

研 究 業 績

IV 研究報告

がん移植マウスモデルにおけるベツリンの 抗腫瘍効果に関する検討

小笠原 勝, 宮本 (山口) 朋美, 松永 孝之, 長井 良憲¹, 高津 聖志

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

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

Masaru OGASAWARA, Momomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO, Takayuki MATSUNAGA,
Yoshinori NAGAI¹, Kiyoshi TAKATSU

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

要 約

我々はこれまでに、ポリ (I:C) により亢進した脾臓細胞の細胞傷害活性を指標に TGF- β あるいはPGE₂の抑制作用をいずれも解除できる化合物を探索し、植物成分ベツリンにその作用を見出した。本研究では、免疫抑制を伴うことが報告されている数種のがん移植マウスモデルを用いて、ベツリンの抗腫瘍効果について検討した。その結果、マウス大腸がん CT26細胞、悪性黒色腫 B16F10細胞、あるいはTリンパ腫 EL4 細胞の移植モデルにおいて、ポリ (I:C) と抗がん剤の2者併用による抗腫瘍効果に比較して、ベツリンを加えた3者併用ではより強い抑制効果が認められた。一方、いずれのモデルにおいても、ベツリン単独ではほとんど抑制効果は認められなかった。これらのことから、ベツリンは、がん細胞に対する直接的な細胞毒性とは異なる作用機序を介して、ポリ (I:C) 及び抗がん剤の抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

Summary

We previously screened of natural compounds for the restorative activity on the cytotoxicity of splenocytes inhibited by TGF- β or PGE₂. And we found betulin, a plant constituent, possessing the activity. In this study, using several kinds of *in vivo* tumor-burden models of mice, anti-tumor effects of betulin were examined. As a result, more potent anti-tumor effect was observed in combination of the three compounds of poly (I:C), an anti-cancer agent and betulin, compared to the combined effects of poly (I:C) and an anti-cancer agent in a mouse model of murine CT26 colon cancer, B16F10 melanoma, or EL4 T lymphoma. In any of tumor-burden mouse models used, administration of betulin alone did not exhibit anti-tumor effect. These results suggest that betulin increased the combined effect of anti-tumor activities of poly(I:C) and an anti-cancer agent via a mechanism different from direct cytotoxicity.

キーワード：ベツリン；抗腫瘍効果；担癌マウスモデル

Key words：Betulin；Anti-tumor effect；Tumor burden mouse model

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、その主な原因の一つは、がん細胞由来の免疫抑制因子 (TGF- β , PGE₂ 等) による免疫機能の低下であることがわかってきた。そのため、がん免疫療法の効果を増強するには、免疫抑制因子の作用を阻止する薬剤が必要と考えられている²⁾。本研究ではこれまで、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⁾。

ベツリンは主に白樺の樹皮に含まれる成分であり、これまで抗ウイルス活性や抗炎症作用、最近では生活習慣病に対する有効性など様々な生物活性について報告がなされている⁴⁾。とりわけ、がん細胞の増殖能に対する阻害作用について多数の報告がなされており、増殖阻害活性に基づく抗がん剤としての開発が期待されている⁵⁻⁹⁾。一方、本研究のようにベツリンの免疫抑制解除作用をがん治療に応用しようとする試みについては報告がない。

本研究では、免疫抑制を伴うことが報告されている数種のがん移植マウスモデルを用いて¹⁰⁻¹⁴⁾、免疫賦活剤及び

抗がん剤と併用した際のベツリンのがん抑制増強効果について検討した。

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, Invivo Gen より購入した。ベツリン, オキサリプラチン, ドキソルビシンは, それぞれ Extrasynthese, Wako, より購入し, いずれも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

マウス CT26 大腸がん細胞, マウス EL4 T リンパ腫細胞, マウス 4T1 乳がん細胞は, ATCC より入手した。マウス LLC 肺がん細胞は, 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。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。これら細胞は, 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 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. がん皮下移植マウスモデルでの評価

がん細胞を 2×10^5 個/0.05ml PBS に調製し, BALB/c または C57BL/6 マウス (7 週令, 雌, 10 匹/群) にマウス当たり 0.05ml ずつ下腹部皮下に接種した。ベツリンはマウス当たり 45nmol の用量でがん接種 7 日目から解剖日前

日まで 1 日 1 回, 腹腔内に投与した。対照群には溶媒 (DMSO) を同様に投与した (20 μ /マウス)。ポリ (I:C) は腫瘍内に 20 μ g/0.05ml の用量で, がん接種後, 2, 5, 8, 11 日目に投与した。オキサリプラチンは, 1.5 または 5 mg/kg の用量でがん接種 7 日目にマウスの腹腔内に投与した。ドキソルビシンは, PBS で 2 μ M となるように調製しがん接種 7 日目に腫瘍内に投与した (50 μ /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 により算出した。

