、それによる障害は徐々に進行することが考えられる^{6,7)}。そのため、被検物の投与期間が長期にわたる事が考えられ、被検物の必要量が多くなるものと思われる。一方、金属や薬物を投与することによる酸化ストレスは、比較的短期で誘発され、障害が発症するものと考えられる^{8,9)}。そこで、

今回、鉄キレート剤投与による過酸化脂質生成を指標とした抗酸化物質の効果の評価系を作製し、抗酸化物質の効力を比較検討した。

実験方法

1. 試薬

本試験で用いた主な試薬は、チオバルビツール酸Na、硝酸第二鉄、ニトリロ三酢酸Na、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、N-アセチルシステイン (NAC、以上、和光純薬)である。また、緑茶エキスは、太陽化学 (三重県四日市市) から恵与されたものを試験に供した。

2. 鉄キレート化合物の調製法

鉄キレート化合物である鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) 溶液は、以下のように調製した。即ち、0.3M硝酸第二鉄と0.6Mニトリロ三酢酸溶液を1:2に混和した後1M炭酸水素ナトリウムでpH7.4に調整した。これを生理食塩水で目的の鉄濃度の溶液に希釈して用いた。

3. 動物

本実験で使用したマウス (Balb/c, 雄性, 6週令) は三協ラボサービスより購入し, 予備飼育後7-9週目に実験に用いた。

4. Fe-NTA投与による酸化ストレスマウスの作製

一晚絶食したマウスにFe-NTA溶液を腹腔内に投与し, その後マウスをエーテル麻酔下で採血後腎臓を摘出した。採取した腎臓及び血漿は, 過酸化脂質の定量に供した。

5. 血中過酸化脂質の定量

血漿10 μ Lに0.08N硫酸2mLと10%リタングステン酸Na0.25mLを添加して室温で5分間静置した後遠心分離 (2,500rpm, 5分間) した。上清を除去後, 再度0.08N硫酸1mLと10%リタングステン酸Na0.15mLを添加した後遠心分離した。得られた沈殿に蒸留水2mL添加して懸濁後, 0.375%チオバルビツール酸Na (TBA) 0.5mL添加して沸騰水で30分間加熱した。反応後氷冷水で冷却後n-ブタノール2.5mL添加して攪拌し, 反応物を抽出後遠心分離して得られた上清の蛍光強度 (Ex: 515nm, Em: 553nm) を測定した。標準試料としてテトラエトキシプロパンを用いて同様の反応を行い, TBA反応物 (TBAR) として換算した。

6. 腎臓中過酸化脂質の定量

腎臓に9倍量の1.15%塩化カリウム溶液を添加してテフロンホモジナイザーで破碎した。このホモジネート0.1mLに8.1%ラウリル硫酸ナトリウム0.1mL, 20%酢酸緩衝液 (pH3.5) 0.75mL及び0.375%チオバルビツール酸Na0.75mL添加して, 沸騰水で30分間加熱した。反応後氷冷水で冷却し, 0.5mLの蒸留水添加後n-ブタノール2.5mL添加して攪拌し, 反応物を抽出後遠心分離して得られた上清の吸光度 (535nm) を測定した。標準試料としてテトラエトキシプロパンを用いて同様の反応を行い, TBA反応物 (TBAR) として換算した。

7. 統計処理

測定値の有意差検定は, Student's t-testにより行った。

実験結果

1. Fe-NTA投与マウスにおける過酸化脂質生成

酸化ストレスに対する保護効果を有する天然物の有用性評価のための評価系を, Fe-NTA投与マウスにおける過酸化脂質生成を指標にするため, 条件設定を検討した。まず, Fe-NTA投与後の血中及び腎臓中の過酸化脂質生成量を経時的に調べた。その結果, 血中の過酸化脂質は, 投与30分後には約3倍に上昇し, その後2時間まで同レベルを維持していた (Table1)。また, 腎臓中の過酸化脂質も30分後には, 4倍以上に上昇し, 1時間後には約5倍に上昇した後低下した。そこで, Fe-NTA投与後1時間後で評価することとした。

Table 1. Formatin of lipid peroxide in blood and kidney in mice treated with Fe-NTA

	Treatment (min)	TBAR	
		Blood(nmole/ml)	Kidney(nmole/g)
Control		4.1 \pm 0.18	71.6 \pm 4.9
Fe-NTA			
(Fe 5mg/kg)	30	11.6 \pm 0.80***	300 \pm 14.0***
	60	11.7 \pm 0.65***	349 \pm 15.2***
	120	11.9 \pm 0.38***	266 \pm 37.7***

Each value shows the mean \pm SE of 6 mice.

***:p<0.001 to control

次に, Fe-NTAの投与量を検討した。その結果, 2mg/kg (Fe相当量) 投与時で, 血中過酸化脂質量は約1.4倍に上昇したが, 5mg/kg投与時では約5倍と急激に上昇した (Table2)。一方, 腎臓中過酸化脂質はFe-NTA2mg/kg投与では変化はないが, 5,10mg/kgでは上昇し, 5mg/kgでは約3倍, 10mg/kgでは約4倍に上昇した。そこで, Fe-NTA投与量はFe相当量5mg/kgとして抗酸化物質の効果を検討した。

Table 2. Formatin of lipid peroxide in blood and kidney in mice treated with Fe-NTA

	Dose (Fe mg/kg)	TBAR	
		Blood(nmole/ml)	Kidney(nmole/g)
Control		4.4 \pm 0.45	62.3 \pm 1.59
Fe-NTA			
(Time 1hr)	2	6.1 \pm 0.53*	62.4 \pm 1.69
	5	20.2 \pm 1.36***	188 \pm 10.7***
	10	17.3 \pm 2.11***	258 \pm 7.28***

Each value shows the mean \pm SE of 6 mice.

*,***:p<0.001 to control

2. Fe-NTA投与マウスの過酸化脂質生成に対する抗酸化物質の効果

最初に, Fe-NTA投与マウスにおける過酸化脂質生成に対するNAC及びビタミンEの効果を検討した。その結果, 投与回数の違いはあるがビタミンE (100mg/kg) により血中及び腎臓中の過酸化脂質生成が抑制された (Fig.1)。一方, 4時間及び0.5時間前の2回投与したNAC (200mg/kg) では過酸化脂質生成には変化は見られなかった。

次に, ビタミンE及びビタミンCの効果を同様に検討した。その結果, ビタミンEには, 血中過酸化脂質生成の抑制が見られたが, ビタミンCでは用いた濃度では変化は認められなかった (Fig.2)。

3. Fe-NTA投与マウスの過酸化脂質生成に対する緑茶エキスの効果

天然物には, 抗酸化活性を有するものが多数知られているが, 緑茶に含まれるカテキン類はその代表格である。そこで, Fe-NTA投与マウスの過酸化脂質生成に対する緑茶エキスの効果を検討した。その結果, 緑茶エキスは, 血中及び腎臓中過酸化脂質生成を用量依存的に抑制する傾向が見られ, 血中過酸化脂質は, Fe-NTA投与により5.4倍に上昇したものが, 緑茶エキス (1g/kg) 2回投与により2.46倍の上昇に抑えられた (Fig.3)。また, 腎臓中過酸化脂質は,

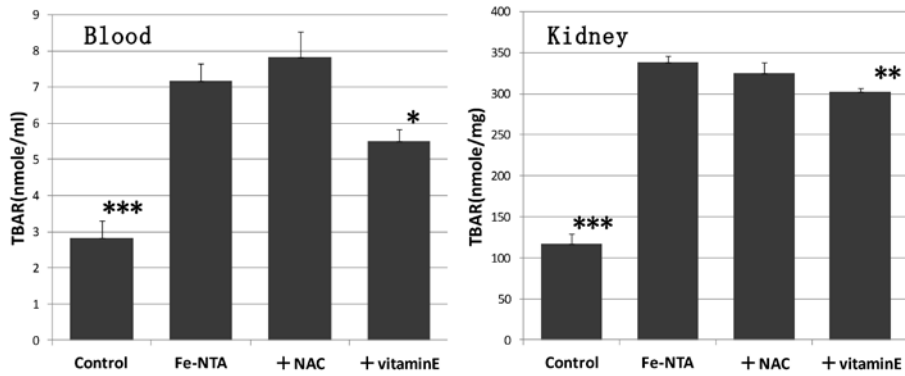


Fig. 1. Effect of NAC and vitamin E on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with NAC or vitamin E 3 times 21, 4 and 0.5hr before the treatment with Fe-NTA and mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *, **, ***: Significantly different from Fe-NTA at $p < 0.05, 0.01, 0.001$.

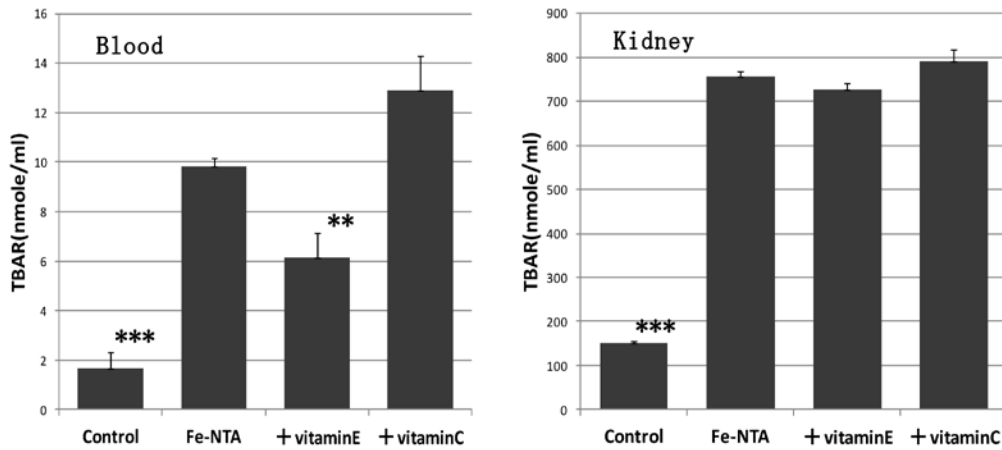


Fig. 2. Effect of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with vitamin C or vitamin E 2 times 4 and 0.5hr before the treatment with Fe-NTA and mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. **, ***: Significantly different from Fe-NTA at $p < 0.01, 0.001$.

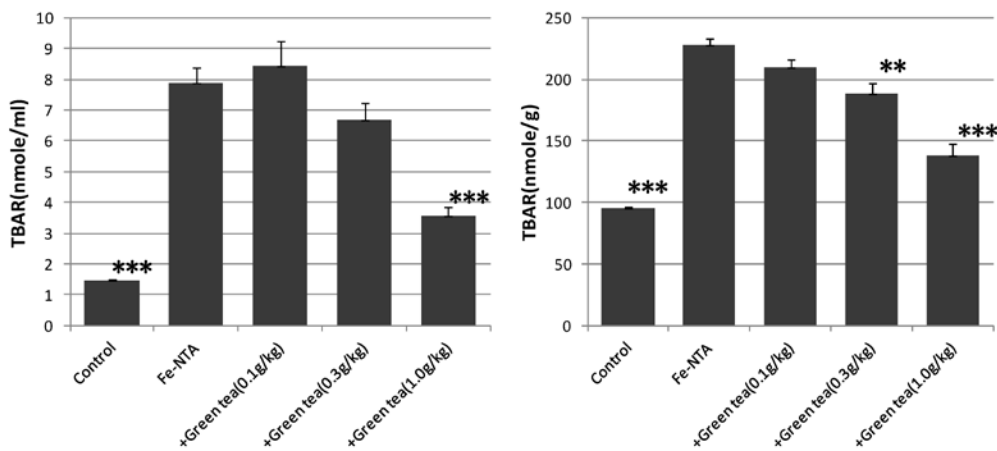


Fig. 3. Effect of green tea extract on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with green tea extract 2 times 4 and 0.5hr before the treatment with Fe-NTA and mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. **, ***: Significantly different from Fe-NTA at $p < 0.01, 0.001$.

Fe-NTA投与により2.4倍に上昇したものが、同エキスにより1.45倍に抑えられた。

考 察

多くの天然物が抗酸化作用を有することが報告され、活性酸素が関与する疾患の発症予防に有用ではないかと期待されている¹⁾。しかし、これらは試験管レベルでの効果のみを見たものが多く、酸化ストレスモデルである動物モデルで有用性を実証している例は多くはない。原因の一つとしては、酸化ストレスによる機能障害を来すには比較的長期を要し、その間抗酸化物質を連続的に投与する必要があると考えられる。一方、金属や薬物では、1回投与で障害を誘発する例も知られている。そこで、鉄キレート剤投与による酸化ストレスモデルを作製し、抗酸化物質の効果を検証できるか調べた。

鉄の過剰摂取は、生体内での活性酸素の産生を促進することが知られている¹⁰⁾。今回、NTAによる鉄キレート剤を用いて酸化ストレスモデルを作製し、血中及び腎臓中の過酸化脂質が顕著に増加した。Fe-NTA投与後1時間で血中過酸化脂質は3倍に、また、腎臓中過酸化脂質量は、5倍に増加した。また、これらの過酸化脂質量は、Fe-NTAの投与量に依存して増加した。データには示さないが、Fe-NTA投与による過酸化脂質の増加に相関して溶血反応が進行していることがうかがわれた。

最初に、鉄キレート剤を用いた酸化ストレスモデルを用いて抗酸化物質の効果を比較検討した。その結果、抗酸化活性を有する脂溶性のビタミンEが血中及び腎臓中の過酸化脂質の生成を抑制したが、水溶性のビタミンC及びN-アセチルシステインでは、脂質過酸化には影響を及ぼさなかった。これは、脂質過酸化の発生している環境を示唆しているものと考えられる。すなわち、脂質過酸化を受ける脂肪酸は、細胞膜の構成成分であるリン脂質として存在し、また、血中にはトリグリセライドとして脂質輸送タンパクであるリポタンパクなどに存在している。この様な場合は、比較的脂溶性が高く、脂溶性ビタミンであるビタミンEが作用しやすい環境のため、ビタミンEの作用が発現したものと推察される。

次に、抗酸化活性を含む種々の生物活性¹¹⁾を有すること知られているカテキン類を多く含む緑茶エキスの効果を検討した。その結果、緑茶エキスは、4時間及び30分前の2回経口投与することにより用量依存的に血中及び腎臓中の過酸化脂質生成を抑制し、1g/kgの投与時では、約50%の抑制が認められた。緑茶カテキンの主要成分であるエピガロカテキンガレートは、エピガロカテキンに比べて没食子酸の結合により疎水性が高まり、細胞膜などへの移行が

高まることが報告されている¹²⁾。このことから、腎臓組織中の細胞膜及び血中リポタンパクへの分布が増大して脂質過酸化を抑制するものと考えられる。さらに、緑茶カテキンなどは、鉄のキレート作用を有することが知られており、生体内での遊離鉄を低下させることも脂質過酸化の抑制に寄与しているものと推察される。また、今回の試験で、抗酸化物質であるカテキン類などが経口投与後に吸収されて血中及び腎臓中に分布して効果を発現していることも示された。

今回の研究から、鉄キレート剤を用いた酸化ストレスモデルにおいて、特に脂溶性抗酸化物質の評価が出来ることが示された。先に、シャクヤクの抗酸化成分はペンタガロイルグルコース及びカテキンであることを報告している。これらの化合物が経口投与後に吸収されれば、本評価系においてもシャクヤクエキスの抗酸化能を比較検討できるものと思われる。

謝 辞

本研究で用いた緑茶エキスを御提供頂きました太陽化学株式会社に感謝致します。

参考文献

- 1) 抗酸化物質 (二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真編集), 学会出版センター (1995)
- 2) 松永孝之, 横田洋一, 田村隆幸, 田中彰男: シャクヤクの品種別薬理試験 (1) シャクヤクエキスにおける抗酸化作用, 富山県薬事研究所年報, 38, 17-20 (2011)
- 3) 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 (2) シャクヤクエキスのラット血管平滑筋に対する作用, 富山県薬事研究所年報, 39, 40-50 (2012)
- 4) 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)
- 5) 横田洋一, 高橋敏, 寺崎さち子, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別成分分析 (1), 富山県薬事研究所年報, 39, 61-68 (2012)
- 6) Furukawa,S., Fujita,T., Shimabukuro,M., Iwaki,M., Yamada,Y., Nakajima,Y., Nakayama,O., Makishima,M., Matsuda,M. and Shimomura,I.: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, J.Clin.Invest., 114, 1752-1761 (2004)
- 7) Bora,K.S. and Sharma,A.: Evaluation of Antioxidant

- and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult, *Evidence-Based Complement. and Alternat. Med.*, p1 (2011)
- 8) Okazaki, Y., Iqbal, M., Kawakami, N., Yamamoto, Y., Toyokuni, S and Okada, S.: A beverage containing fermented black soybean ameliorates ferric nitrilotriacetate-induced renal oxidative damage in rats, *J. Clin Biochem. Nutr.* **47**, 198-207 (2010)
- 9) Saito, C., Zwingmann, C. and Jaeschke, H.: Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine, *Hepatology*, **51**, 246-254 (2010)
- 10) Kohgo, Y., Ikuta, K., Ohtake T., Torimoto, Y. and Kato, J.: Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance, *World J. Gastroenterol.*, **13**, 4699-4706 (2007)
- 11) 村松敬一郎, 小国伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本万里編: 茶の機能, 学会出版センター, 東京, (2002)
- 12) 熊沢茂則, 中山努: 茶カテキン類と脂質膜との相互作用, *化学と生物*, **49**, 243-249 (2011)
- 13) Ounjaijean, S., Thephinlap, C., Khansuwan, U., Phisalaponq., C., Fucharoen, S., Porter, J.B. and Srichairatanakool, S.: Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats, *Med. Chem.*, **4**, 365-370 (2008)

がん細胞による免疫抑制を克服する天然薬物の探索 (3)

小笠原勝, 山崎 (屋敷) 思乃, 宮本 (山口) 朋美, 生谷尚士¹, 長井良憲¹, 松永孝之

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

¹富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

Masaru OGASAWARA, Shino YAMASAKI-YASHIKI, Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO,
Masashi IKUTANI, Yoshinori NAGAI, Takayuki MATSUNAGA

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

要 約

前報において、植物成分ベツリンが、ポリ (I:C) により亢進した脾臓細胞の細胞傷害活性に対する TGF- β あるいは PGE₂ の抑制作用をいずれも解除することを報告した。本研究では、ベツリンの抑制解除作用にどの細胞が関与しているのかについて検討した。樹状細胞の関与を明らかにするため、樹状細胞を除いた脾臓細胞を調製しベツリンの作用を検討したところ、顕著な低下が認められた。ところが、樹状細胞とNK細胞の共培養系ではベツリンの抑制解除作用は認められなかった。そこで、scidマウスの脾臓細胞にB細胞あるいはT細胞を加えた共培養系を用いて、これら細胞の関与について検討したところ、ベツリンの抑制解除作用は両細胞を加えたときのみ認められた。これらことから、ベツリンの抑制解除作用には、樹状細胞とNK細胞に加えて、B細胞およびT細胞が関与していると考えられた。

Summary

We have previously reported that betulin, a plant constituent, restored the reduced cytotoxicity of splenocytes caused by TGF- β or PGE₂. In this study, which kinds of cells are involved in the restorative activity of betulin was examined. To explore the involvement of dendritic cells (DC) in the betulin's effect, responsiveness for betulin was examined using DC-removed splenocytes. In this condition, betulin's effect was much reduced. However, the restorative activity of betulin was not observed under a coculture condition of DC and natural killer (NK) cells. Therefore, betulin's effect was examined under a coculture condition of DC and B cells or T cells prepared from spleen cells of scid mice. Betulin's effect was observed in the presence of B and T cells. These results suggest that restorative activity of betulin involves B and T cells in addition to DC and NK cells.