結果及び考察

昨年度までに, 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見出し, その作用機序の一端を明らかにした³⁾。本研究では, インビボでのベツリンの有効性を検証するため, TGF- β あるいは PGE₂ による免疫抑制を誘導することが報告されている 4 種のがん細胞 (CT26 大腸がん細胞, EL4 T リンパ腫細胞, B16F10 悪性黒色腫細胞, LLC 肺がん細胞, あるいは 4T1 乳がん細胞) の皮下移植マウスモデルを用いて, ポリ (I:C) と抗がん剤の 2 者併用による抑制効果とベツリンを加えた 3 者併用による抑制効果を比較検討した。その結果, CT26 細胞, EL4 細胞, あるいは B16F10 細胞の移植モデルでは, ポリ (I:C) と抗がん剤の 2 者併用による抑制効果に比べて, ベツリンを加えた 3 者併用ではより強い抑制効果が認められた (Fig. 1)。ベツリンについてはこれまでに, インビトロでのがん細胞増殖に対して直接的な阻害作用を

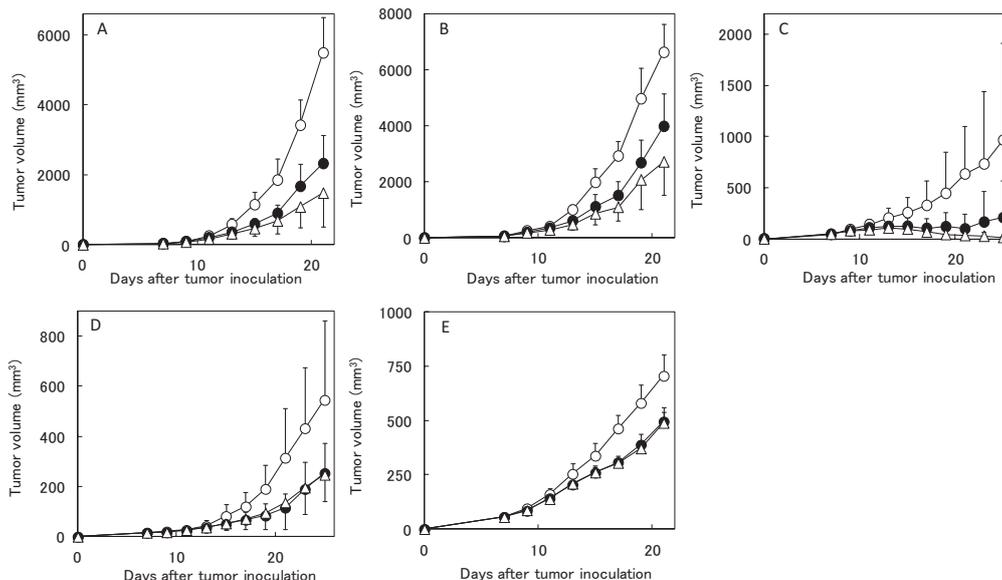


Fig. 1 Differential effects of betulin on tumor growth in mice.

B16F10 (A), EL4 (B), CT26 (C), LLC (D), or 4T1 (E) cells were subcutaneously inoculated into mice. An anti-cancer agent (doxorubicin or oxaliplatin) was administered 7 days after tumor inoculation. Poly (I:C) was administered on day 8, 11, and 14. Betulin was intraperitoneally administered once daily starting 8 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week.

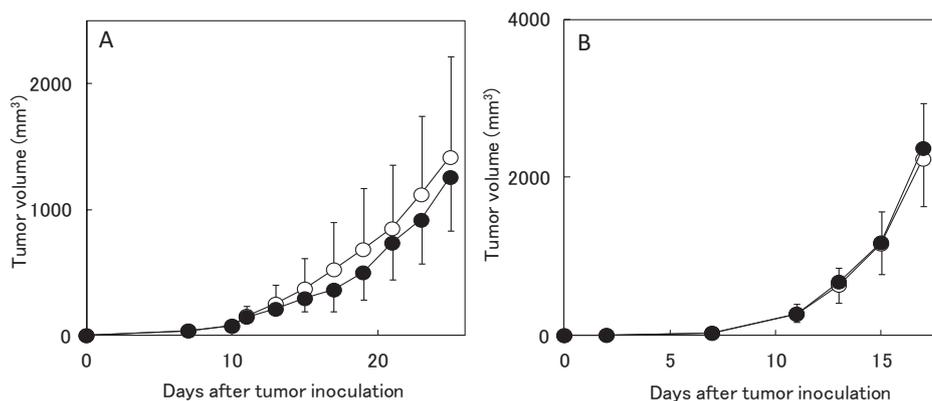


Fig. 2 Betulin had marginal effects on the growth of tumor cells in mice.