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

Keywords: Betulin; TGF- β ; PGE₂; immunosuppression; Poly(I:C)

がんの三大療法に次ぐ新しい治療法として、がん免疫療法が積極的に臨床応用されている。しかし、多くの場合当初期待されたほどの高い治療効果が得られていない¹⁾。近年、その原因の一つは、がん細胞が分泌する免疫抑制因子 (TGF- β , PGE₂ 等) により薬剤の効果が低下しているためであることがわかってきた。そのため、治療効果の向上を目指しTGF- β を標的とした阻害剤の開発が多数進められている²⁾。これまで、本研究においても、先行している研究開発との差別化、より有効性の高い薬剤の開発を目指し、TGF- β に加えてPGE₂ の抑制作用も解除できる化合物

を約800種の天然物等からスクリーニングし植物成分のベツリンに有効性を見出した³⁾。

本研究では、ベツリンの抑制解除メカニズムについて、とりわけ、ベツリンの主な標的細胞について検討した。

実験方法

1. 実験試薬

ポリイノシン-ポリシチジン酸 (ポリ (I:C)), はInvivoGenより購入した。ベツリンはExtrasyntheseより購入し、ジ

メチルスルホキシド (DMSO) に溶解して、実験に供した。

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 μ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI-1640培地中にて継代、維持した。

3. 磁気ビーズを用いた細胞調製

マウス (BALB/c, 7-9週令, 雌) より脾臓を採取し、脾臓細胞を 10^8 個/mlとなるように調製した。細胞をFcブロックした後、樹状細胞を除去する場合にはビオチン化抗CD11c抗体、B細胞を除去する場合にはビオチン化抗CD19抗体、T細胞を除去する場合にはビオチン化抗CD5抗体およびビオチン化抗CD3e抗体で処置した。細胞を洗浄後、ストレプトアビジン-磁気ビーズで処置しIMagを用いて抗体が結合していない細胞を磁気分離した。得られた細胞を培養液で洗浄し、 10^7 個/mlとなるように調製して細胞傷害活性の評価に用いた。マウス (C.B-17/Icr+/+, 8週令, 雌) よりB細胞あるいはT細胞を単離する場合には、脾臓細胞を 10^8 個/mlとなるように調製し、同様にしてFcブロックを行った。B細胞を単離する場合には、ビオチン化抗CD43抗体およびビオチン化抗CD11c抗体、T細胞を単離する場合には、ビオチン化抗CD19抗体およびビオチン化抗CD49b抗体、ビオチン化抗CD45R抗体、ビオチン化抗CD11b抗体、ビオチン化抗Gr-1抗体で処置した。細胞を洗浄後、上記と同様にしてIMagを用いてB細胞あるいはT細胞を分取した。これらを 3.75×10^6 個/mlとなるように調製し、マウス (C.B-17/Icr-scld/scld, 8週令, 雌) の脾臓細胞 (1.25×10^6 個/ml) と1:1で混合してエフェクター細胞とし細胞傷害活性の評価に用いた。

4. FACS Ariaを用いたNK細胞の分取

マウス (BALB/c, 7週令, 雌) より調製した脾臓細胞 (10^8 個/ml) を上記と同様にしてFcブロックし、FITC抗CD19c抗体、PE抗CD3e抗体、APC抗CD49b抗体 (DX5) で処置した。細胞を洗浄後、7AADを添加し、FACS AriaによりDX5陽性細胞 (NK細胞) を分取した。

5. 細胞傷害活性の評価

マウスより脾臓を採取し、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⁴⁾。これらを共培養 (エフェクター/ターゲット=100) 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。

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

NK細胞のlytic unitを求める実験では、エフェクター/ターゲットの比率を100, または, 50, 25と変えて共培養し、細胞傷害活性を求めた。NK細胞数に対して得られた値からlytic unit を求めた。1 lytic unit は30%のYAC-1細胞に傷害を与えるのに必要なNK細胞の数とした。

結 果

ベツリンの抑制解除作用における樹状細胞の関与

ポリ (I:C) によるNK細胞の活性化には樹状細胞が関与していることが数多く報告されている^{5, 6)}。その一方で、樹状細胞以外の細胞の関与を示唆する報告もなされている⁷⁾。そこで、当該評価系において樹状細胞がポリ (I:C) の作用に関与しているかを明らかにするため、樹状細胞 (CD11c+細胞) を除いた脾臓細胞を調製しポリ (I:C) の作用を検討した (Fig. 1)。その結果、樹状細胞を除去することでポリ (I:C) の作用は顕著に低下した。また、ベツリンの作

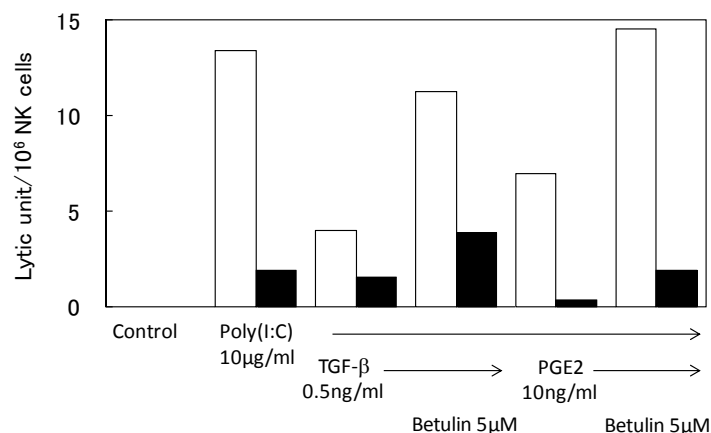


Fig. 1. Dendritic cells are involved in the restorative activity of betulin.

Dendritic cells were removed from splenocytes and effect of betulin on the modified splenocytes was examined in the presence of poly (I:C) and TGF- β or PGE₂. One lytic unit indicates NK cell number needed for killing of 30% of target cells.

用も同様に低下した。ところが、予想に反して樹状細胞とNK細胞の共培養系では脾臓細胞を用いた場合に比較してポリ (I:C) の作用は弱く、TGF- β による抑制およびベツリンの抑制解除効果は認められなかった (Fig. 2)。また、PGE₂は抑制傾向を示したが、ベツリンの有効性は認められなかった (Fig. 2)。これらのことから、ポリ (I:C) の作用には樹状細胞とNK細胞に加えて他の細胞も関与していることが推察された。

ベツリンの抑制解除作用におけるB細胞およびT細胞の関与
 ポリ (I:C) およびベツリンの作用におけるB細胞あるい

はT細胞の関与について、B細胞およびT細胞を欠損しているscidマウスの脾臓細胞とコントロールマウス由来のB細胞あるいはT細胞の共培養系を用いて検討した (Fig. 3)。Scidマウスの脾臓細胞とB細胞あるいはT細胞の共培養系を用いてポリ (I:C) の作用を検討したところ、脾臓細胞のみではポリ (I:C) の作用は認められなかったが、B細胞あるいはT細胞と共培養した場合にポリ (I:C) によるNK活性の亢進が認められた。とりわけ、B細胞との共培養において顕著な作用を認めた。ポリ (I:C) に対するTGF- β の抑制作用はいずれの共培養系でも同程度認められたが、ベツリンの抑制解除作用はいずれの共培養系においてもほ

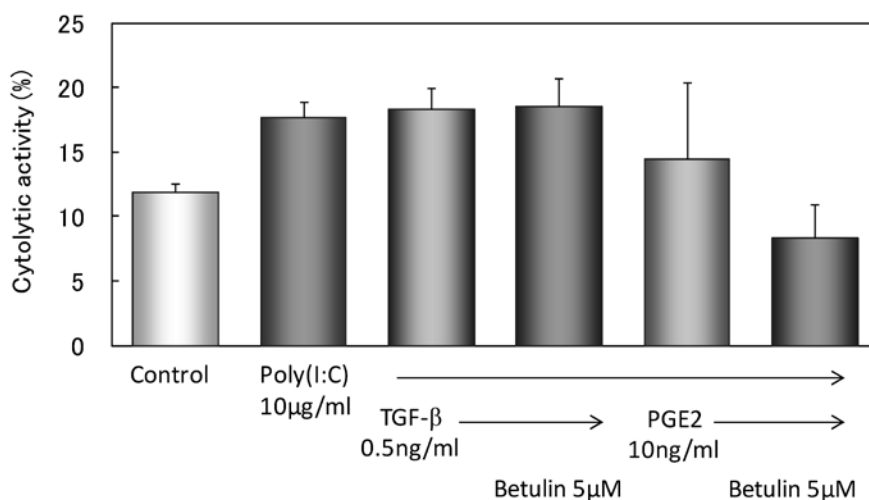


Fig. 2. Restorative activity of betulin was not observed in a coculture condition of bone marrow-derived dendritic cells and NK cells.

Bone marrow-derived dendritic cells and splenic NK cells were prepared and effect of betulin on the coculture system was examined in the presence of poly(I:C) and TGF- β or PGE₂

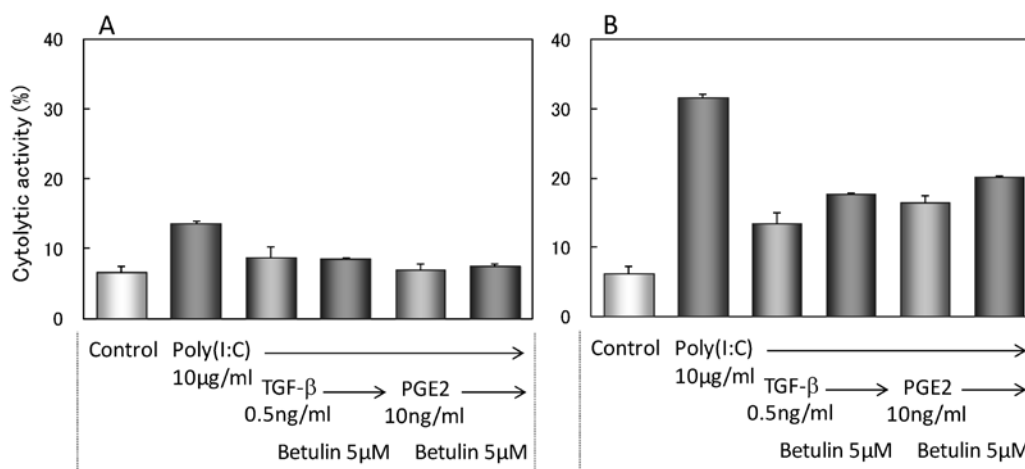


Fig. 3. Restorative activity of betulin was not observed in a coculture condition of T (A) or B (B) cells in addition to bone marrow-derived dendritic cells and NK cells.

Splenocytes prepared from scid mice were cocultured with T or B cells which were prepared from control mice. Then, effect of betulin on the coculture system was examined in the presence of poly(I:C) and TGF- β or PGE₂.

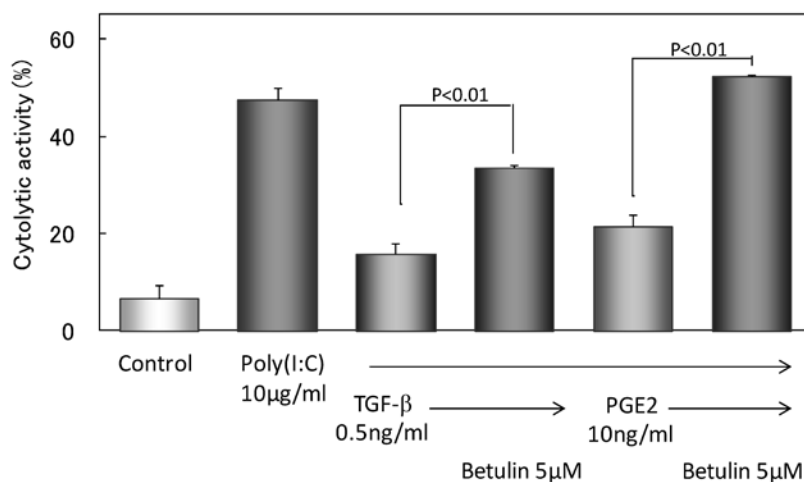


Fig. 4. T and B cells in addition to dendritic cells and NK cells are involved in the restorative activity of betulin.
Each cell population was prepared and test for betulin in the presence of poly(I:C) and TGF- β or PGE₂ was performed under a coculture condition of the prepared cells of the four kinds.

とんど認められなかった。ベツリンの抑制解除作用は、脾臓細胞にB細胞とT細胞の両細胞を加えたときのみ認められた (Fig. 4)。このことから、ベツリンの抑制解除作用には樹状細胞とNK細胞に加えて、B細胞およびT細胞が必要であると考えられた。

考 察

昨年度、ポリ (I:C) により亢進した脾臓細胞のNK活性を指標に、TGF- β 及びPGE₂による抑制を克服する植物成分としてベツリンを報告した³⁾。本研究では、ベツリンの作用機序の解析として、ベツリンの抑制解除作用にどのような細胞群が関与しているのかについて検討した。本研究では免疫賦活剤にポリ (I:C) を用いていることから、まず、ポリ (I:C) がどのようにしてNK細胞を活性化しているのかが重要となる。これまで、ポリ (I:C) によるNK細胞の活性化は、直接作用によるのではなく樹状細胞を介した間接作用であることが報告されている⁵⁻⁷⁾。本研究でも、ポリ (I:C) は単離したNK細胞の細胞傷害活性に影響を与えないことを確認した。そこで、樹状細胞が関与しているか検討したところ、CD11c陽性細胞 (樹状細胞) を除去した脾臓細胞ではベツリンの効果が顕著に減弱することが分かった。このことから、ベツリンの作用に樹状細胞が極めて重要な役割を担うことが示唆された。これを受けて、次に単離したNK細胞と骨髄由来の樹状細胞の共培養系でベツリンの効果を検証した。当初、これら2つの細胞群でベツリンの効果が再現されることを想定していたが、全く効果が認められなかった。また、TGF- β の作用も認められなかった。このことは、脾臓細胞から単離した樹状細胞を用いても同様であった。これらのことから、ベツリン及び

TGF- β の作用には他の細胞も関与していると考えられた。そこで、脾臓細胞中で多数を占めるT細胞及びB細胞の関与について検討した。T細胞及びB細胞を欠損したscidマウスの脾臓細胞にコントロールマウス由来のT細胞あるいはB細胞を加えた条件下でベツリンの作用を検討したところ、いずれの細胞を加えてもポリ (I:C) 及びTGF- β の作用は認められたが、ベツリンの作用はほとんど再現されなかった。ベツリンの作用は、脾臓細胞にT細胞及びB細胞を加えたときのみ認められた。このことから、ベツリンの抑制解除作用には樹状細胞とNK細胞に加えて、B細胞およびT細胞が必要であると考えられた。ベツリンの作用の発現になぜ4種の細胞群が必要であるのか、どのように関与しているのかについてはいまのところ全く不明である。おそらくポリ (I:C) が樹状細胞に作用して誘導する様々なサイトカインや接着分子がT細胞やB細胞への影響も介して複雑に絡み合い、結果としてNK細胞が活性化しているものと考えられる。したがって、ベツリンの作用機序を明らかにするには、まず、ポリ (I:C) によるNK活性の亢進機序を解析し、次いでTGF- β あるいはPGE₂の作用点を特定し、これらを踏まえてベツリンの作用点を解析していく必要があると考える。

謝 辞

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) 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) 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) Akazawa T., Ebihara T., Okuno M., Okuda Y., Shingai M., Tsujimura K., Takahashi T., Ikawa M., Okabe M., Inoue N., Okamoto-Tanaka M., Ishizaki H., Miyoshi J., Matsumoto M., Seya T.: Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**(1), 252-257 (2007)
- 6) Miyake T., Kumagai Y., Kato H., Guo Z., Matsushita K., Satoh T., Kawagoe T., Kumar H., Jang M.H., Kawai T., Tani T., Takeuchi O., Akira S.: Poly I:C-induced activation of NK cells by CD8 alpha+ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. *J. Immunol.*, **183**(4), 2522-2528 (2009)
- 7) McCartney S., Vermi W., Gilfillan S., Cella M., Murphy T.L., Schreiber R.D., Murphy K.M., Colonna M.: Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *J. Exp. Med.*, **206**(13), 2967-2976 (2009)

マウス脾臓 B 細胞の IgA 産生を抑制する ベツリンの作用機序の解明

山崎 (屋敷) 思乃, 小笠原 勝, 松永 孝之, 高津 聖志

Mechanism of suppression of immunoglobulin A production from murine B lymphocytes by betulin

Shino YAMASAKI-YASHIKI, Masaru OGASAWARA, Takayuki MATSUNAGA,
and Kiyoshi TAKATSU

要 約

B細胞はクラススイッチ組換えにより, 抗原への特異性を変えることなく, サブクラスの切り替えにより抗体の機能を変化させ, 効率的に外来抗原の排除を行う. 試験管内においても刺激に応じたクラススイッチ組換えを誘導でき, 脾臓B細胞をLPS存在下, TGF- β で刺激するとIgAクラススイッチ組換えが誘導され, IgAが産生される. 我々は, 白樺由来のトリテルペン化合物であるベツリンがマウス脾臓B細胞のIgA産生を抑制することを見出し, 本研究では, TGF- β に依存的なIgA産生を抑制するベツリンの作用機序を解析した. その結果, ベツリンが脾臓B細胞の細胞分裂を抑制することにより, クラススイッチ組換えを誘導するのに必要な細胞分裂回数に達しないため, IgA産生が抑制されることを明らかにした.

Summary

B lymphocytes can change the isotype of the antibody which they express by immunoglobulin (Ig) class switch recombination retaining the same antigen specificity. The class switch recombination increases the variety of antibodies and permits effective exclusion of the exogenous antigen. Co-stimulation by LPS and TGF- β induces the IgA class switch recombination on B lymphocytes *in vitro*. We found that betulin, a natural triterpene compound extracted from the bark of white birch, suppressed the IgA production by murine B lymphocytes. In this study, we investigated the mechanisms of suppression of IgA production by betulin in order to understand the effect of betulin on the TGF- β signaling. As the result, it was revealed that betulin inhibited the growth of B lymphocytes and cell division number didn't reach to that required for class switch recombination.

キーワード: B細胞, ベツリン, TGF- β , 抗体産生, IgA

Keywords: B lymphocyte, betulin, TGF- β , immunoglobulin production, IgA

生体を病原体から防御するための免疫系は, 初期に応答する免疫記憶を伴わない自然免疫系と後期に応答する免疫記憶を伴う獲得免疫系により成り立っている. 中でも, B細胞は, 獲得免疫系において抗体を産生し, 微生物やウイルスなどの病原体の認識や排除を行うことで, 生体防御を担っている.

B細胞は, B細胞受容体 (BCR) と呼ばれる外来抗原を認識する受容体を発現している. この受容体はゲノムDNA上における遺伝子組換え (VDJ組換え) を経ることで抗体の可変部領域に多様性が生じ, 極めて多数の外来抗原の認識が可能となる. 抗体のクラスはIgM, IgD, IgG, IgA, およびIgEの5種類に分類される. B細胞分化の初期段階ではIgMおよびIgDクラスの抗体を発現している. 外来抗原を認識した成熟B細胞では脾臓の胚中心においてIgGやIgAクラスへのクラススイッチ組換えが誘導され, 抗原への特異性は変えずに抗体の機能を変化させることで, 外来抗原の

排除を効果的に行っている^{1, 2)}.

*In vitro*においては, B細胞を特定のマイトーゲン, およびT細胞や樹状細胞などから産生されるサイトカインで刺激することで, クラススイッチ組換えを誘導することができる. クラススイッチ組換えを誘導するサイトカインには, IL-4, IL-5, IFN- γ あるいはtransforming growth factor (TGF)- β などがあり, これらの種類により, クラススイッチ組換え後のクラスが決定される³⁾. 細菌の細胞壁の構成成分であり, Toll様受容体 (TLR) 4のリガンドであるlipopolysaccharide (LPS) とTGF- β との共刺激によりIgAクラススイッチ組換えが誘導され, IL-5がクラススイッチ組換え後, 協同的にIgA産生を促進する^{4, 5)}. IgAは粘膜免疫における主要な抗体であり, 上皮細胞に侵入しようとする病原体への防御を担っている⁶⁾. また, LPSあるいは抗CD40抗体とIL-4の共刺激により, IgEクラススイッチが誘導される. IgEはアレルギー反応において中心的な役割を

果たしている^{7,8)}。これらのことより、抗体産生の制御やその作用機序の解明は重要な課題である。

当研究所では、これまでに、がん細胞の排除に関わるナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞傷害活性を指標として、白樺樹皮由来のトリテルペン化合物であるベツリンがTGF- β およびPGE₂による免疫抑制を解除することを見出し⁹⁾、その作用機序の解明を進めてきた。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が¹⁰⁻¹²⁾、ベツリンがB細胞の抗体産生に及ぼす作用についての報告は調べた限りにおいてない。我々は、脾臓細胞においてTGF- β による免疫抑制をベツリンが解除することに着目し、脾臓B細胞において、LPSおよびTGF- β の共刺激により誘導されるIgA産生にベツリンが及ぼす作用を評価したところ、IgA産生を抑制することを明らかとした。このことより、本研究では、TGF- β 依存的なIgA産生を抑制するベツリンの作用機序を解明することを目的とし、B細胞のIgAクラススイッチ組換え機構におけるベツリンの作用点の解析を行った。

実験方法

1. 実験試薬

LPSはSIGMA社より購入した。組換えマウスIL-5(rmIL-5)および抗マウスCD40抗体 (clone: 1C10) はR&D Systems社から購入した。組換えマウスIL-4 (rmIL-4) はPeprotech社から、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) はMolecular Probes社からそれぞれ購入した。ビオチン化抗マウスCD43抗体 (clone: S7)、抗マウスFc γ 受容体 (clone: 2.4G2)、7-amino-actinomycin D (7AAD) およびストレプトアビジン結合磁気ビーズはBD Pharminge社から購入した。抗体定量のためのELISAキットはすべてBethyl社から、細胞増殖ELISA BrdU発色キットはRoche社から購入した。ベツリンはExtrasynthese社から購入し、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して、実験に供した。

2. 細胞および細胞培養

マウス脾臓B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。脾臓細胞を塩化アンモニウム/カリウム(ACK)緩衝液中に懸濁し、2分間静置して赤血球を除去した。培地にて 1.0×10^7 cells/mlに懸濁し、抗マウスFc γ 受容体 (clone: 2.4G2) を添加して氷上で15分間置いた後、抗マ

ウスCD43-ビオチン抗体 (clone: S7) を50倍希釈で添加して氷上で30分間静置した。2%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を含むHanks' balanced salt solution (HBSS) 緩衝液にて洗浄後、ストレプトアビジン結合磁気ビーズと混合して8°Cにて30分間静置した後、磁気細胞分離装置IMag (BD Pharminge社) によりCD43ネガティブ細胞を精製し、これを脾臓B細胞とした。FACSによる純度解析の結果、95%以上がB220陽性のB細胞であった。脾臓B細胞は10% FBS, 100 U/mlのペニシリン, 0.1 mg/mlのストレプトマイシンおよび55 μ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地中、37°C, 5% CO₂下で培養した。

3. 抗体産生量の測定

TGF- β に依存してB細胞より産生される抗体の分泌量を測定するために、脾臓B細胞を 1.0×10^6 cells/mlに調製し、LPS 2 μ g/ml, TGF- β 0.5 ng/mlおよび所定濃度のベツリンにて処置した後、96穴プレートに200 μ lずつ (2.0×10^5 cells/well) 播種し、37°C, 5% CO₂下で培養した。培養7日後に170 μ lの培養上清を回収し、培養液中のIgAおよびIgG₂b濃度をそれぞれMouse IgA ELISA Quantitation SetおよびMouse IgG₂b ELISA Quantitation Setを用い、添付のプロトコルに従って定量した。

抗CD40抗体とIL-4により誘導される抗体産生量を測定するために、脾臓B細胞を 1.0×10^6 cells/mlに調製し、抗マウスCD40抗体 1 μ g/ml, IL-4 10 ng/mlおよび所定濃度のベツリンにて処置した後、96穴プレートに200 μ lずつ (2.0×10^5 cells/well) 播種し、37°C, 5% CO₂下で培養した。培養7日後に170 μ lの培養上清を回収し、培養液中のIgEおよびIgG₁濃度をそれぞれMouse IgE ELISA Quantitation SetおよびMouse IgG₁ ELISA Quantitation Setを用い、添付のプロトコルに従って定量した。

4. 細胞増殖の評価

細胞増殖はチミジンのアナログである5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) の取り込みにより測定した。精製した脾臓B細胞を 1.0×10^6 cells/mlに調製し、LPS 2 μ g/ml, TGF- β 0.5 ng/mlおよび所定濃度のベツリンにて処置した後、96穴プレートに100 μ lずつ (1.0×10^5 cells/well) 播種し、37°C, 5% CO₂下で培養した。培養3日目に細胞増殖ELISA BrdU発色キットを用い、BrdUの取り込み量を添付のプロトコルに従って測定した。

5. 細胞分裂回数解析

脾臓B細胞の細胞分裂回数に及ぼすベツリンの影響を評価するために、脾臓B細胞を蛍光色素CFSEで標識し、分裂回数に応じてCFSEの蛍光強度が弱くなることを利用して

細胞の経た分裂回数を測定した。脾臓B細胞を37°Cで温めた0.1%FBSを含むphosphate buffered saline (PBS) に 1.0×10^7 cells/mlとなるように懸濁した後、CFSEを1 μ Mで添加し、37°Cで10分間インキュベートして蛍光色素CFSEで細胞を標識した。氷冷した10%FBSを含む培地で5分間インキュベートした後、同培地にて洗浄し、CFSE標識B細胞を得た。LPS 2 μ g/ml, TGF- β 0.5 ng/ml, IL-5 5 ng/ml および所定濃度のベツリンにてCFSE標識B細胞を処置し、96穴プレートに200 μ Lずつ(2.0×10^5 cells/well)播種して、37°C, 5% CO₂下で培養した。培養5日目に脾臓B細胞を7AADおよび抗IgA抗体で染色し、7AADにより染色される細胞は死細胞として除き、細胞分裂回数とIgA陽性細胞の割合をFACSにより解析した。

結 果

1. B細胞の抗体産生にベツリンが及ぼす影響の評価

脾臓B細胞では、LPSとTGF- β の共刺激によりIgAおよびIgG₂b産生が惹起される。ベツリンがIgAおよびIgG₂b産

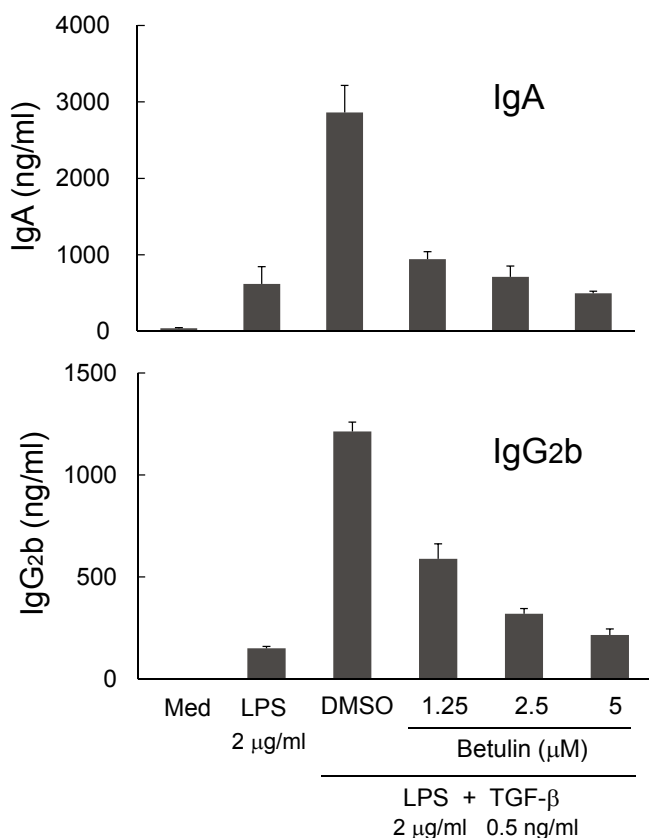


Fig. 1. Betulin suppresses immunoglobulin class switch recombination to IgA and IgG₂b

Splenic B lymphocytes were treated with LPS, TGF- β and DMSO or betulin for 7 days. IgA and IgG₂b concentrations were determined in the supernatants by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean (n = 3).

生に及ぼす影響を評価するために、精製したマウス脾臓B細胞をLPSとTGF- β の共刺激し、7日間培養した後、培養上清中のIgAおよびIgG₂b量を測定した。その結果、ベツリンはLPSとTGF- β の共刺激により誘導されるIgAおよびIgG₂bのいずれの抗体産生も1.25-5 μ Mの範囲において濃度依存的に抑制することが示された (Fig. 1)。また、IL-5存在下においても、同様の傾向が認められた (data not shown)。

さらに、異なる刺激により誘導されるクラススイッチ組換え誘導系として、抗CD40抗体およびIL-4の共刺激系においてもベツリンの作用を検討した。その結果、ベツリンは1.25-5 μ Mの範囲においてIgEおよびIgG₁の産生を濃度依存的に抑制し、TGF- β に依存しないクラススイッチ組換えにもベツリンが作用することが示された (Fig. 2)。

2. B細胞の細胞増殖にベツリンが及ぼす影響の評価

ベツリンが脾臓B細胞の細胞増殖に及ぼす影響を評価した。LPS刺激により細胞増殖が亢進されるが、TGF- β の添加により細胞増殖が顕著に抑制された。ベツリンはTGF- β

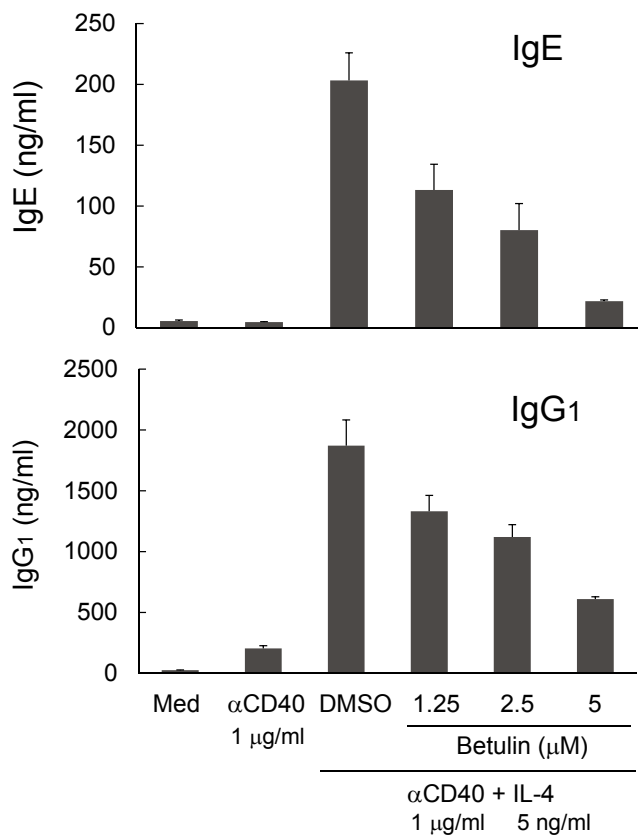


Fig. 2. Betulin suppresses immunoglobulin class switch recombination to IgE and IgG₁

Splenic B lymphocytes were treated with LPS, TGF- β and DMSO or betulin for 7 days. IgE and IgG₁ concentrations were determined in the cellular medium by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean (n = 3).

による増殖抑制にさらなる抑制を加え、特に5 μ Mのベツリン処置群ではDMSO処置群の3%程度にまで細胞増殖が抑制された (Fig. 3). がん細胞におけるベツリンの細胞増殖抑制作用については報告があるが^{13,14}, 高濃度でのベツ

リン処置により正常な脾臓B細胞においても増殖抑制作用が認められることが分かった.

3. B細胞のクラススイッチ組換えに及ぼす影響の評価

高濃度でのベツリンの添加により脾臓B細胞に細胞増殖抑制作用が確認されたことから、ベツリン処置群では細胞分裂回数がクラススイッチに必要な細胞分裂回数に達していない可能性が考えられ、細胞分裂回数を測定した.

脾臓B細胞をLPSおよびTGF- β で共刺激し、5日間培養した後、FACSにより生細胞の細胞分裂回数とIgA陽性細胞の割合を解析した. IgAクラススイッチ組換えは6回以上の細胞分裂を経た細胞において誘導されることが報告されているが^{15,16}, LPSとTGF- β の共刺激では、培養5日目において細胞分裂回数が6回に達した細胞が44.7%であるのと比較し、ベツリン処置群では24.7%にまで減少していることが分かった. また、細胞分裂回数6回に達した細胞群において、IgA陽性細胞はDMSO処置群では1.1%であったのに対し、ベツリン処置群では0.55%に減少していた (Fig. 4).

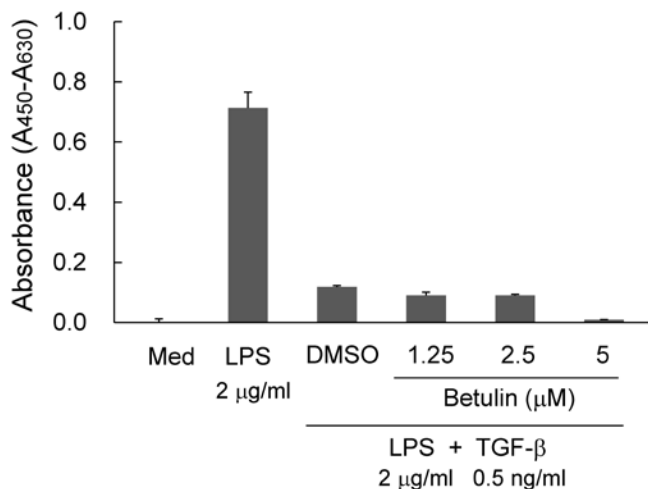


Fig. 3. Betulin inhibits the growth of splenic B lymphocyte
B lymphocytes were treated with LPS, TGF- β and DMSO or betulin for 3 days. The cell proliferation was measured using the BrdU colorimetric ELISA assay. Error bars indicate the SD from the mean (n = 3).

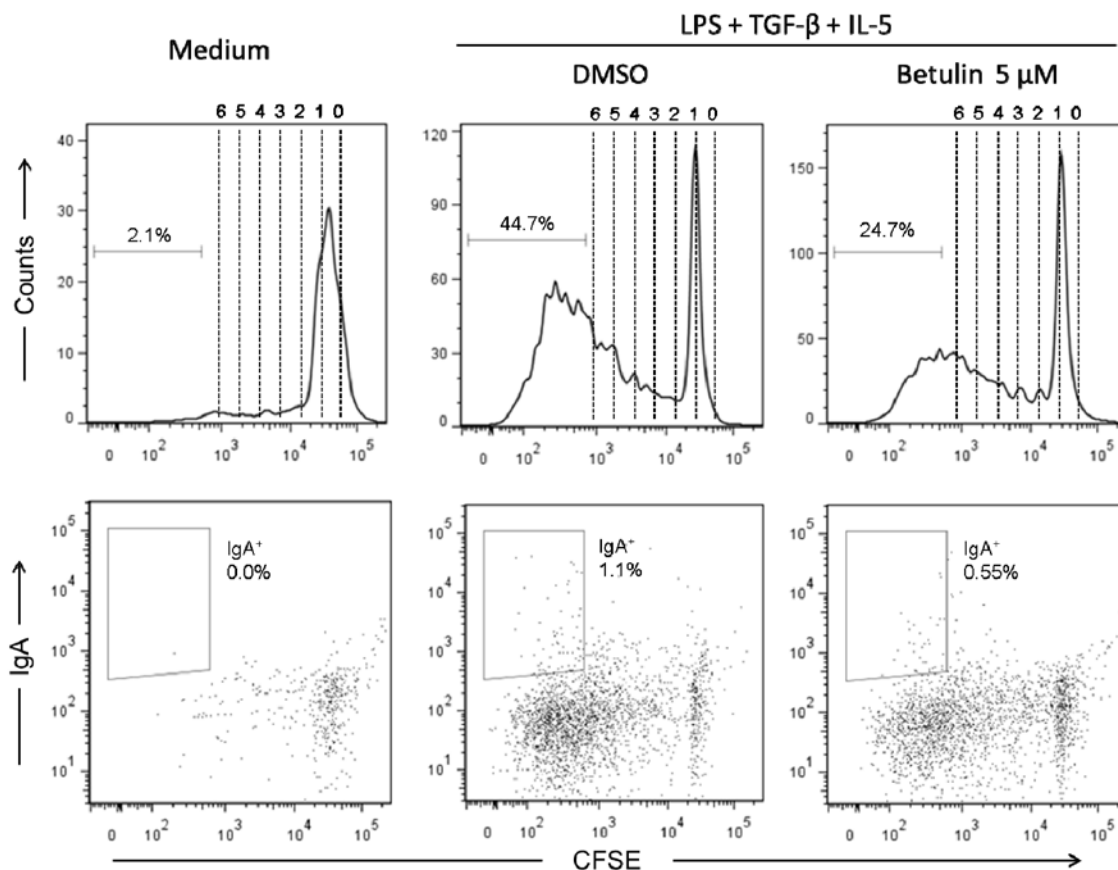


Fig. 4. Betulin inhibits cell division and IgA class switch recombination of splenic B lymphocytes
Splenic B lymphocytes were treated with LPS, TGF- β , IL-5, and DMSO or betulin for 7 days. The cell division numbers and IgA⁺ cells were analyzed on the gated B220⁺ cells by FACS.

考 察

これまでに我々は、マウス脾臓細胞におけるNK細胞の細胞障害活性を指標として、免疫抑制因子であるTGF- β 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、その作用機序の解明を進めてきた。しかし、この実験系は数種類の免疫細胞が混在しており、ベツリンの主な標的細胞が明らかでないため、ベツリンの作用を評価することができる単一の細胞集団を用いた評価系の構築が必要であった⁹⁾。

脾臓B細胞では、LPSとTGF- β の共刺激によりIgAクラススイッチ組換えが誘導され、IL-5がIgA産生を増大させることが知られている^{4, 5)}。我々は、このLPSとTGF- β の共刺激によるIgA抗体産生をベツリンが抑制することを見出した。これは、ベツリンがTGF- β シグナル伝達系に関与する分子を阻害している可能性を示唆するものであり、本研究では、ベツリンの作用機序解明の一端として、IgA産生抑制におけるベツリンの作用機序を解明することとした。しかし、刺激が異なる抗CD40抗体とIL-4の共刺激によるIgE産生誘導系においても、ベツリンはIgE産生を抑制することが明らかとなった。また、細胞増殖の評価において、TGF- β は強力な増殖抑制作用を示すが、TGF- β 受容体の阻害剤であるSB431542はTGF- β による増殖抑制に拮抗するのに対し、ベツリンは拮抗しないことから、ベツリンはSB431542のようなTGF- β 受容体の阻害剤とは異なる作用機序を有することが推察された。これらのことから、ベツリンはTGF- β のシグナル伝達経路に関与する分子を直接的に阻害するのではなく、IgAおよびIgEクラススイッチ組換え誘導機構に共通する過程を阻害しているものと考えた。

IgAクラススイッチ組換えを例にとると、クラススイッチ組換えの誘導には、(1) 5-6回の細胞分裂、(2) 生殖細胞系列C α 遺伝子の転写、(3) 活性化誘導シチジン脱アミノ酵素 (activation-induced cytidine deaminase; AID) の発現、(4) DNA切断・修復を伴うゲノムDNA組換え、の過程が必要である^{17, 18)}。細胞増殖の評価において、5 μ Mのベツリンの添加により顕著な細胞増殖抑制が認められたことから、ベツリン処置群では細胞分裂回数がクラススイッチ組換えに必要なとされる細胞分裂回数に達していない可能性が示唆された。細胞分裂回数とIgA陽性細胞の割合を解析した結果、細胞分裂回数が6回以上の細胞の割合が減少し、それに伴いIgA陽性細胞の割合も減少していた。抗CD40抗体とIL-4の共刺激系においても同様の検討を行った結果、細胞分裂回数が6回以上の細胞およびIgG₁陽性細胞の割合において同様の結果が得られた。一方、

LPSとTGF- β の共刺激あるいは抗CD40抗体とIL-4の共刺激下において、脾臓B細胞のAID遺伝子発現をリアルタイムPCR法により解析した結果、ベツリンの濃度依存的にAID遺伝子発現は抑制されることを確認しているが (data not shown)、これはベツリンによる細胞毒性により細胞の活性化が抑制されることによるものであると考えた。以上より、ベツリンによるB細胞の抗体産生抑制は、TGF- β シグナル伝達に関与する分子の阻害ではなく、細胞増殖抑制により十分な細胞分裂回数が得られずクラススイッチ組換えが抑制されることに起因するものと結論付けた。

抗がん作用として、ベツリンの細胞毒性や細胞増殖阻害については様々ながん細胞において数多く報告されているが¹⁰⁻¹²⁾、ベツリンはがん化した細胞と比較して正常の細胞では細胞毒性が低いことが知られている¹⁰⁾。しかし、マウス脾臓細胞よりB細胞を単離した実験系においては、B細胞の生存維持に関与する樹状細胞などの細胞群の除去により細胞毒性が現れやすくなったものと推察される¹⁹⁾。