CT26 (A) or B16F10 (B) cells were subcutaneously inoculated into mice. Betulin was intraperitoneally administered once daily starting 8 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated two or three times a week.

示すことが多数報告されている⁵⁻⁹⁾。また、がん皮下移植マウスモデルにおいても、ベツリン単独で抗腫瘍効果を示すことが少数ではあるが報告されている^{8,15)}。そこで、本研究で認められたベツリンの増強効果にがん細胞に対する直接的な細胞毒性作用が関与しているかを明らかにするため、ベツリン単独投与による抗腫瘍効果について検討した (Fig. 2)。その結果、本研究の投与条件ではベツリン単独では明らかな抑制効果は認められなかった。これらのことから、ベツリンは、がん細胞に対する直接的な細胞毒性とは異なる作用機序を介して、ポリ (I:C) 及び抗がん剤の抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

細胞毒性とは異なる作用機序としては、これまでの検討結果から免疫抑制の解除作用が考えられるが、今のところインビボで認められたベツリンの増強効果に免疫系が関与しているかは不明である。ただし、これまでの脾臓細胞を用いたインビトロでの検討では、ベツリンは TGF- β あるいは PGE₂ による NK 活性抑制を 5 μ M においてほぼ完全に解除したのに対して、B16F10 細胞の増殖を 50% 阻害するのに 13 μ M のベツリンを必要とした。これらのことから考えると、ベツリンの免疫抑制解除効果の方がインビボにおいてより発現しやすいことが予想され、ベツリンの増強効果への免疫系の関与が推察される。この点については、今後、免疫不全マウス等を用いて検討を進める必要がある。

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) Tang J.J., Li J.G., Qi W., Qiu W.W., Li P.S., Li B.L., Song B.L.: Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.*, **13**(1), 44-56 (2011)
- 5) Jonnalagadda S.C., Corsello M.A., Sleet C.E.: Betulin-betulinic acid natural product based analogs as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **13**(10), 1477-1499 (2013)
- 6) 国際公開第02-009719号
- 7) 特開2005-330261号公報
- 8) 特開平 1-14832号公報
- 9) Xu W., Zhu C., Cheng W., Fan X., Chen X., Yang S., Guo Y., Ye F., Shi J.: Chemical Constituents of the Roots of *Euphorbia micractina*. *J. Nat. Prod.*, **72**(9), 1620-1626 (2009)
- 10) Maeda H., Tsuru S., Shiraishi A.: Improvement of macrophage dysfunction by administration of anti-transforming growth factor-beta antibody in EL4-bearing hosts. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**(11), 1137-1143 (1994)
- 11) Bixiang Z., Sunil K. H., Sanguo Z., Pran K. D.: Targeting Transforming Growth Factor- β signaling in liver metastasis of colon cancer. *Cancer Lett.*, **277**(1), 114-120 (2009)
- 12) Liu J., Liao S, Diop-Frimpong B., Chen W., Goel S., Naxerova K., Ancukiewicz M., Boucher Y., Jain R.K., Xu L.: TGF- β blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma.

- noma by normalizing the tumor stroma. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **109(41)**, 16618-16623 (2012)
- 13) Hasmim M., Noman M.Z., Messai Y., Bordereaux D., Gros G., Baud V., Chouaib S.: Cutting edge: Hypoxia-induced Nanog favors the intratumoral infiltration of regulatory T cells and macrophages via direct regulation of TGF- β 1. J. Immunol., **191(12)**, 5802–5806 (2013)
- 14) Morecki S., Yacovlev E., Gelfand Y., Trembovler V., Shohami E., Slavin S.: Induction of antitumor immunity by indomethacin. Cancer Immunol. Immunother., **48(11)**, 613–620 (2000)
- 15) Soica C., Dehelean C., Danciu C., Wang H.M., Wenz G., Ambrus R., Bojin F., Anghel M.: Betulin complex in γ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in in vitro and in vivo tumor models. Int. J. Mol. Sci., **13(11)**, 14992–15011 (2012)

マウス脾臓 B 細胞の IgA 産生を指標とした 粘膜アジュバントとしての天然化合物の探索

山崎 (屋敷) 思乃, 宮本 (山口) 朋美, 柳橋 努,
田部井 美樹, 松永 孝之, 高津 聖志

Screening of natural compounds for mucosal adjuvant as indicator of IgA production from murine B lymphocytes

Shino YAMASAKI-YASHIKI, Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO,
Tsutomu YANAGIBASHI, Miki TABELI, Takayuki MATSUNAGA,
Kiyoshi TAKATSU