本研究は、B細胞のクラススイッチ組換え誘導機構に着目してベツリンの作用機序を解析することにより、これまでに報告されてきた抗がん作用、抗ウイルス作用、抗炎症作用などの薬理作用に加え、抗体産生抑制に関する新たな知見を与えるものである。しかし、脾臓細胞を用いた免疫抑制解除の実験系において、B細胞の抗体産生とベツリンの作用との関連は明らかになっておらず、今後、B細胞の抗体産生以外の現象に目を向ける必要があると考える。また、NK細胞の活性化にはB細胞のみならず、樹状細胞も必須であることから、樹状細胞の単一培養系におけるベツリンの作用を検討していく予定である。

謝 辞

本研究は、文部科学省 地域イノベーション戦略支援プログラム 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) M Lorenz, S Jung, A Radbruch, Switch transcripts in immunoglobulin class switching., *Science*, **267** (5205), 1825-1828 (1995)
- 2) Stavnezer J, Immunoglobulin class switching., *Curr Opin Immunol.*, **8** (2), 199-205 (1996)
- 3) Coffman RL, Leberman DA, Rothman P., Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching., *Adv Immunol.*, **54**, 229-270 (1993)

- 4) Sonoda H., Matsumoto R., Hitoshi Y., Ishii T, Sugimoto M., Araki S., Tominaga A., Yamaguchi N., and Takatsu K., Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production., *J. Exp. Med.*, **170**(4), 1415-1420 (1989)
- 5) Sonoda E, Hitoshi Y, Yamaguchi N, Ishii T, Tominaga A, Araki S, Takatsu K., Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells., *Cell Immunol.*, **140**(1), 158-172 (1992)
- 6) Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P., The immune geography of IgA induction and function., *Mucosal Immunol.*, **1**(1), 11-22 (2008)
- 7) Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D., CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells., *J Exp Med.* **172**(6), 1861-1864 (1990)
- 8) Mandler R, Finkelman FD, Levine AD, Snapper CM., 4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching., *J Immunol.*, **150**(2), 407-418 (1993)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) Salin O, Alakurtti S, Pohjala L, Siiskonen A, Maass V, Maass M, Yli-Kauhaluoma 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)
- 13) Dehelean CA, Feflea S, Molnár J, Zupko I, Soica C., Betulin as an antitumor agent tested in vitro on A431, HeLa and MCF7, and as an angiogenic inhibitor in vivo in the CAM assay., *Nat Prod Commun.*, **7**(8), 981-985 (2012)
- 14) Drag M, Surowiak P, Drag-Zalesinska M, Dietel M, Lage H, Oleksyszyn J., Comparison of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines., *Molecules.*, **14**(4), 1639-1651 (2009)
- 15) Deenick EK, Hasbold J, Hodgkin PD., Switching to IgG₃, IgG_{2b}, and IgA is division linked and independent, revealing a stochastic framework for describing differentiation., *J Immunol.* **163**(9), 4707-4714 (1999)
- 16) Hasbold J, Lyons AB, Kehry MR, Hodgkin PD., Cell division number regulates IgG₁ and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4, *Eur J Immunol.* **28**(3), 1040-1051 (1998)
- 17) Deenick EK, Hasbold J, Hodgkin PD., Decision criteria for resolving isotype switching conflicts by B cells., *Eur J Immunol.*, **35**(10), 2949-2955 (2005)
- 18) Cerutti A., The regulation of IgA class switching., *Nat Rev Immunol.* **8**(6), 421-434 (2008)
- 19) Yoon SO, Zhang X, Berner P, Blom B, Choi YS., Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis., *J Immunol.*, **183**(1), 352-358 (2009)

シャクヤクの品種別薬理試験 (4) シャクヤクエキスの Prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生抑制作用

宮本 (山口) 朋美, 本田裕恵, 田村隆幸, 横田洋一, 松永孝之

Comparative pharmacological evaluation of extracts from various cultivars of *Paeonia lactiflora* (5) Inhibitory effect of *Paeonia lactiflora* extracts on PGE₂ production

Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO, Hiroe HONDA, Takayuki TAMURA, Yoichi YOKOTA,
Takayuki MATSUNAGA

要 約

富山県薬用植物指導センターで栽培された62品種のシャクヤクについて、マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7をLipid Aで刺激した時のPGE₂産生に対する抑制効果を比較検討した。シャクヤクエキスのPGE₂産生抑制作用は、指標成分のPaeoniflorin含量と弱い相関があり、PentagalloylglucoseやMethyl gallateの含量と比較的強い相関があった。

Paeoniflorin高含量に加え、PentagalloylglucoseやMethyl gallateの含量の高い品種が、鎮痛作用に適した品種として期待される。

Summary

In the present study, we examined the inhibitory effect of *Paeonia lactiflora* (62 cultivars) cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance to PGE₂ production. The PGE₂ production inhibitory action of *Paeonia lactiflora* extracts had a weak correlation to content of paeoniflorin, a principal component. There was comparatively strong correlation to content of pentagalloylglucose and content of methyl gallate. In addition to the paeoniflorin content, the pentagalloylglucose and the methyl gallate content will be important thing as a cultivar suitable for an analgesic action.

キーワード：シャクヤク, プロスタグランジンE₂, 痛み, ペンタガロイルグルコース

Keywords : *Paeonia lactiflora*, Prostaglandin E₂ (PGE₂), Pain, Pentagalloylglucose

シャクヤクは*Paeonia lactiflora* Pallas (*Paeoniaceae*)の根を乾燥したもので、鎮痛鎮痙薬、婦人薬、冷え性用薬、風邪薬、皮膚疾患用薬などの漢方処方に繁用される重要な生薬の1つである。平成20年度の国内需要は1,164トンでカンゾウについて生薬中第2位であるが、うち国産は41トンでわずか3.5%にすぎず、中国からの輸入に頼っている¹⁾。一方、シャクヤクは観賞用に品種改良され、花形や花色が多彩で、花壇用にも切り花としても楽しめることから、近年人気が高まっている。富山県薬用植物指導センターでも約230品種のシャクヤクを栽培している。これまで、薬用品種としては北宰相のように多収性で指標成分であるPaeoniflorin (PA) 含量の高いものが選抜されてきた²⁾。しかし、シャクヤクの薬理作用については、指標成分のPAだけでは説明できない。そこで、我々は収量や指標成分のPA高含量に加え、品種間の薬理活性を比較検討し、優良品種を富山ブランドのシャクヤクとして栽培普及につなげることを目的とし、研究を行っている。

鎮痛作用については、以下のような報告がある。PAは、

経口投与で酢酸ライジング反応³⁾、側脳室内投与でホルマリンによる疼痛反応の1相目と2相目⁴⁾、腹腔内投与でハチ毒による疼痛反応⁵⁾や内臓痛⁶⁾を抑制する。これらのPAの鎮痛作用機序として、オピオイドκ受容体やアデノシンA1受容体の関与が考えられている。

一方、PA以外の成分については、シャクヤクにも含まれ牡丹皮の主成分Paeonol (PE)は腹腔内投与でcarrageenan誘発熱性痛覚過敏を抑制し、PGE₂やシクロオキシゲナーゼ (COX)-2の産生抑制が関与すると考えられている⁷⁾。Methyl gallate (MG)は、COX-2に依存したPGD₂産生やLTC₄産生を抑制し⁸⁾、1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-13-D-glucose (PG)やGallic acid (GA)は、COX-2の活性を抑制する⁹⁾。これらの報告から、PA以外の成分も鎮痛作用に関与する可能性が高く、その作用機序としてはCOXを介したプロスタグランジン類の産生抑制と推測される。

そこで、痛みの増強物質であるPGE₂の産生抑制を指標にin vitroでシャクヤクエキスの品種間の活性を比較した。

実験方法

1. シャクヤクエキス調製

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同じくセンターで栽培された薬用種の梵天及び北宰相, 市販流通品の日本産シャクヤク (皮付き品種不明) と中国産シャクヤク (皮付き品種不明) を加えた64品種を検体とした. 栽培品種は一部を除き植え付け後8年目の株で, 既報⁴⁾に記載した方法で掘りとったシャクヤクの根を調製加工し, 製造したエキスを用いた. すなわち, 皮付きのまま洗浄・乾燥したシャクヤク末60 gに水/メタノール混液 (1:1) (50%メタノールと略す) 600 mlを加え, 1時間加熱還流抽出後, ろ過し, 40°C以下で約100 mlになるまで濃縮し, 真空凍結乾燥を行い, エキス I を得た. 抽出残渣に同様の操作を行い, エキス II を得た. エキス I, II を混合したものを50%メタノールエキスとした. 市販流通品も同様の方法で抽出し, 50%メタノールエキスを得た.

2. 細胞及び細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7は, 10%の非働化ウシ胎児血清 (FBS), 100 U/mL のペニシリン, 0.1 mg/mL のストレプトマイシン及び292 µg/mLのL-グルタミンを含むDMEM 培地中にて継代, 維持した.

3. PGE₂の定量

RAW264.7 を96穴プレートに 1×10^5 cells/well となるよう播種し, CO₂インキュベータで37°C, 2時間培養した. その後, シャクヤクエキスとLipid A (Sigma) の存在下及び非存在下で24時間培養し, その培養上清を回収した. 培養上清中のPGE₂は, Cayman Chemical社のマウスPGE₂ Express EIA kitを用いて測定した.

4. シャクヤク成分とPGE₂産生抑制作用の50%阻害濃度 (IC₅₀) との相関

シャクヤクエキスを100, 300 µg/mLの濃度で用い, 計算式より50%阻害濃度 (IC₅₀) を計算した. 計算式: $IC_{50} = 10^{(\text{LOG}(A/B) * (50 - C) / (D - C) + \text{LOG}(B))}$ A:50%を挟む高い濃度 B:50%を挟む低い濃度 C:Bでの阻害率 D:Aでの阻害率.

Albiflorin(AL), Benzoic acid(BA), Benzoylpaeoniflorin (BP), Catechin(CA), Oxypaeoniflorin(OP), PA, PG, GA, MG, 及びPEの10成分について, 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) にて定量した既報⁴⁾ のデータを用い, PGE₂産生抑制作用のIC₅₀との相関を解析した.

5. データの解析

実験結果は平均値±標準偏差で表した. 有意差の検定は, One-way-ANOVAとDannett's test による多重比較を用い, 有意水準は5%とした.

結果

1. シャクヤクエキスによるPGE₂産生抑制作用の品種間の比較

マウスのマクロファージ様細胞株RAW264.7をLipid A (1 µg/mL) で刺激すると, 2,067 pg/mLのPGE₂が産生し, 国産及び中国産の市販流通シャクヤクより抽出したメタノールエキス (100-1000 µg/mL) で濃度依存的にPGE₂産生は抑制された (Fig. 1). また, データには示していないが, 溶媒のPGE₂産生量73.5 pg/mLと比較して, シャクヤクエキス単独では, 1000 µg/mLの最高濃度でも国産80.7 pg/mL, 中国産104.2 pg/mLと溶媒とほぼ同程度であり, シャクヤクエキスにエンドトキシンが混入していたとしても, 実験結果には影響を及ぼさないレベルであることを確認している.

市販流通品でPGE₂産生が半分程度にまで抑制された300 µg/mLの濃度を用いて品種間の比較を行った. 市販流通品において国産と中国産でPGE₂抑制作用はほぼ同程度だったことから, 以後の実験では比較対照として国産のみを用いた. Lipid A刺激によるPGE₂産生量を100%として, 各シャクヤクを加えた時のPGE₂産生量を%で示した (Fig. 2). 国産の市販流通品のPGE₂産生量は, 1回あたりn=2-3

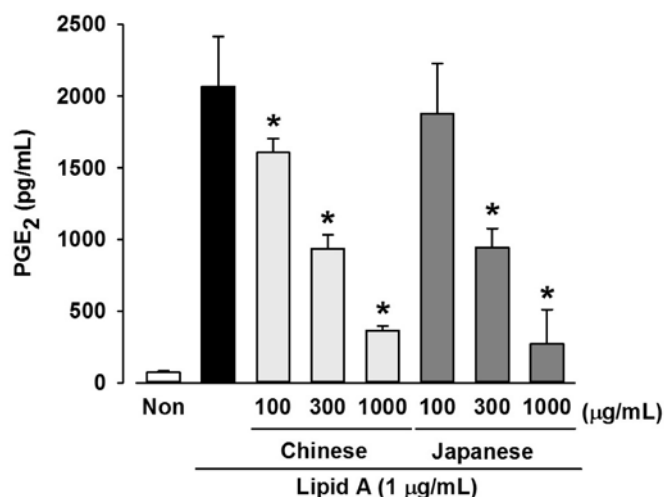


Fig. 1. Inhibitory effect of extracts from Chinese or Japanese *Paeonia lactiflora* on the market on the Lipid A-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells

RAW264.7 cells were pretreated with the extracts for 30 min and stimulated with lipid A (1 µg/mL) for 24 h at 37°C. PGE₂ production in the culture supernatants were measured by ELISA. The data are expressed as mean ± S.D. of 3-6 wells. *P < 0.05 vs. ■

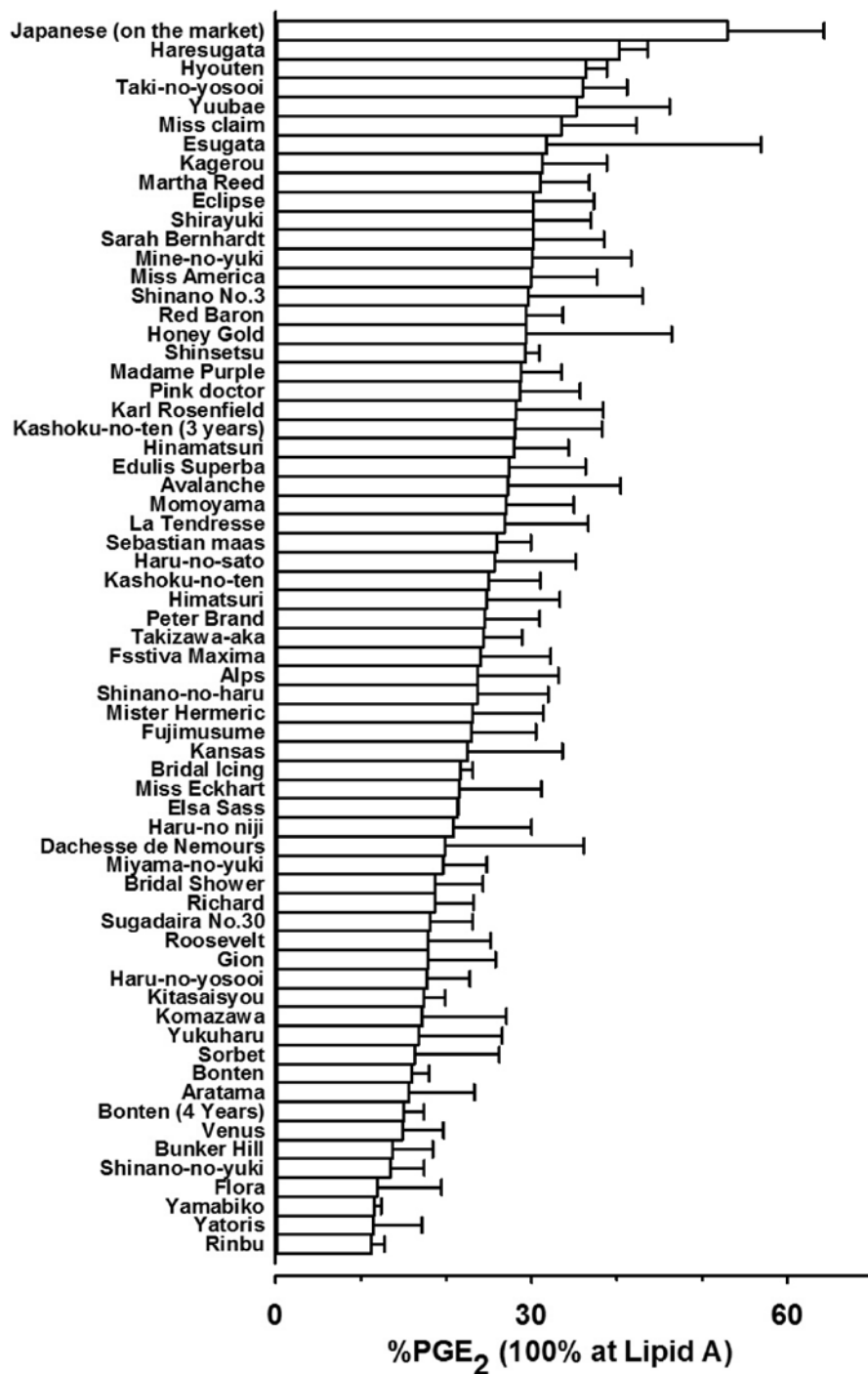


Fig. 2. Effect of extract from various *Paeonia lactiflora* on Lipid A-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells

The cells were pretreated with the extracts (300 μg/mL) for 30 min and stimulated with lipid A (1 μg/mL) for 24 h at 37°C. PGE₂ production in the culture supernatants were measured by ELISA. PGE₂ production (%) expressed the production caused in lipid A without an extract as 100%. The data are expressed as mean ± S.D. of 2-6 wells (except Japanese on the market, n = 44).

の複数回の平均で53.0%とほぼ半分まで抑制された。栽培シャクヤクは1回の実験値のみの8品種を除き、1回あたりn=2-3の2回の実験の平均で示した。全ての栽培品種は市販流通品より抑制作用が強く、半分以下まで抑制した。また、シャクヤクエキス単独で顕著な細胞毒性はみられなかった(データ示さず、本田の報告参照)。

2. PGE₂産生抑制のIC₅₀とシャクヤク成分の相関

300 μg/mLの濃度で抑制作用が強かった品種を中心に32品種と国産流通品について100, 300 μg/mLと2つの濃度を用いて、IC₅₀を算出した(Table 1)。IC₅₀が100-300 μg/mLの中におさまらなかった7品種については参考値であるが、調べた32品種においてIC₅₀は絵姿1品種を除き国産の市販

流通品より小さく、PGE₂抑制作用が強かった。薬用品種の梵天（8年株，4年株）と北宰相はいずれも作用が強く、IC₅₀の小さい上位8品種に含まれたが、切り花用品種の中にも薬用品種と同程度かそれ以上の効果を持つ品種があった。

次に、AL, BA, BP, CA, OP, PA, PG, GA, MG, 及びPEの10成分について、エキス中の含量（%）とIC₅₀との相関を調べたところ、指標成分であるPAは相関係数-0.267と弱い負の相関だったのに対し、PGは-0.617, MGは-0.679と比較的強い負の相関が認められた（Fig.3）。すなわち、IC₅₀が小さい（阻害作用が強い）ほど、シャクヤクエキス中のPGやMGの含量が高かった。

考 察

本研究では、マウスのマクロファージ様細胞株RAW264.7をLipid Aで刺激した時のPGE₂産生に対する抑制作用を指標に、in vitroでシャクヤクエキスの品種間の活性を比較した。Lipid A（1 μg/mL）でRAW264.7細胞を刺激すると、約2,000 pg/mLのPGE₂が産生した。Lipid Aは、Lipopolysaccharide（LPS）の活性部位である。RAW264.7細胞においてLPS（10 μg/mL）により約2,000 pg/mLのPGE₂が産生された報告¹⁰やLPS（1 μg/mL）により約600 pg/mLのPGE₂が産生され

Table 1. 50% inhibition concentration (IC₅₀) of extracts from 32 cultivars of *Paeonia lactiflora* to PGE₂ production

Name	IC ₅₀	Name	IC ₅₀	Name	IC ₅₀
Bridal Icing	13.0	Bunker Hill	127.9	Yatoris	188.3
Pink doctor	78.8	Haru-no-yosooi	136.9	Gion	191.2
Bonten	84.5	Haresugata	141.3	Yukuharu	191.4
Bridal Shower	86.1	Flora	148.7	Sorbet	198.5
Honey Gold	90.1	Fsstiva Maxima	149.5	Alps	201.5
Kitasaisyou	95.7	Kansas	151.0	Aratama	213.0
Richard	116.4	Roosevelt	160.0	Komazawa	230.6
Haru-no niji	117.6	Shinano-no-haru	164.2	Shinano-no-yuki	236.7
Bonten (4 Years)	120.0	Miss Eckhart	168.5	Japanese	288.4
Yamabiko (7 Years)	121.2	Sugadaira No.30	170.8	(on the market)	
Miyama-no-yuki	125.1	Dachesse de Nemours	174.1	Esugata	308.5
Rinbu	126.8	Venus	184.7		

Each value shows the mean value (μg/mL, n = 2-4).

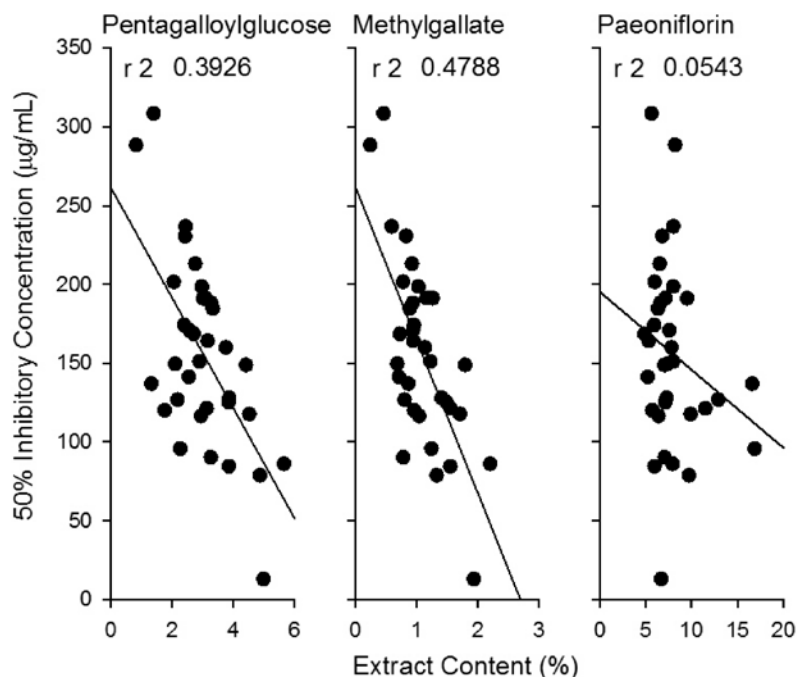


Fig. 3. Correlation between each component of extract contents and IC₅₀ of PGE₂ production

た報告¹¹⁾と矛盾しない。

PGE₂は、痛みの増強物質として知られ、アラキドン酸カスケードによりアラキドン酸から生成される。すなわち、生体膜のアラキドン酸がホスホリパーゼA2により切り出され、遊離したアラキドン酸はシクロオキシゲナーゼ(COX)により代謝されPGG₂になる。PGG₂はPGH₂に変換され、この反応もCOXが担う。PGH₂からプロスタグランジンE合成酵素の働きによりPGE₂が作られる¹²⁾。疼痛、発熱、炎症の治療に用いられる非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)は、COXを阻害し、PGE₂などのプロスタグランジン類の生成を阻害することで作用を発現する。従って、PGE₂産生抑制作用の強い品種は、鎮痛作用が期待できる。

シャクヤクの50%メタノールエキスは、300 μg/mLの濃度でPGE₂産生を半分以下まで抑制した。国産の市販流通品は、抽出までの調製加工が異なり、また品種も不明なため厳密な比較はできないが、調べた全ての栽培品種において、国産の市販流通品よりもPGE₂産生抑制作用は強かった。また、約半数の32品種についてIC₅₀を求め、既報⁴⁾の成分分析データとの相関を調べたところ、エキス中のPGやMG含量と比較的強い相関がみとめられた。Asprinを前処置し、COX-1を介したPGE₂産生を排除したRAW264.7細胞を2.5 μg/mLのLPSで刺激したCOX-2を介するPGE₂産生は、PG (0.8-20 μg/mL)で濃度依存的に抑制され、IC₅₀は約8 μg/mLだった⁹⁾。今回IC₅₀を算出したシャクヤク50%メタノールエキスのIC₅₀の平均は156 μg/mLでPG含量の平均は3%だったことから、PGとしてのIC₅₀は、約5 μg/mLと推測される。PGE₂産生を誘導する刺激が異なるので単純比較は難しいが、シャクヤク50%メタノールエキスにはPG以外にも活性成分が含まれるため、50%メタノールエキスから推定されるPGとしてのIC₅₀の方が小さいのかも知れない。実際にPG以外にもMGとも相関があり、MGは、COX-2阻害活性(IC₅₀約17 μM)を有し、COX-2に依存したPGD₂産生やLTC₄産生を抑制する⁸⁾ことから、PGE₂の産生を抑制する作用も十分考えられる。PG同様に、IC₅₀を算出したシャクヤク50%メタノールエキス中にMGは平均約1%含まれ、MGとしてのIC₅₀は、約1.8 μg/mLと推測され、こちらもMGの分子量184.15より計算されたCOX-2阻害活性のIC₅₀(約3 μg/mL)より小さい。

一方、シャクヤクにも含まれる牡丹皮の主成分PEとは相関がみられなかった。PEは腹腔内投与でcarrageenanによる足浮腫の浸出液中のPGE₂産生を抑制し、carrageenan誘発熱性痛覚過敏を抑制する⁷⁾。シャクヤク中のPE含量は少なく、今回の50%メタノールエキスにはほとんど検出できなかった。また、エキス中の含量が約8%と高く、指標成分であるPAは弱い相関だった。PAはRAW264.7細胞へ

のLPS刺激によるPGE₂産生を抑制する¹³⁾。PGの含量がそれほど高くないのにIC₅₀が小さかった北宰相や春の粧は、PA含量が非常に高い品種のため、効果が強い可能性も考えられる。ただし、梵天のようにPGやPAの含量がそれほど高くないにもかかわらず、IC₅₀の小さい品種もあることから、分析した10成分以外にも活性成分がある可能性や、成分のバランスが関与する可能性も否定できない。しかしながら、PAにはPGE₂産生抑制作用以外にもオピオイドκ受容体やアデノシンA1受容体を介した鎮痛作用の報告³⁻⁶⁾もあることを勘案すると、エキス中のPA含量が高いことに加え、PGやMGの含量の高い品種が、鎮痛作用に適した品種として期待される。

文 献

- 1) 原料生薬使用量等調査報告書-平成20年度の使用量、日本漢方生薬製剤協会生薬委員会、2011年
- 2) Hatakeyama Y., Kumagai T., Katsuki S., Homma N., Ishizaki S., Miura T., Sawai K., Yamagishi T., Nishizawa M., Hayashi T., Anetai M., Studies on cultivation and breeding of *Paeonia lactiflora* PALLAS (1) Characteristics of a new medicinal cultivar "Kitasaishou". *Natural Medicines* 52(2), 103-108(1998)
- 3) Sugishita E., Amagaya A., Ogihara Y., Studies on the combination of glycyrrhizae radix in shakuyakukanzoto. *J. Pharm. Dyn.* 7, 427-435 (1984)
- 4) Tsai HY., Lin YT., Tsai CH., Chen YF., Effects of paeoniflorin on the formalin-induced nociceptive behaviour in mice. *J. Ethnopharmacol.* 75, 267-271 (2001)
- 5) Yu HY., Liu MG., Liu DN., Shang GW., Wang Y., Qi C., Zhang KP., Song ZJ., Chen J., Antinociceptive effects of systemic paeoniflorin on bee venom-induced various 'phenotypes' of nociception and hypersensitivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 131-140 (2007)
- 6) Zhang XJ., Li Z., Leung WM., Liu L., Xu HX., Bian ZX., The analgesic effect of paeoniflorin on neonatal maternal separation-induced visceral hyperalgesia in rats. *J. Pain* 9(6), 497-505 (2008)
- 7) Chou TC., Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 139, 1146-1152 (2003)
- 8) Kim SJ., Jin M., Lee E., Moon TC., Quan Z., Yang JH., Son KH., Kim KU., Son JK., Chang HW., Effects of methyl gallate on arachidonic acid metabolizing enzymes: cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in

- mouse bone marrow-derived mast cells. Arch. Pharm. Res. **29**(10), 874-878 (2006)
- 9) Lee SJ., Lee IS., Mar W., Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase- 2 activity by 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose in murine macrophage cells. Arch. Pharm. Res. **26**(10), 832-839 (2003)
- 10) Lee J., Yang G., Lee K., Lee MH., Eom JW., Ham I., Choi HY., Anti-inflammatory effect of *Prunus yedoensis* through inhibition of nuclear factor- κ B in macrophages. J. Altern. Complement. Med. **13**, 92-100 (2013)
- 11) Wang W., Luo M., Fu Y., Wang S., Efferth T., Zu Y., Glycyrrhizic acid nanoparticles inhibit LPS-induced inflammatory mediators in 264.7 mouse macrophages compared with unprocessed glycyrrhizic acid. Int. J. Nanomed. **8**, 1377-1383 (2013)
- 12) Yokota K., Arachidonate Cascade and Related Recent Studies (Agrochemistry and Biology Series) . 日本農薬学会誌 **17**(4), S297-S305 (1992)
- 13) Kim ID., Ha BJ., Paeoniflorin protects RAW 264.7 macrophages from LPS-induced cytotoxicity and genotoxicity. Toxicol. In Vitro **23**, 1014-9 (2009)

シャクヤクの品種別薬理試験 (5)

シャクヤクエキスのIL-6産生抑制効果に関する検討

本田 裕恵, 宮本(山口) 朋美, 横田 洋一, 田村 隆幸, 松永 孝之

Comparative pharmacological evaluation of extracts from various cultivars of *Paeonia lactiflora* (5) Anti-inflammatory Effect of Extracts

Hiroe HONDA, Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO, Yoichi YOKOTA, Takayuki TAMURA,
Takayuki MATSUNAGA

要 約

シャクヤクの根は抗炎症効果があり、長く使用されてきた。本研究では、富山県薬用植物指導センターで栽培された62種類のシャクヤク根エキスについて、抗炎症効果を評価し、比較検討を行った。エキスの抗炎症効果を評価するため、マウスマクロファージ細胞株RAW 264.7からのTLR4リガンドであるlipid AによるIL-6産生量に対するエキスの効果を調べた。その結果、市販品シャクヤク根エキスに比べて比較的抑制効果の高いものが7種類認められた。

これらの結果から、炎症が原因となる疾患において、品種によって治療効果に差が認められる可能性が示された。

Summary

Paeony root has long been used for its anti-inflammatory effects. In this study, anti-inflammatory effect of root extracts from 62 cultivars of *Paeonia lactiflora* cultivated in Toyama prefectural center for medical plant guidance was evaluated in comparison with the paeony roots on the market. The RAW 264.7 macrophages were treated with lipid A as a TLR4 ligand in the presence of the extracts, IL-6 production in the culture supernatants were measured by ELISA. As a result of that, 7 cultivars of *Paeonia lactiflora* showed comparatively stronger suppressive effects.

These results indicate the possibility that therapeutic efficiency for the diseases caused by inflammation is different among various cultivars of paeony roots.

キーワード：シャクヤク, IL-6, 抗炎症効果, カテキン

Keywords : *Paeonia lactiflora*, IL-6, anti-inflammatory effect, catechin

日本薬局方に収載されているシャクヤクは、*Paeonia lactiflora* Pallasの根と規定されており¹⁾、一般用漢方処方の約1/3に配合されている²⁾。一般に、鎮痙、鎮痛、鎮静、収斂などの用途で使用されている他、抗炎症作用についても報告されている³⁾。

日本薬局方においてシャクヤクの指標成分とされているペオニフロリン¹⁾やアルビフロリンのモノテルペンについては、これらの品種間での含量比較について実施され、品種間で差が認められている⁴⁻¹⁴⁾。また、品種や産地の異なるシャクヤクについて、塩基配列や成分比較を基に系統解析が行われている事例もある^{2, 15)}。しかしながら、これほど多種のシャクヤクを対照に薬理効果を指標に優良品種を選抜しようという試みはこれまでではあまりなかった。

マクロファージは自然免疫を担う細胞であり、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¹⁶⁾。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 (LPS) の応答に必要なものである^{17, 18)}。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^{19, 20)}。LPSがTLR4/MD-2複合体に結合すると二量体化を誘導し、LPS-TLR4/MD-2複合体を形成する²¹⁾。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²²⁾。MyD88により転写因子であるNF- κ Bの活性化が起こり、IL-6やTNF- α のような炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導する²²⁾。

今回、富山県薬用植物指導センターにおいて栽培されている62種のシャクヤクについて、品種別に成分分析を行うとともに薬理試験を実施し、優良品種の選抜を行うことと

した。当報告では、シャクヤクの数多い薬理作用のうち抗炎症作用に着目し、マクロファージ細胞株にLPSの活性部位であるlipid A刺激を加え、*in vitro*の系においてIL-6産生抑制効果について評価した結果を報告する。

実験方法

1 シャクヤクエキス調製

本実験で用いたシャクヤクエキスは、富山県薬用植物指導センターで栽培されたシャクヤクから調製を行った。大部分の品種は植え付け後8年目の株を使用し、やまびこは7年、春の粧は3年栽培のものを使用した。大和シャクヤクの代表的な品種である梵天は栽培4年と8年のものを使用し、華燭の典は栽培3年と8年のものを使用した。また、比較対照とするシャクヤクとして、市販品である日本産(ツムラ)及び中国産(ウチダ和漢薬)を使用した。

エキスは、既報^{23,24)}に記載した方法で製造した。すなわち、皮付きのまま洗浄・乾燥したシャクヤク末60gに水/メタノール混液(1:1)(50%メタノールと略す)600mlを加え、1時間加熱還流抽出後ろ過し、40°C以下で約100mlになるまで濃縮し、真空凍結乾燥を行い、エキスIを得た。抽出残渣に同様の操作を行い、エキスIIを得た。エキスI, IIを混合したものを50%メタノールエキスとした。市販流通品も同様の方法で抽出し、50%メタノールエキスを得た。

2 試薬

Lipid A (Sigma) を実験に供した。

3 細胞及び細胞培養

マウスマクロファージ細胞株RAW264.7は、10%の非働化ウシ胎児血清(FBS)、100 U/mLのペニシリン、0.1 mg/mLのストレプトマイシン及び292 µg/mLのL-グルタミンを含むDMEM培地中にて継代、維持した。

4 サイトカイン量の測定

RAW264.7を96穴プレートに 1×10^5 cells/wellとなるよう播種し、CO₂インキュベータにおいて37°Cで2時間培養した。その後、シャクヤクエキスとLipid A (TLR4リガンド)の存在下及び非存在下で24時間培養し、その培養上清を回収した。IL-6は、R&D SYSTEMS社のマウスIL-6定量用ELISAキットを用いて測定した。

5 細胞毒性の評価

RAW264.7を96穴プレートに 1×10^5 cells/wellとなるよう播種し、CO₂インキュベータにおいて37°Cで2時間培

養した。その後、シャクヤクエキスの存在下及び非存在下で24時間培養し、Cell Titer 96 (Promega)を用いて評価を行った。

6 IL-6産生抑制効果とシャクヤク成分含量との間の相関関係の解析

ペオニフロリン、オキシペオニフロリン、ベンゾイルペオニフロリン、アルビフロリン、ペンタガロイルグルコース、没食子酸、没食子酸メチル、安息香酸、ペオノール、及びカテキンの10成分について、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)にて定量した既報^{23,24)}のデータを用い、IL-6産生抑制効果との相関を解析した。

実験結果

1 市販品シャクヤクエキスのIL-6産生抑制効果

今回、富山県薬用植物指導センターで栽培されたシャクヤクエキスのIL-6産生抑制効果を調べるための比較対照として、市販品であるシャクヤク根乾燥品(スライス状)2種(日本産及び中国産)を選定し、サンプルエキスと同様に抽出した後、その効果を検討した。その結果、日本産及び中国産シャクヤクエキスはTLR4リガンドであるLPSの活性部位であるlipid AによるRAW264.7細胞からのIL-6産生を同程度抑制した(Fig.1a)。両エキスともに、300 µg/ml、及び1,000 µg/mlという濃度では有意なIL-6産生抑制効果を認めた(Fig.1a)。しかしながら、これらの濃度において日本産及び中国産シャクヤクエキスによる細胞毒性効果は認められなかった(Fig.1b)。

また、IL-6産生抑制効果が両エキスでほぼ同等であったことから、以降の実験では市販品の日本産シャクヤクエキスを比較対照とし、300 µg/mlという濃度での効果を比較することとした。

2 各品種のシャクヤクエキスのIL-6産生抑制効果

次に、各品種のシャクヤクエキスの効果を優良品種とされる梵天及び市販品日本産シャクヤクエキスと比較検討した(Table1)。評価は、市販品日本産シャクヤクエキスのIL-6産生抑制度を1としておこなった。すなわち、(Lipid AによるIL-6産生量－各種シャクヤクエキス添加時のIL-6産生量) / (Lipid AによるIL-6産生量－市販品国内産シャクヤクエキス添加時のIL-6産生量)の式から算出される阻害活性比を指標とした。

その結果、7種のシャクヤクエキスについて阻害活性比が1.3以上で市販品日本産シャクヤクエキスよりもIL-6産生抑制効果が比較的強く認められた。また、逆に阻害活性

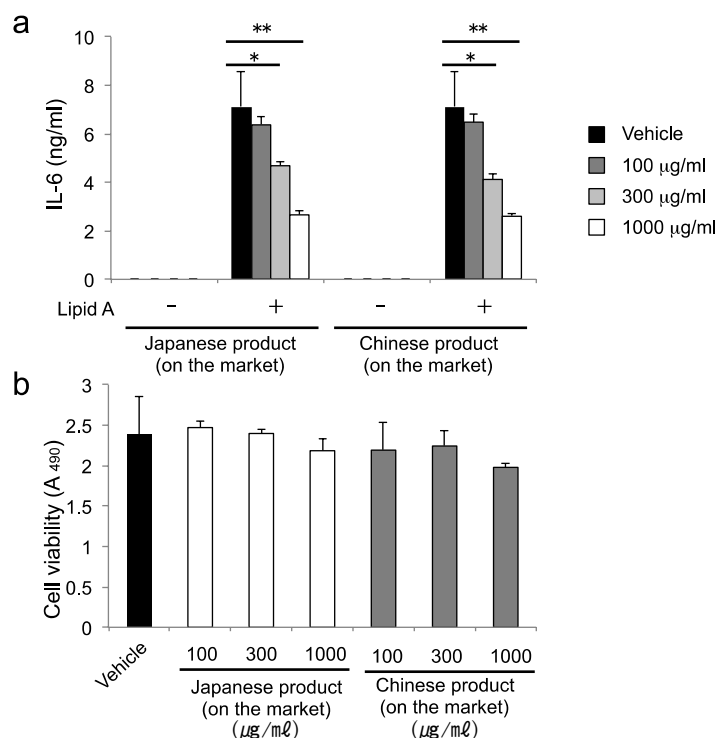


Fig. 1. The effects of extracts from two kinds of *Paeonia lactiflora* on the market for lipid A-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells
a RAW264.7 cells were pretreated with the extracts for 30 min and stimulated with lipid A for 24 h at 37°C, and IL-6 production in the culture supernatants were measured by ELISA. The data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells. * P <0.05, ** P <0.01 vs. each of control.
b Effects of *Paeonia lactiflora* extracts on murine macrophage viability. RAW264.7 cells were treated with various doses of the extracts for 24 h. Cell viability was determined as described in the Materials and methods. The data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells.

Table 1. Inhibition activity of extracts from the 62 cultivars of *Paeonia lactiflora* for IL-6 production in RAW 264.7 cells

Name	Inhibition activity ratio	Name	Inhibition activity ratio
Haru-no-yosooi (cultivation for 3 years)	1.84	Peter Brand	1.03
Kitasaishou	1.75	Yatoris	1.01
Bonten (cultivation for 4 years)	1.51	Kashoku-no-ten (cultivation for 3 years)	1.00
Dachesse de Nemours	1.46	Sarah Bernhardt	0.98
Miss Eckhart	1.40	Shinano No.3	0.97
Sugadaira No.30	1.34	Taki-no-yosooi	0.94
Komazawa	1.34	Bridal Icing	0.94
Shinano-no-haru	1.29	Roosevelt	0.93
Rinbu	1.28	Miyama-no-yuki	0.93
Yukuharu	1.26	Martha Reed	0.91
Bunker Hill	1.26	Momoyama	0.91
Alps	1.25	Honey Gold	0.91
Avalanche	1.24	Flora	0.90
Shinano-no-yuki	1.23	Himatsuri	0.90
Aratama	1.22	Fujimusume	0.90
Takizawa-aka	1.21	Gion	0.89
Hinamatsuri	1.20	Mine-no-yuki	0.89
Venus	1.19	Red Baron	0.89
Sebastian Maas	1.19	Bridal shower	0.88
Kansas	1.15	Hyouten	0.85
Shinsetsu	1.14	Pink doctor	0.84
Bonten	1.14	Richard	0.81
Sorbet	1.13	Madame Purple	0.78
Kagerou	1.10	Eclipse	0.76
Yuubae	1.10	Mister Hermeric	0.76
Festiva Maxima	1.09	Haresugata	0.73
Miss America	1.09	Miss claim	0.68
Haru-no-sato	1.08	Edulis Superba	0.68
Kashoku-no-ten	1.08	Shirayuki	0.63
Yamabiko	1.06	Haru-no-niji	0.62
Karl Rosenfield	1.05	Elsa Sass	0.43
Esugata	1.04		
La Tendresse	1.04	Japanese product (on the market)	1.00

$$\text{Inhibition activity ratio} = \frac{(\text{IL-6 production induced by lipid A}) - (\text{IL-6 production in addition with each extract})}{(\text{IL-6 production induced by lipid A}) - (\text{IL-6 production in addition with the extract of Japanese product on the market})}$$

比が0.7以下でIL-6産生抑制効果が比較的弱いエキスが5種であった。

今回、華燭の典及び梵天については栽培期間の異なるシャクヤクエキスについても検討を行った。その結果、華燭の典については3年栽培品と8年栽培品の間でIL-6産生抑制効果にほとんど差は認められなかった。また、梵天については4年栽培品で阻害率1.51、また8年栽培品で1.14であり、栽培期間の短いものの方が活性が強い傾向が認められた。

3 各種シャクヤクエキスのIL-6産生抑制効果と成分の活性相関性

既報のとおり、今回調製したシャクヤクエキスについては主要10成分について成分分析を行っており^{23,24}、今回求めた各種シャクヤクエキスのIL-6産生抑制効果との間の活性相関を検討した。その結果、全ての成分について強い相関性は認められなかった。

日本薬局方において標準物質とされているペオニフロリン含量との間には強い相関性が認められなかったものの、IL-6産生抑制効果の最も強かった北宰相及び春の粧についてはペオニフロリン含量が高かった (Fig.2a)。オキシペオニフロリンやカテキンについても、活性との間に強い相関性は認められなかったものの、これらの成分の含量が上位2位に入る北宰相及び春の粧についてIL-6産生抑制効果が強く認められた (Fig.2b,c)。ベンゾイルペオニフロリン、アルビフロリン、ペンタガロイルグルコース、没食子酸、没食子酸メチル、安息香酸及びペオノールについては相関性が認められなかった (データは示していない)。なお、これらのエキスは調べた300 $\mu\text{g/ml}$ という濃度では細胞毒性を示さなかった (データは示していない)。

考 察

各種シャクヤクエキスの効果を評価するにあたり、病院や薬局で取り扱われている市販品を比較対照とした。日本産及び中国産の2種のシャクヤクエキスについてIL-6の産生抑制効果を比較したところ、細胞毒性の認められない濃度においてほぼ同等の活性が認められた (Fig.1)。今回調べた少なくとも2種類の市販品においては、IL-6産生抑制効果に差異は認められなかった。そこで、市販品日本産シャクヤクエキスの抑制制度に対する各種エキスの抑制制度の比を指標に評価を行うこととした。

シャクヤクやシャクヤクに含まれる成分に関する抗炎症作用については、以前より数多く報告がなされている。シャクヤク煎出エキスはラット経口投与でアジュバント関節炎を抑制し^{1,25}、主要成分であるペオニフロリンについ

ては鎮痛作用、鎮静作用、鎮痙作用、抗ストレス潰瘍作用、血圧降下作用、血管拡張作用、平滑筋弛緩作用とともに抗炎症作用についても報告されている³。ペオニフロリンはLPS刺激したRAW264.7細胞からのTNF- α 、IL-6、及びHigh-mobility group box-1の産生を用量依存的に減少させ、転写因子NF- κ Bの活性化を抑制する²⁶。また、*in vivo*においてペオニフロリンを経口投与したマウスにLPSを投与すると、血清中のTNF- α 、IL-6、IL-1 β 、及びHigh-mobility group box-1が減少する²⁶。今回調査対象とした62種類のシャクヤクエキスについて、IL-6産生抑制効果とエキス中ペオニフロリン含量との活性相関を検討したところ、強い相関性は認められなかった (Fig.2a)。しかし、IL-6産生抑制効果が上位1、2位である北宰相及び春の粧では、ペオニフロリン含量が群を抜いて多かった。また、オキシペオニフロリンについても同様の傾向が認められた (Fig.2b)。ベンゾイルペオニフロリンでは含量と活性との間に相関性はなく、また北宰相及び春の粧が含量の高い傾向にあった (データは示していない)。

シャクヤクに含まれるその他の成分についてもLPSによる炎症性サイトカイン産生やそれに関わる転写因子NF- κ Bの活性化を抑制する効果が報告されている。ペンタガロイルグルコースについては、LPSの活性成分であるlipid Aと結合する作用があり、マウスやラットにLPSを投与した際の血漿中のTNF- α の上昇を抑制する²⁷。没食子酸については、LPSによって誘導されるNF- κ Bの活性化を阻害する²⁸。また、没食子酸メチルについては、マウス腹腔マクロファージをLPS/IFN- γ 刺激した際のTNF- α やIL-6の産生を抑制する²⁹。また、ペオノールについては、LPS刺激したRAW264.7細胞からのTNF- α 、IL-6及びIL-1 β の産生を抑制する³⁰。これらの4成分についてもその含量についてIL-6産生抑制効果との相関関係を検討したが、相関関係は認められなかった。いずれも成分含量がそれほど高くなくことや、シャクヤクエキス自体が多くの成分の混合物であることから、エキス中にIL-6産生を増進させるような物質が存在している可能性や、未だ同定されていない成分が活性に相関している可能性も考えられ、一概にこれらの成分が抗炎症作用と関連がないとは判断はできない。また、ペオノールについては揮発性の高い化合物であり、エキス抽出中若しくはエキス保管中に揮発している可能性も否定はできない。しかし、実際に漢方処方を用いる場合には生薬を煎じた後時間を置かず服用するケースが多いと考えられ、服用時には効果を示している可能性も否定するものではない。また、アルビフロリンや安息香酸の含量についても相関性は認められなかった。

カテキンについては、IL-6産生抑制活性との間に強い相関性は認められなかったが、カテキンの含量が他のシャク

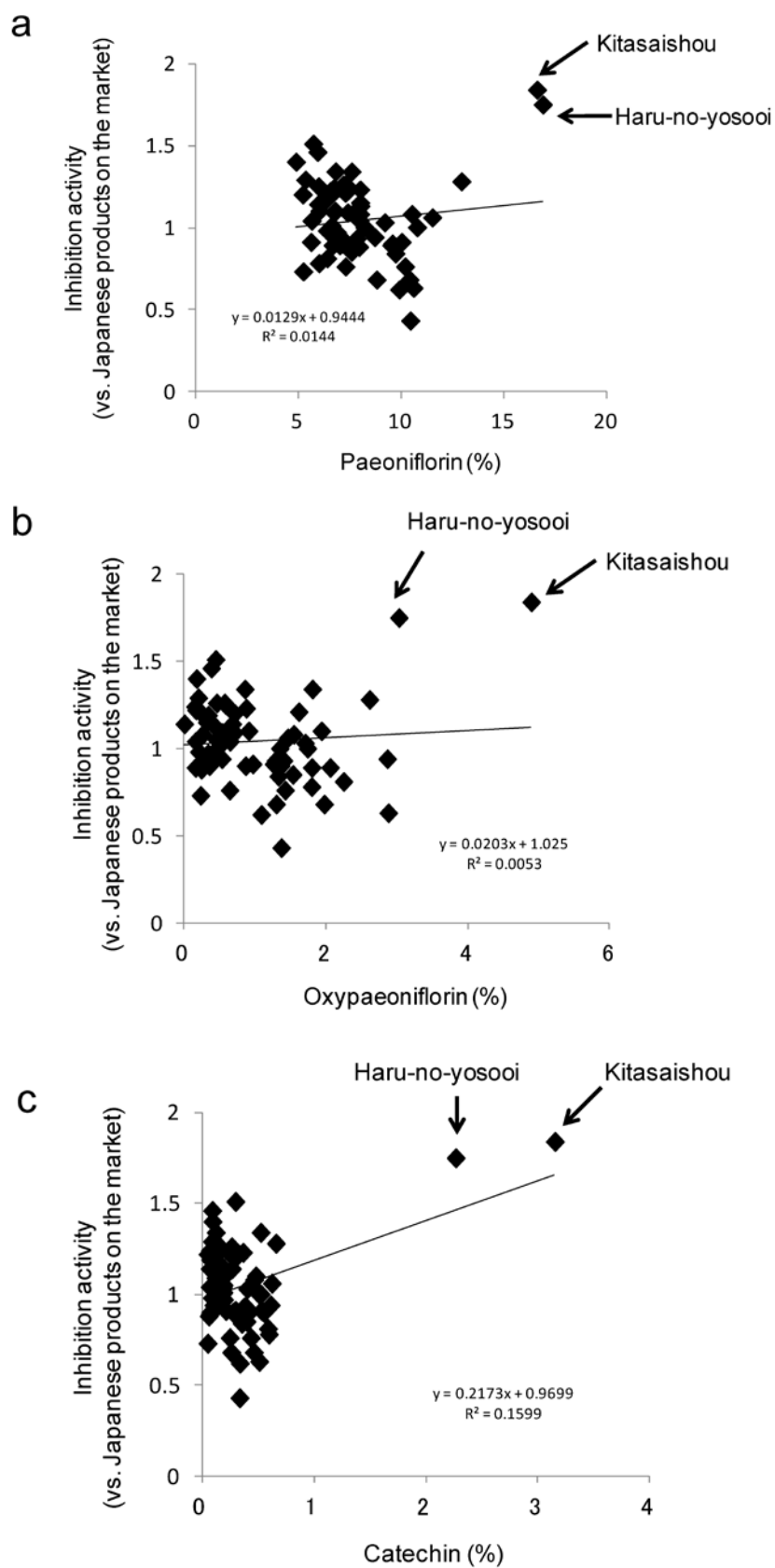


Fig. 2. Correlation between extract contents of each component and inhibition activity of IL-6 production from RAW264.7 cells.

ヤクよりも圧倒的に多い北宰相及び春の粧についてIL-6産生抑制効果が強く認められた (Fig.2c) カテキンは, LPS刺激したRAW264.7細胞からのTNF- α やNOの産生を抑制する³¹⁾. 北宰相及び春の粧についてはカテキンの含量が特に多いため, 他のエキス中の成分の影響が少なく, IL-6産生抑制効果が比較的高く認められた可能性がある.

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⁸⁾. 例えば, パクリタキセルのような化合物や³²⁾, 脂肪酸³³⁾, heat shock proteins (HSPs)³⁴⁾ やヒアルロン酸³⁵⁾ 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. 従ってLPSによるTLR4シグナルを強く抑制してIL-6の産生を抑制するシャクヤクは, 敗血症などの急性感染性炎症のみならず, 肥満や糖尿病等の慢性炎症が原因とされている疾患にも効果を示す可能性も考えられる.

文 献

- 1) 第十五改正日本薬局方解説書, 廣川書店 (2006), D-324
- 2) 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)
- 3) 難波恒雄: 和漢薬百科図鑑 [I], 保育社, p102-104
- 4) 村上守一, 寺西雅弘, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について, 富山県薬事研究所年報, 15, 112-121 (1988)
- 5) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (その3), 富山県薬事研究所年報, 19, 116-122 (1992)
- 6) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (その4), 富山県薬事研究所年報, 21, 90-99 (1994)
- 7) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (その5), 富山県薬事研究所年報, 22, 108-117 (1995)
- 8) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (その6), 富山県薬事研究所年報, 23, 98-103 (1996)
- 9) 村上守一, 吉田幸雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (その7), 富山県薬事研究所年報, 25, 67-72 (1998)
- 10) 村上守一: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (第8報), 富山県薬事研究所年報, 28, 86-89 (2001)
- 11) 村上守一, 田中彰雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (第9報), 富山県薬事研究所年報, 32, 60-63 (2005)
- 12) 村上守一, 田中彰雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (第10報), 富山県薬事研究所年報, 34, 39-42 (2007)
- 13) 村上守一, 田中彰雄: シャクヤクの栽培研究 一切花用品種の品質について (第11報), 富山県薬事研究所年報, 36, 54-58 (2009)
- 14) 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, 57-64 (2010)
- 15) 小松かつ子, 富山県ブランド生薬の開発: 遺伝的多様性の解析, 和漢薬・バイオテクノロジー研究 研究成果報告書 (平成20年度富山県受託研究), p17-21 (2009)
- 16) Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R.: Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216, (2002)
- 17) Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S.: 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 (1999)
- 18) 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.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-8 (1998)
- 19) Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M.: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189, 1777-82 (1999)
- 20) Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., Miyake, K.: Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3, 667-72 (2002)
- 21) Akashi, S., Saitoh, S., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Adachi, Y., Kosugi, A., Miyake, K.: 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 (2003)
- 22) Akira, S., Takeda, K.: Toll-like receptor signalling. *Nat.*

- Rev. Immunol.* 4, 499-511 (2004)
- 23) 横田洋一, 高橋敏, 寺崎さち子, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別成分分析 (I), 富山県薬事研究所年報, **39**, 61-68 (2012)
- 24) 横田洋一, 松永孝之, 高橋敏, 田村隆幸: 富山県薬用植物指導センター産シャクヤクの成分分析について, 家庭薬研究, **32**, 55-61 (2013)
- 25) 長紹元, 高橋誠, 戸井田貞子, 丁宗鉄: 生薬によるアジュバント関節炎の抑制 (第1報), 生薬学雑誌 **36**, 78-81 (1982)
- 26) Jiang WL., Chen XG., Zhu HB., Gao YB., Tian JW., Fu FH.: Paeoniflorin inhibits systemic inflammation and improves survival in experimental sepsis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **105**, 64-71 (2009)
- 27) Genfa L., Jiang Z., Hong Z., Yimin Z., Liangxi W., Guo W., Ming H., Donglen J., Lizhao W. : The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from *Radix Paeoniae Rubra* using affinity biosensor technology. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 1007-1017 (2005)
- 28) Hsiang CY., Hseu YC., Chang YC., Kumar KJ., Ho TY., Yang HL. : Toona sinensis and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor- κ B transgenic mice as evaluated by in vivo bioluminescence imaging. *Food Chem.* **136**, 426-434 (2013)
- 29) Fang SH., Rao YK., Tzeng YM. : Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. *J. Ethnopharmacol.* **116**, 333-340 (2008)
- 30) Himaya SW, Ryu B, Qian ZJ, Kim SK. : Paeonol from *Hippocampus kuda* Bleeler suppressed the neuro-inflammatory responses in vitro via NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Toxicol. In Vitro.* **26**, 878-887 (2012)
- 31) Lyu SY., Park WB. : Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 573-581 (2005)
- 32) Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., Nishijima, M. : Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* **275**, 2251-2254 (2000)
- 33) Suganami, T., Ogawa, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 33-9 (2010)
- 34) Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Hacker, H., Wagner, H. : 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 (2001)
- 35) Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., Simon, J.C. : Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **195**, 99-111 (2002)

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

川筋 透

Effect of Shakuyakukanzoto on the twitch response to electrical stimulation in the isolated mouse vas deferens

Toru KAWASUJI

要 約

芍薬甘草湯はシャクヤクとカンゾウからなる漢方処方で、平滑筋及び骨格筋の攣縮を抑制する作用を有するとされている。今回、芍薬甘草湯及びカンゾウ成分について、マウス摘出精管での電気刺激(1 msec, 0.1 Hz)収縮に対する作用を検討した。シャクヤクの抑制作用については前報で示した。芍薬甘草湯エキス(30-300 μ g/mL)は、マウス精管のtwitch収縮反応を顕著に抑制した。イソクイリチゲニン(1-10 μ g/mL)は、強いtwitch収縮抑制作用を示した。グリチルレチン酸(10-30 μ g/mL)は、顕著なtwitch収縮抑制作用を示した。グリチルリチン酸(100-300 μ g/mL)は、弱いtwitch収縮抑制作用を示した。これらのことから、芍薬甘草湯、イソクイリチゲニン、グリチルレチン酸及びグリチルリチン酸は、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

Shakuyakukanzoto, a traditional Chinese medicine formulation, consists of *Paeoniae Radix* (peony root) and *Glycyrrhizae Radix* (licorice), and is recognized to possess an antispasmodic activity on smooth muscle and skeletal muscle. In the present study, effects of Shakuyakukanzoto and the constituents of licorice were examined on the twitch response to electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) in the isolated mouse vas deferens. The inhibitory effect of peony root was reported previously. Shakuyakukanzoto extract (30-300 μ g/mL) remarkably inhibited the twitch response of mouse vas deferens. Isoliquiritigenin (1-10 μ g/mL) showed a potent twitch-inhibitory effect. Glycyrrhetic acid (10-30 μ g/mL) showed a remarkable twitch-inhibitory effect. Glycyrrhizic acid (100-300 μ g/mL) showed a weak twitch-inhibitory effect. These results suggest that Shakuyakukanzoto, isoliquiritigenin, glycyrrhetic acid and glycyrrhizic acid possess the inhibitory effects on the neurogenic contraction in the mouse vas deferens.

キーワード：芍薬甘草湯、イソクイリチゲニン、グリチルレチン酸、グリチルリチン酸、精管、電気刺激

Keywords：Shakuyakukanzoto, Isoliquiritigenin, Glycyrrhetic acid, Glycyrrhizic acid, Vas deferens, Electrical stimulation

芍薬甘草湯は、シャクヤクとカンゾウの2つからなる漢方処方であり、こむら返りなどの骨格筋の攣縮・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^{1,2)}。

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。芍薬甘草湯、シャクヤク及びカンゾウのエキスは、モルモット回腸の電気刺激収縮に対する抑制作用を示すことが報告されている^{3,4)}。

マウス精管は、電気刺激によってモルモット回腸の場合と類似の収縮反応が生じ、神経終末部に作用する薬物の評価等に用いられる^{5,6)}。

当所では、薬用植物指導センターで栽培しているシャクヤクの品種別エキスを用いて、シャクヤクの薬効評価研究

を行っている。その中でモルモット回腸の代わりにマウス精管を用いて電気刺激収縮反応に対する作用を検討し、シャクヤクエキスにはマウス精管において電気刺激収縮抑制作用がみられている⁷⁾。

カンゾウには、主成分のグリチルリチン酸(甘味成分)などのサポニン・トリテルペン成分やフェノール性成分(主にフラボノイド)など数多くの成分が存在している^{8,9)}。グリチルリチン酸をほとんど含まない画分(FM100)は、鎮痙作用を示すことが報告されている^{10,11)}。また、フェノール性化合物のイソクイリチゲニンは、カンゾウの主要な鎮痙作用成分であると考えられている^{12,13)}。

今回、芍薬甘草湯について、マウス精管での電気刺激収縮抑制作用を検討するとともに、カンゾウ成分の作用を併せて検討したので報告する。

実験材料及び実験方法

1. 使用薬物

芍薬甘草湯エキス（アルプス薬品工業，芍薬甘草湯乾燥エキス-F，水製，エキス：原生薬=1:5），イソクイリチゲニン（AK Scientific Inc.），グリチルレチン酸（東京化成），グリチルリチン酸モノアンモニウム塩（和光純薬）他を使用した。芍薬甘草湯エキスは蒸留水に懸濁して使用した。イソクイリチゲニン，グリチルレチン酸及びグリチルリチン酸モノアンモニウム塩は，ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して使用した。マグナス槽内でのDMSOの終濃度は，0.33%とした。

2. マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対する作用の検討

ICR系雄性マウスを頸椎脱臼で致死し，精管を摘出した。マウスの精管1本では発生張力が小さいので，同じマウスからの2本の精管を並列につないで使用した。すなわち，2本の精管の下端は固定棒と一緒に結びつけ，上端は小さい金属リングに通した糸で2本の精管を連結した。小リングは糸を介してアイソトニ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 CaCl₂，0.9 mM NaH₂PO₄，25.0 mM NaHCO₃，13.1 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⁷⁾。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。

3. 統計処理

測定値は平均値±標準誤差で表した。

実験結果

1. マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対する芍薬甘草湯エキスの作用

芍薬甘草湯エキス（30-300 μg/mL）は，マウス精管の電気刺激によるtwitch収縮反応に対して顕著な抑制作用を示した（Fig.1, Fig.2）。100-300 μg/mLでは適用後すみやかに抑制が出現した後，徐々に進行する収縮抑制がみられた。各濃度において60分間で最も大きな抑制率に基づき算出した50%抑制に要する濃度であるIC₅₀値は82.1 μg/mLであった。

2. イソクイリチゲニンのtwitch収縮反応に対する作用

イソクイリチゲニンは，1-10 μg/mLで，マウス精管のtwitch収縮反応を抑制した（Fig.3）。抑制効力は強く，IC₅₀値は2.5 μg/mLであった。

3. グリチルレチン酸及びグリチルリチン酸のtwitch収縮反応に対する作用

グリチルレチン酸は，10-30 μg/mLでtwitch収縮反応を抑制し，IC₅₀値は13.1 μg/mLであった（Fig.4）。また，グリチルレチン酸にグルクロン酸が2分子結合したグリチ

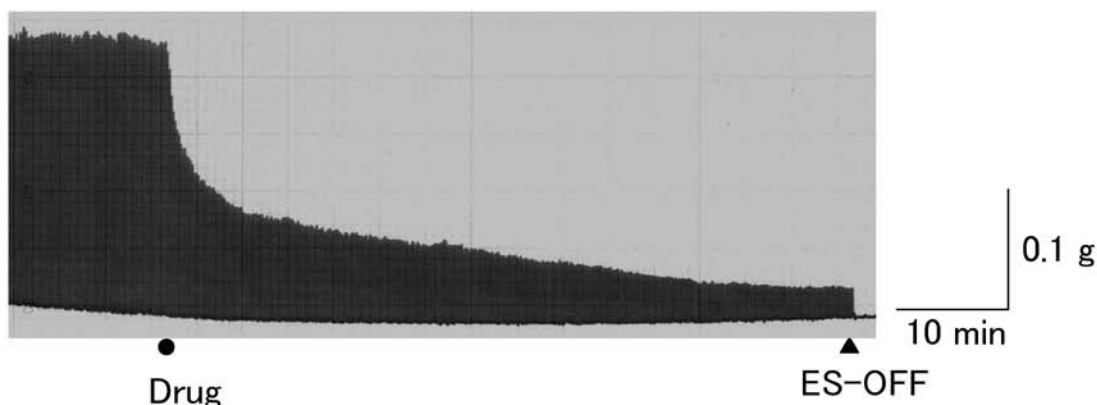


Fig. 1. Typical recording of Shakyakukanzoto-induced twitch-inhibition in the isolated mouse vas deferens

Shakyakukanzoto extract, at 300 μg/mL, was added to the bath at the point indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) was stopped 60 min after drug application.

Shakuyakukanzoto

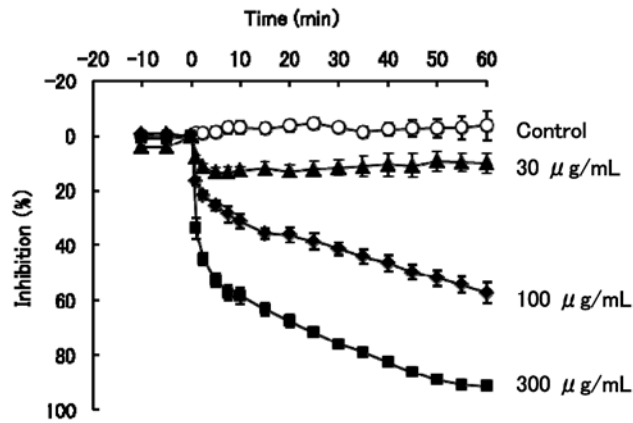


Fig. 2. Effect of Shakuyakukanzoto on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Shakuyakukanzoto extract was suspended in distilled water. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 3-6 experiments.

Isoliquiritigenin

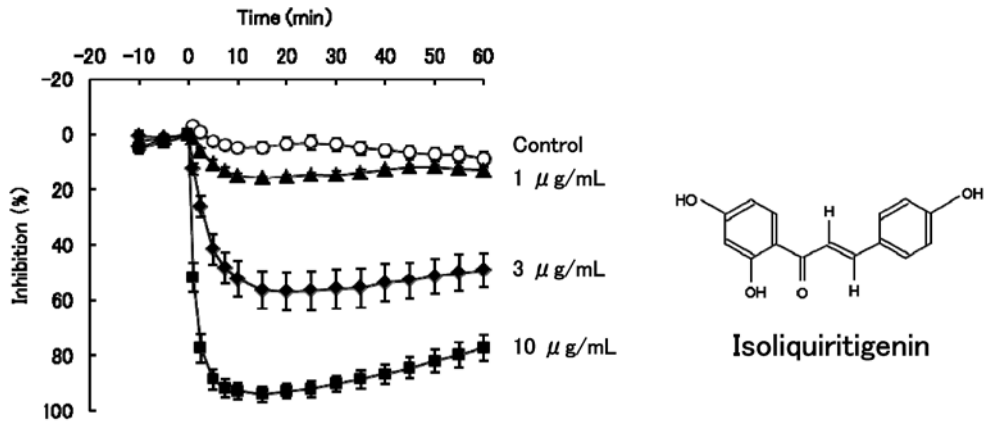


Fig. 3. Effect of isoliquiritigenin on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Isoliquiritigenin was dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4 experiments.

Glycyrrhetic acid

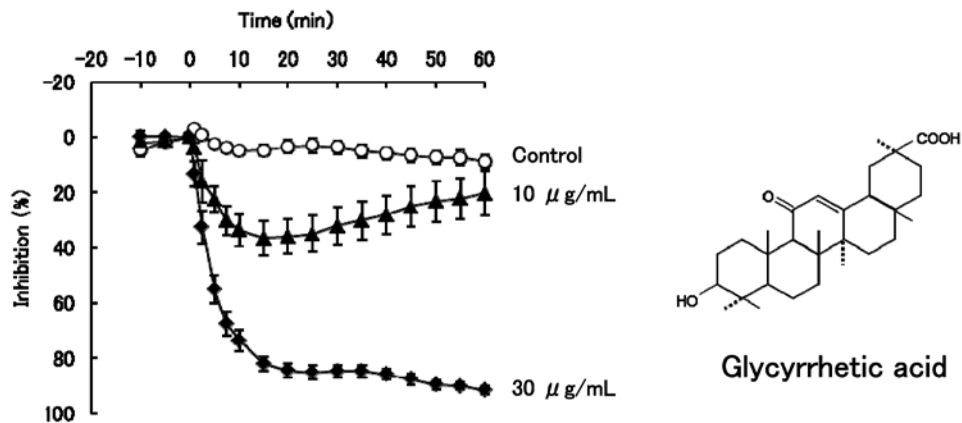


Fig. 4. Effect of glycyrrhetic acid on the twitch response in the isolated mouse vas deferens
Glycyrrhetic acid was dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4-5 experiments.

Glycyrrhizic acid monoammonium salt

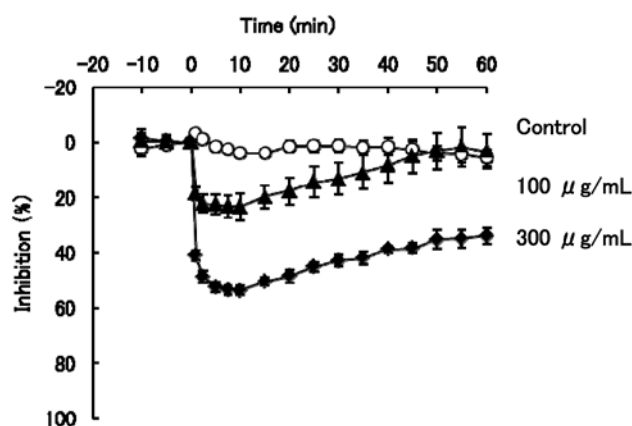


Fig. 5. Effect of glycyrrhizic acid on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Glycyrrhizic acid monoammonium salt was dissolved in DMSO. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 4-5 experiments.

ルリチン酸（モノアンモニウム塩）は、100-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で twitch収縮反応に対する抑制作用を示し、 IC_{50} 値は262 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig.5).

考 察

芍薬甘草湯の構成生薬のひとつであるシャクヤクには、既報でマウス精管での電気刺激収縮抑制作用がみられている⁷⁾。今回、芍薬甘草湯エキスに、顕著な電気刺激収縮抑制作用がみられた。また、カンゾウ成分のイソクイリチゲニンに強い収縮抑制作用がみられ、グリチルレチン酸に顕著な収縮抑制作用、グルチルリチン酸に弱い収縮抑制作用がみられた。

モルモット回腸で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収縮反応が生じるが、マウス精管では電気刺激によって、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⁵⁾。

今回のマウス精管での電気刺激条件では、twitch収縮反応が、低濃度のテトロドトキシンによって完全に抑制されることがわかっており⁷⁾、神経刺激性の収縮反応といえる。芍薬甘草湯エキス、イソクイリチゲニン、グリチルレチン酸及びグリチルリチン酸は、twitch収縮抑制作用を示したことから、神経刺激性収縮に対する抑制作用を有していると考えられる。

カンゾウエキスは、モルモット回腸において神経刺激性収縮と同程度にアセチルコリン収縮を抑制することが報告されている³⁾。非特異的な平滑筋収縮抑制作用成分が、マウス精管での電気刺激性収縮の抑制において関与していることが考えられる。

イソクイリチゲニンは、マウス空腸での種々の収縮反応に対して抑制作用を示し、 IC_{50} 値は低く、代表的な非特異的鎮痙薬であるパパペリンのそれと近く、強い鎮痙作用を有していることが報告されている¹³⁾。また、イソクイリチゲニンは、モルモット気管でも種々の収縮反応に対して弛緩作用を示すことが報告されている¹⁴⁾。

今回、マウス精管での電気刺激収縮に対して、イソクイリチゲニンは、低濃度で顕著な収縮抑制作用を示した。イソクイリチゲニンによる電気刺激収縮抑制は、非特異的な平滑筋収縮抑制作用が大きく関与しているものと思われる。

カンゾウの主成分のグリチルリチン酸類には鎮痙作用はいわれていない。今回、マウス精管での電気刺激収縮に対して、グリチルレチン酸に顕著な抑制作用がみられ、グリチルリチン酸にも弱い抑制作用がみられた。グリチルリチン酸類は、ある程度の鎮痙的な作用特性を有しており、神経終末からの神経伝達物質の遊離抑制作用が一部関与している可能性があると思われる。

使用した市販の芍薬甘草湯エキスは水製の乾燥エキスであり、既報でのシャクヤクエキスは50%メタノールエキスである⁷⁾。原料とエキス調製方法が異なっており、エキス間の効力比較はできないが、カンゾウ成分が収縮抑制作用を示したことから、芍薬甘草湯の電気刺激収縮抑制作用には、シャクヤクとカンゾウの両方が寄与しているものと推察される。

マウス精管でのシャクヤクとカンゾウの効力比較は今後の検討課題である。

文 献

- 1) 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)
- 2) 改訂 一般用漢方処方の手引き (監修：日本公定書協会, 編集：日本漢方生薬製剤協会), じほう (2009), p.112
- 3) 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)
- 4) 林眞知子, 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)
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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)
- 8) 第十六改正日本薬局方解説書, 廣川書店 (2011), D-158
- 9) 北川 勲, 堀 一之: 甘草成分の化学, 現代東洋医学, **14**, 80-89 (1993)
- 10) 高木敬次郎, 原田正敏: 芍薬の薬理学的研究 (第3報) ペオニフロリンの循環呼吸器系および摘出臓器におよぼす作用, 薬学雑誌, **89**, 893-898 (1969)
- 11) 原田正敏: 芍薬の薬理学的研究 (第4報) 漢方における芍薬ならびに甘草を含む繁用方剤の治療効果の解析と実験薬理学的試験結果との対比, 薬学雑誌, **89**, 899-908 (1969)
- 12) Shibata S.: A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of Licorice, *YAKUGAKU ZASSHI*, **120**, 849-862 (2000).
- 13) Sato Y., He J.-X., Nagai H., Tani T., Akao T.: Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza ularensis* roots, acts in the lower part of intestine. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 145-149 (2007).
- 14) Liu B., Yang J., Wen Q., Li Y.: Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro and in vivo: role of cGMP/PKG pathway, *Eur. J. Pharmacol.*, **587**, 257-266 (2008).

育種への活用を目的としたトウキの栄養繁殖法の検討

田村 隆幸, 高田 正明, 大江 勇

Studies on vegetative propagation of *Angelica acutiloba* Kitagawa for breeding

Takayuki TAMURA, Masaaki TAKATA, Isamu OE

要 約

当センターでは、高品質かつ多収量の当帰の安定生産を目指して、優良種の選抜育種を行っている。これまでの育種試験において、地上部の形態を基に選抜した株を播種後3年目の春に栄養繁殖で6個体に増殖、栽培し、根の収量調査及び品質試験を行ったが、この栄養繁殖法では約8割の個体で抽苔（花茎を上げること）が原因で根が収穫できなくなり、効率が悪かった。

そこで、播種後2年目の根の収穫時（12月上旬）に栄養繁殖を試みたところ、母株10株から増殖した50個体のうち47個体から発根が認められ（発根率94%）、37個体がポット苗として活着した（活着率74%）。この苗を圃場に定植した結果、33個体が活着し（活着率66%）、その全てが抽苔しなかった。この結果は、従来の方法の約3倍の効率で根の調査が可能となり、選抜育種への活用が期待できる。

Summary

In our center, we cultivate select top breed of *Angelica acutiloba* Kitagawa for the purpose of producing of Japanese Angelica Root showing high quality and high yield stably. Previously the plants selected based on the form of the above ground part were multiplied to six individuals by vegetative propagation in spring of the third year of seeding, and examined the yield and the quality of the roots. However, this method was inefficient and caused the death in conjunction with bolting in 80% of all individuals.

Therefore, the 50 cuttings obtained from ten plants were planted in harvest season of the second year of seeding. As a result, 47 cuttings rooted (rooting rates: 94%), and 37 cuttings grew up to a seedlings (survival rate: 74%). All of 33 seedlings established in field did not make a flower bloom, these results were efficiency of approximately 3 times of the conventional method.

キーワード：トウキ、選抜、栄養繁殖

Keywords : Japanese Angelica Root, Selection, vegetative propagation

当帰は、第16改正日本薬局方¹⁾において、「トウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa 又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino の根を、通例、湯通ししたものである」と規定され、当帰芍薬散などの漢方処方構成生薬として繁用される。トウキは、奈良県と和歌山県の県境に近い大深、富貴地区を中心に栽培されていることから、その名を冠したオオブカトウキとも呼ばれる。オオブカトウキは、「日本の野生種であるミヤマトウキ *A. acutiloba* var. *iwatensis* Hikino が栽培化されてできた種である」という説²⁾があるが、完全に選抜された種ではないため、採取と栽培を繰り返し、継代を重ねるにつれて、地上部の形態がオオブカトウキの特性とは異なる株が現れ、根の収量や品質にも影響が及ぶ。そのため当センターでは、収量と品質に優れた当帰の安定生産を目指して、古来から伝承されるオオブカトウキの特性を維持しつつ、富山県の気候に適した優良種の選抜を平成13年から行っている。

トウキは多年生草本であるが、抽苔（花茎をあげること）、結実した後、枯死する。花茎を刈り落としても、次々に新たな花茎を上げた結果、根はやせ細り、生薬としての価値はなくなる。一般的な1年生苗の春季移植栽培においては、抽苔は苗の根の太さに関連があり、根頭部が直径5から8mmの苗を定植することで、当年11月下旬の収穫までほとんどの株を抽苔させずに栽培できる。採種する場合は、苗の定植後、根を収穫せず翌年まで栽培すれば確実に抽苔し、種子が得られる。以上のような性質を持つことから、根の収量と品質を基にした選抜においては、採種すると根は収穫できず、根を収穫すると採種できなくなる。

この問題を解決する方法として、根の収穫の前に、栄養繁殖によりその固体の増殖、保存技術の活用が考えられる。既報³⁾では、①播種後2年目の春、収穫用の株からは根生葉だけが萌芽するため（芽が1つしかないため）「挿し芽」ができず、「葉挿し」では発根しても新芽が形成されず枯死する、②播種後3年目の春に種取り用株から「挿し芽」

を行うと、発根及び新芽の形成により新たな固体として生育するが、約8割の株が抽苔し、根の調査（収量及び品質）ができない、という結果であった。トウキの抽苔は、一定の大きさ（固体によって差があるが、目安として根頭部の太さが10 mm 以上）の株が冬季の低温に感応して花芽を形成することによって生じると考えられる。種取り用株の「挿し芽」でほとんど抽苔したのは、根茎部を切り取った時点（播種後3年目の春）、すでに花芽形成に関与する遺伝子が発現していたことが原因と推察された。

そこで本研究では、播種後2年目の秋に根を収穫した株を用いれば、

①翌年の芽が多数形成されているため、「挿し芽」でクローン株の増殖、保存ができる。

②冬季の低温に感応する前であるため、「挿し芽」後に低温にならないよう管理することで、翌年の栽培で抽苔を防ぎ、根の調査ができる。

と考え、この繁殖方法が可能かどうか検討を行った。

実験方法

1. 実験材料植物

当センターで継代栽培し、優良種として選抜途中の株から得た種子を用いた。

2. 栽培場所

薬用植物指導センター圃場
(中新川郡上市町広野2732)

3. 栽培方法

(1)播種用の畦

基肥（10 a あたり）として、過磷酸石灰30 kg、化成肥料（N:P:K=15:15:15）20 kgを施し、耕耘、畦立て（畦幅90 cm、畦高20 cm）をする。

(2)播種・育苗

9月、畦に深さ5 mm 程度の溝を作り、条播きし、軽く覆土する。

発芽後1回除草を行い、地上部の枯れる12月まで育苗し、翌年の春までそのまま越冬させる。

(3)苗の掘り取り

播種の翌春（雪融け後の土壌の乾いたとき）、育苗圃場を掘り起こし、根の太さが約5 mm の固体を選別し、苗として使用する。

(4)栽培圃場への定植・管理

ア 基肥（10 a あたり）

乾燥鶏糞300 kg、苦土石灰100 kg、過磷酸石灰60kg、化成肥料（N:P:K=15:15:15）40 kg

イ 整畦

畦幅90 cm、畦高20 cm

ウ 定植

株間25 cm、2条植え、条間40 cm

エ 追肥（10 a あたり）

6月 油粕50 kg、過磷酸石灰20 kg、

化成肥料（N:P:K=15:15:15）30 kg

8月 化成肥料（N:P:K=15:15:15）20 kg

(5)母株の選抜

オオブカトウキの特性のうち、表1に示す葉の形状の形質を満たす株の中から、生育の良い10株を選ぶ。

表1 オオブカトウキの葉の形状

形 質	内 容
葉の色（葉身上面の色）	濃緑色、葉脈が赤紫色
葉柄の色	赤紫色
葉の形	葉縁の切れ込みが深く、葉身が細い
葉のつや	光沢がある

(6)挿し芽の採取

12月上旬、選抜した株を収穫し、根頭部に形成された新芽を、少量の根茎部とともに鋭利なカッターナイフで採取し、殺菌のためベンレート1000倍液に1時間浸漬して挿し芽とする。

(7)挿し床、挿し芽の培養

挿し木用プラグに用土を充填し、1穴に1つの挿し芽を、根茎部が用土に完全に隠れるように埋め込む。

【挿し木用プラグ】

プラグのサイズ 縦27cm×横53cm

穴の数 縦6穴×横12穴=72穴

穴のサイズ 直径3.5cm、深さ6 cm

【挿し木用土】 Scotts社製、Metro-Mix 360

(8)挿し芽後の管理

育苗ガラスハウス内の電熱線温床で地温25℃とした区画上に、プラグトレーを設置する。育苗ガラスハウス内は、石油式ボイラーの温風により室内が10℃以上に維持される。散水は、毎日8時及び17時に各15分のミスト散水を行う。

プラグ下部の水切り穴から発根が認められたときから、液体肥料（ハイポネックス（N:P:K=5:10:5）の1000倍希釈液）を3日に1回施す。

(9)ポット移植

(8)で発根を確認した約2週間後、ポットに移植する。ポット ポリエチレン製黒丸ポット（直径10.5cm）用土 赤玉中粒：赤玉小粒：腐葉土（1：2：1）

(10)ポット移植後の管理

プラグトレーと同様に、育苗ガラスハウス内の温床に設置する。移植の1週間後から4週間後までは、液体肥料（ハイポネックス（N:P:K=5:10:5）の1000倍希釈液）を5日に1回施す。その後、緩効性化成肥料（IB1号（N:P:K:Mg=10:10:10:1））を1ポットあたり3粒施す。

結果及び考察

1. 試験経過

播種	H23. 9. 1
発芽	H23. 9.25
苗の掘り取り	H24. 4.10
圃場へ定植	H24. 4.13
根の収穫	H24.12.10
挿し芽	H24.12.13
発根確認	H25. 1.25
ポット移植	H25. 2.10
圃場へ定植	H25. 4.15

2. 挿し芽による株の増殖

母株として選抜した10株から、それぞれ5つずつ芽を採取し、挿し芽を実施した。各選抜株について、挿し芽後の発根及び移植後の活着の結果を表2に示す。

(1)発根率

挿し芽を実施した選抜10株のうち8株で、発根率が100%となり、全株の合計でも発根率は94%と高かった。最低値の60%となったNo.5の株では、採取した挿し芽1つあたりの重量が2.4gで、選抜10株の平均

表2 各選抜株の挿し芽による増殖結果（発根及び活着した個体数）

No.	挿し芽			発根		ポット移植		圃場定植	
	挿し芽数	採取した重量 (g)		株数	率 (%)	活着株数	活着率 (%)	活着株数	活着率 (%)
		合計	平均 (合計/挿し芽数)						
1	5	30.4	6.1	5	100	4	80	4	80
2	5	26.5	5.3	5	100	5	100	5	100
3	5	27.3	5.5	5	100	4	80	4	80
4	5	25.3	5.1	5	100	4	80	4	80
5	5	12.1	2.4	3	60	2	40	2	40
6	5	23.2	4.6	5	100	4	80	4	80
7	5	32.0	6.4	5	100	4	80	4	80
8	5	27.5	5.5	4	80	3	60	1	20
9	5	25.7	5.1	5	100	3	60	2	40
10	5	24.9	5.0	5	100	4	80	3	60
合計	50	254.9	51.0	47	94	37	74	33	66

の約半分であったことから、挿し芽に付ける根茎部の重量は5 g以上が望ましいと考えられた。

(2)ポット移植後の活着率

選抜10株の合計では、活着率が74%であった。7株で80%以上の高い活着率を示した。発根率が60%であったNo.5の株では、発根した3株のうち1株が活着せず、40%の活着率となった。No.8及びNo.9については、発根率がそれぞれ80%及び100%であったが、活着しなかった株が発生し、いずれも60%の活着率となった。活着率に影響する要素として、各株の個体差と挿し芽に付ける根茎部の重量が考えられた。

(3)圃場定植後の活着率

選抜10株の合計では、活着率が66%であった。6株で80%以上の高い活着率を示した。どの選抜株でも1個体以上は生存しており、根の収穫時に当該株を保存する方法として活用し得ると考えられた。また、挿し芽の採取時に付ける根茎部の増量により、活着率が上昇すると推測された。

(4)圃場定植後の抽苔

一般的に、4月に定植した苗で抽苔する株は、6月上旬にはその兆候が確認できる。本研究で挿し芽により増殖し、圃場で活着した全33株において、平成25年6月23日現在、抽苔の兆候は見られていない。期待したとおり、冬季に10°C以下にならないよう管理したことが、抽苔を抑制したものと考えられる。

まとめ

トウキの播種後2年目に収穫した根頭部の芽を用いて挿し芽を実施することにより、翌年に抽苔しない個体として増殖できることが明らかとなった。この方法は、選抜株を増殖して翌年に根の調査を実施する場合や、根の調査の直前に当該株を保存する方法として活用が期待できる。

文 献

- 1) 厚生労働省;第16改正日本薬局方, 1554-1555 (2011)
- 2) 第16改正日本薬局方解説書, 廣川書店, D-594-599(2011)
- 3) 村上守一, 田中彰雄;トウキの栽培研究(1)―優良種の選抜と単年栽培,富山県薬事研究所年報, 31, 45-48 (2004)

V 資 料

平成24年度 製剤技術実習報告

－無菌製剤及び半固形製剤，包装技術について－

永井 秀昌，大久保 比呂司¹⁾

¹⁾ 富山県薬業連合会アドバイザー

Training report of sterile preparations, semisolid formulation and pharmaceutical packaging

Hidemasa NAGAI, Hiroshi OHKUBO¹⁾

¹⁾ Toyama pharmaceutical association

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，一昨年度から（社）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してきた。これまで，固形製剤の製造工程に沿ったテーマについて，5回の技術実習を実施してきた(表1)。平成24年度は，無菌製剤，半固形製剤及び包装技術に関する実習が行われたので，それぞれの実習概要について報告する。

テーマ：無菌製剤実習

月 日：平成24年9月13日，14日

場 所：澁谷工業株式会社 RP森本工場

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 17名

テーマ：包装技術実習

月 日：平成24年11月1日，2日

場 所：CKD株式会社

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 17名

テーマ：半固形製剤実習

月 日：平成24年11月29日，30日

場 所：みづほ工業株式会社

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 16名

表1. これまで実施した製剤技術実習

実施年度	内 容	場 所
平成22年	混合技術実習	富山県薬事研究所 (株)徳寿工作所より混合機借用)
平成22年	造粒技術実習	フロイント産業(株) 浜松技術開発研究所
平成23年	打錠技術実習	株式会社菊水製作所，株式会社島津製作所
平成23年	コーティング技術実習	(株)パウレック 本社工場
平成23年	洗浄バリデーション実習	富山県薬事研究所 (株)島津製作所及び(株)T&CテクニカルよりTOC計借用)

平成24年度製剤技術実習内容について

1. 無菌製剤実習

本実習では、「微生物管理と液剤の無菌充填技術」をテーマに、澁谷工業株式会社において、下記の内容で実習を実施した。

①乾燥滅菌テスト装置を用いたバイアル瓶の品温測定実習（乾燥滅菌実習）

洗浄後を想定したバイアル瓶に熱電対を設置し、瓶の設置場所や瓶内部の場所の違いで、品温がどのように変化するかをリアルタイムで確認した。

②アイソレータを用いた実習，無菌試験実習（グローブ操作の体験）

ハーフスーツ型アイソレータを用いて、無菌環境下での滅菌作業を体験した。

③充填テストスタンドを用いたバイアル瓶充填実習（質量流量計充填，重量充填）

質量流量充填法，重量充填法及びオーガ式粉末充填法を用いたバイアル瓶への充填実習を行い，充填量のモニタリングを実施した。

④無菌設備の事例研究（パワーポイントによる紹介）

パワーポイントを用いて，無菌設備の実際の導入事例の説明を受けた。



バイアル瓶の品温測定実習



ハーフスーツ型アイソレータでの滅菌操作

実習後に実施したアンケート調査によれば，自社で活用したいと思う装置・技術として，「アイソレータを用いた無菌試験設備」や「質量流量計充填，重量充填」などが多く，今後，自社での工程管理に活かしたいとの意見が多く出ていた。

2. 包装技術実習

本実習では、「包装技術の基礎とメンテナンス方法」をテーマに，CKD株式会社において，下記の3種類の実習を行った。

①PTP包装機を用いた包装実習 I

高活性封じ込め機能を有するブリスター包装機（FBP-300E，CKD製）を用い，金型交換等の実習を実施した。

②PTP包装機を用いた包装実習 II

ブリスター包装機（FBP-600E，CKD製）を用いて，フィルム交換等の実習を実施した。

③異物検査装置を用いた実習

錠剤包装・異物検査装置 フラッシュパトリ（FP-620，CKD製）の特徴について，実機を用いての説明を受けた。



金型交換の実習



フィルム交換の実習

実習後に実施したアンケート調査によれば、自社で活用したいと思う装置・技術として、「錠剤包装・異物検査装置」や「包装技術の基礎とメンテナンス」、「PTP両面アルミ包装」などが多く記載されており、今後、自社に導入する際の検討に役立ったとの意見が多く記載されていた。

3. 半固形製剤実習

本実習では、「半固形製剤の製造プロセスとスケールアップ」をテーマに下記の2種類の実習を行った。

① 3型真空乳化装置 (PVQ-3UN, みづほ工業製) を使用した実習

o/w保湿クリーム処方について、3Lの試作機を用いた乳化実験を行い、得られたクリームの粘度、粒度分布の測定を行った。

② 25型真空乳化装置 (PVT-1-25, みづほ工業製) を使用した実習

3L試作機での条件を基にスケールアップ式にて算出し、条件を設定後、乳化実験を行った。



3型真空乳化装置での実習



25型真空乳化装置での実習

実習後に実施したアンケート調査によれば、自社で活用したいと思う装置・技術として、「スケールアップのポイント・考え方」が最も多く、次いで「乳化の技術・ポイント」となっており、スケールアップをする際に何を重視したらよいかについて、受講者の理解が深まったように感じた。

まとめ

富山県製剤技術実習は、富山県薬業連合会の主催により、平成22年度より24年度までの3年間に渡り、若手を指導できる中堅の製剤技術者の育成を目的として実施してきた。実習内容として、固形製剤については、混合、造粒、打錠、コーティング、包装、洗浄バリデーションまでを網羅し、各製造工程に沿った高度な技術実習を実施してきた。特に、平成22年度に実施した混合実習及び平成23年度に実施した洗浄バリデーション実習については、当所の製剤・分析設備も活用し、講師を招いての実習を実施した。3年目となる今年度は、医薬品製造の最終工程である包装と無菌製剤及び半固形製剤も加え、製剤全般に渡る実習を実施した。

実習後には、毎回受講生に対し、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」の合計が毎回、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。また、全ての実習は1泊2日の日程で実施し、懇親会も併せて開催したため、他の製薬企業の技術者とのコミュニケーションによる情報交換ができ、有意義であったとの意見が多く寄せられていた。

今後は実習で得られた知識や情報を自社で活用してもらえらるものと期待している。

謝辞

本実習は平成24年度富山県製造管理技術力向上支援事業（事業主体：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研修生を受け入れていただきました澁谷工業株式会社様、CKD株式会社様及びみづほ工業株式会社様に感謝申し上げます。

VI 誌上・学会発表など

1. 原著の抄録

家庭薬研究32, 19-27

HPLC法の分析時間短縮化に関する検討 (第5報) — 生薬成分について —

前田典子, 永井喜美, 堀井周文, 田中啓介, 橋本明佳, 南谷洋平,
野原江里子, 古寺篤子, 福田大輔, 西村真一, 中村直子, 横田洋一

八味地黄丸エキス中のブシモノエステルアルカロイド (ベンゾイルメサコニン, ベンゾイルヒパコニン, 14-アニソイルアコニン) 及び防風通聖散料エキス中のセンノシドAのHPLCによる定量について, ODSカラムを粒径 $5\mu\text{m}$ (内径 4.6mm , 長さ 15cm) から粒径 $3\mu\text{m}$ (内径 4.6mm , 長さ 7.5cm) のカラムに変更することによる分析時間の短縮化を検討した. その結果, 八味地黄丸エキスではYMC-Pack ODS-A, UnisonUK C18, また防風通聖散料エキスでは, YMC Pack Pro C18, CAPCELL PAK C18 SG120, Unison UK C18を使用した場合に良好な結果が得られた.

家庭薬研究32, 28-36

HPLC法の新規充填剤及びアセトニトリル代替溶媒を用いた省力化・ 低コスト化の検討

上野英志, 小山裕樹, 野坂宜宏, 大上成菜, 関友香里
島田佳子, 老松 聡, 飯田貴子, 嶋田宮子, 横田洋一

HPLC分析を用いた品質管理業務等の省力化・低コスト化を図るため, 分析時間の短縮や移動相溶媒の削減が必要である. そこで点鼻薬成分を用いて, 新規分析カラム (コアシェルカラム) やアルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による分析により分析時間の短縮検討を行った. その結果, イオンペア法では市販4種のコアシェルカラムの中でPoroshell C18 ($2.7\mu\text{m}$ $4.6\text{mmID}\times 75\text{mm}$) が高い理論段数を示し, 分析時間の短縮化が得られた. ただし, その性能をより生かすには, システムボリュームの小さな高耐圧LCの必要性が示唆された. また, アルカリ性移動相に耐久性のあるカラムとして, Triart C18 ($3\mu\text{m}$ $4.6\text{mmID}\times 75\text{mm}$) を用いたところ, 従来のイオンペア法に比べ分析時間の短縮化が得られ, かつ精度良く定量することができた. なお, カラム耐久性に若干問題が見られたので, 今後の検討課題である.

富山県薬用植物指導センター産シャクヤクの成分分析について

横田洋一, 松永孝之, 高橋 敏*, 田村 隆幸

(* 現富山県高岡厚生センター)

富山県薬用植物指導センターで栽培されているシャクヤク品種 (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) の同時定量法について、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10成分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 (梵天, 北宰相) 並びに市販品 (日本, 中国) の定量を行ったところ、主成分とされるペオニフロリン含量はすべて2.0%以上であった。60品種中のそれぞれの含量には、ばらつきが見られたが、ペンタガロイルグルコースと没食子酸メチルの含量には強い相関が見られた。10成分総含量では、梵天は比較的低い値を示し、北宰相は高い値を示した。

家庭薬研究32, 37-41 (2013)

刻印錠の不鮮明化を防ぐフィルムコーティング条件の検討

富山県薬事研究会製剤部会

杉窪克哉, 志手真人, 前田将孝, 山森英樹, 無江邦充, 福田大輔, 村上拓磨,
岡本守, 中村敏也, 宅見信哉, 井澤祥, 柏原裕樹, 霜鳥武司, 渡邊大輝,
川上拓郎, 南敬照, 大西高洋, 五十嵐健太, 永井秀昌, 明長良

刻印錠の不鮮明化を防ぐコーティング方法を確立することを目的として、一般的な水系の胃溶性コーティング基剤であるヒプロメロースを使用し、試作用フィルムコーティング装置で実験を行った。錠剤硬度の違いによる比較実験では、いずれも硬度の高い錠剤が、コーティング時の刻印の削れが少なく、鮮明な刻印のまま、フィルムコーティングが可能であった。

また、スプレー速度の違いによる比較では、スプレー速度5 g/minと比較して、8 g/minの方がコーティング効率は高く、刻印の埋まりや錠剤表面の肌荒れが少ない鮮明な刻印が確認できた。

今回の実験により、ヒプロメロースを用いたフィルムコーティングでは、頑強な錠剤を用い、溶液濃度7%、スプレー速度8 g/minで噴霧する条件が鮮明な刻印を保ったままコーティングできることが確認された。特に、フィルムコーティングにおいては、錠剤の摩損性に影響する錠剤硬度と排気温度に影響するスプレー速度が重要な因子になると考えられる。

2. 講演・学会発表

「Potential roles for soluble MD-1 in disease progression of autoimmune prone MRLlpr/lpr mice」Nagai Y, Yanagibashi T, Watanabe Y, Ikutani M, Kariyone A, Tsuneyama K, Hirai Y, and Takatsu K.24.5.7 The 99th Annual Meeting of The American Association of Immunologists (Boston, MA, USA)

「The radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation」
Watanabe Y, Nagai Y, Nakamura T, Akira S, Miyake K, and Takatsu K.
24.5.7 The 99th Annual Meeting of The American Association of Immunologists (Boston, MA, USA)

「Regulatory roles of innate IL-5-producing non-T cells in the immune surveillance in the lung and IgA production in the intestine」
24.6.15 高津聖志

“Macrophage 2012” , 20th International Symposium on Molecular Cell Biology (東京都)

「TLRファミリー分子RP105/MD-1は高脂肪食誘発性の肥満、脂肪組織炎症、インスリン抵抗性を制御する」
長井良憲, 渡邊康春, 菅波考祥, 井崎博文, 審良静男, 三宅健介, 金山博臣, 島袋充生, 佐田政隆, 笹岡利安,
小川佳宏, 戸邊一之, 高津聖志
24.7.5-6 第33回日本炎症・再生医学会 (福岡市)

「自然免疫を制御する天然物の探索」
本田裕恵

24.8.1 ほくりく健康創造クラスター「若手研究者交流会」(金沢市)

「流動層造粒と攪拌造粒による精密な造粒方法の検討」
永井秀昌, 明長良 他

24.9.21 第14回富山県薬学会年会 (富山市)

「Molecular basis of regulatory effect of natural products on innate immunity」
本田裕恵, 高津聖志 他

24.9.25 「ジョイントシンポジウム富山・バーゼル2012」(スイス・バーゼル)
(BioValley Science Day / Basel Toyama Symposium)

「Regulation of adipose tissue inflammation by TLR family protein RP105/MD-1」
Nagai Y, Watanabe Y, and Takatsu K.

24.10.24 EHS2012 Homeostatic Inflammation Symposium (東京都)

「Roles of lung innate IL-5-producing cells in anti-metastatic activity through eosinophils」
Ikutani M, Yanagibashi T, Nagai Y, Takaki S, and Takatsu K.

24.10.24 EHS2012 Homeostatic Inflammation Symposium (東京都)

「富山シャクヤクブランド化事業について」
横田洋一 他

24.10.25 第49回全国薬事指導協議会総会 (広島市)

「Isoliquiritigenin and glycyrrhizin, representative components of *Glycyrrhiza uralensis*, inhibit activation of NALP3 inflammasome」

Honda H, Nagai Y, and Takatsu K.

24.12.6-7 第41回日本免疫学会学術集会（神戸）

「Characterization of innate IL-5-producing non-T cells in the large intestine regarding responsiveness to IL-33 and IgA production」

Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takaki S, and Takatsu K.

24.12.6-7 第41回日本免疫学会学術集会（神戸）

「HPLC法の分析時間短縮化に関する検討（第5報）－生薬成分について－」

前田典子, 永井喜美, 堀井周文, 田中啓介, 橋本明佳, 南谷洋平, 野原江里子, 古寺篤子, 福田大輔, 西村真一, 中村直子, 横田洋一

「HPLC法の新規充填及びアセトニトリル代替溶媒を用いた省力化・低コスト化の検討」

上野英志, 小山裕樹, 野坂宜宏, 大上成菜, 関友香里, 島田佳子, 老松 聡, 飯田貴子, 嶋田宮子, 横田洋一

「刻印錠の不鮮明化を防ぐフィルムコーティング条件の検討」

永井秀昌, 明長良 他

「富山県薬用植物指導センター産シャクヤクの成分分析について」

横田洋一, 松永孝之, 高橋敏, 田村隆幸

25.2.18 第32回家庭薬開発研究シンポジウム（富山市）

液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動及び質量分析を用いた抗体医薬品糖鎖プロファイリング法の比較
原園 景, 橋井 則貴, 寺崎さち子, 栗林亮佑, 川崎ナナ

25.3.27-30 日本薬学会第133年会（横浜）

3. 共同研究論文リスト

- Kusano S, Kukimoto-Niino M, Hino N, Ohsawa N, Ikutani M, Takaki S, Sakamoto K, Hara-Yokoyama M, Shirouzu M, **Takatsu K**, and Yokoyama S. : Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its α receptor. *Protein Sci.*, 21(6):850-864.
- Hara-Yokoyama M, Kukimoto-Niino M, Terasawa K, Podyma-Inoue KA, Harumiya S, Kawasaki N, Mishima-Tsumagari C, Kaitsu Y, Matsumoto T, Wakiyama M, Shirouzu M, Takayanagi H, Utsunomiya-Tate N, **Takatsu K**, Katada T, Hirabayashi Y, Yokoyama S, and Yanagishita M. : Tetrameric interaction of the ectoenzyme CD38 on the cell surface enables its catalytic and raft-association activities. *Structure*, 20(9):1585-1595.
- Rachmawati NM, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Bahrin U, Tsukamoto H, Yanagibashi T, Nagai Y, **Takatsu K**, Ohta S, and Kimoto M. : Inhibition of antibody production in vivo by pre-stimulation of Toll-like receptor 4 before antigen priming is caused by defective B cell priming and not impairment in antigen presentation. *Int. Immunol.*, 25:117-128,2013.
- Howard M., Farrar J., Hilfiker M., Johnson B., **Takatsu K.**, Hamaoka T., and Paul W.E. : Pillars article: identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 155:914-923, 1982. *J Immunol.*, 190(3):864-73, 2013.
- Fujisaka S., Usui I., Ikutani M., Aminuddin, Takikawa A., Tsuneyama K., Mahmood A., Goda N., Nagai Y., **Takatsu K.**, and Tobe K. : Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in HIF-1 α -dependent and independent manners in obese mice. *Diabetologia*. 56(6):1403-1412, 2013.
- Itakura A., Ikutani M., **Takatsu K.**, and Kikuchi Y. : Interleukin 5 plays a key Role in mouse strain-dependent susceptibility to contact hypersensitivity through its effects on initiator B cells. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, ;161 Suppl 2:98-106, 2013.