要 約

経鼻投与型インフルエンザワクチンは、粘膜上に分泌型の免疫グロブリン (Immunoglobulin; Ig) A 抗体 (以下, IgA と表記) を誘導するため, ウイルスの感染予防に有効である。しかし, 効率よく IgA を誘導するには粘膜免疫を活性化するアジュバント (免疫増強剤) が必要である。本研究では, B 細胞の *in vitro* での IgA 産生誘導機構を利用して, IgA 産生を増強するアジュバント活性を有する天然化合物をスクリーニングにより見出すことを目的とした。マウス脾臓 B 細胞を用いて, 粘膜アジュバントとして有効性が確認されている二本鎖 RNA である poly (I:C) による IgA 産生誘導系を見出し, これをもとに IgA 産生を指標としたスクリーニング系を構築した。新たに構築したこの評価系は, アジュバント候補化合物の探索に有用であると考えられる。

Summary

Nasal spray vaccine against influenza virus is effective for protection against infection with the virus by immunoglobulin (Ig) A secreted on the mucosal surface. To improve the efficiency of the vaccine, adjuvant is necessary for induction of appropriate mucosal immune response such as IgA secretion. In this study, we aimed to screen safe and efficient mucosal adjuvant candidates, which have ability to induce IgA secretion, among natural compounds. We found that poly (I:C) known as strong mucosal adjuvant induced IgA from murine splenic B lymphocytes by co-stimulated with retinoic acid (RA) and interleukin (IL)-5 *in vitro*. We developed screening culture system based on the IgA production mechanism by poly (I:C), RA and IL-5 using B lymphocytes. This screening culture system can be useful to search for an adjuvant candidate compound.

キーワード: 粘膜ワクチン, インフルエンザ, アジュバント, B 細胞, 抗体産生, IgA

Key words: Mucosal vaccine, Influenza, Adjuvant, B lymphocyte, Immunoglobulin production, IgA

インフルエンザ感染症の予防にはワクチンが最も有効な手段である。しかし, 現行の皮下注射型のワクチンでは全身系免疫に関わる IgG を血液中に誘導するが, ウイルスの感染防御に重要な IgA を粘膜上に誘導することができないため, 期待できる効果は感染の予防ではなく, 重症化の予防でしかない¹⁾。しかも, ワクチン株と流行株が異なる場合, その効果は極めて低くなる。一方, 粘膜上に分泌される IgA は異なる亜型のウイルスに対しても感染を防御することができることから, 粘膜免疫の活性化により IgA 産生を効率よく誘導する経鼻粘膜ワクチン接種が注目され

ている。しかし, 皮下注射型ワクチンと同じ成分を経鼻粘膜投与しても粘膜免疫は十分に活性化されず, ワクチン成分以外に粘膜免疫を増強する物質である「アジュバント (免疫増強剤)」が必要となる。

これまでに, 粘膜アジュバントとしてコレラ毒素などの細菌毒素に有効性が認められてきたが²⁾, 臨床試験において顔面神経麻痺が見られたことから使用は認められていない。また, 自然免疫に関わる Toll 様受容体 (Toll like receptor; TLR) 3 のリガンドで二本鎖 RNA の poly (I:C) に粘膜アジュバントとしての有効性が認められているが³⁾,

毒性などの問題からヒトでの応用には至っておらず、安全かつ効果的な粘膜アジュバントの開発が急務となっている。

そこで、本研究では、安全かつ効果的なアジュバントの開発を目指し、主に植物などに含まれ、極微量で生理活性をもたらす天然化合物に着目し、天然化合物に新たに粘膜アジュバントとしての活性を見出すこととした。特に、粘膜ワクチンではいかに粘膜上に IgA 産生を誘導するかが重要であることから、アジュバント活性として IgA 産生増強作用に着目し、B 細胞の IgA 産生を指標とした *in vitro* スクリーニング系を構築し、IgA 産生を増強する天然化合物のスクリーニングを実施することで、新規粘膜アジュバントを得ることを目的とした。

In vitro における B 細胞からの IgA 産生誘導には、① 数回の細胞分裂、② TGF- β (transforming growth factor- β) やレチノイン酸 (retinoic acid; RA), TNF (Tumor necrosis factor) ファミリーの BAFF (B cell activating factor) や APRIL (a proliferation-inducing ligand) などによる IgA クラススイッチ組換え、③ インターロイキン (interleukin; IL)-2 や IL-5 などのサイトカインによる IgA 産生細胞への分化の過程が必要である⁴⁻⁶⁾。これまでに、TLR4 リガンドであるリポ多糖 LPS と IL-5 の存在下、TGF- β あるいは RA により IgA 産生が誘導される培養系を中心に研究が進められてきた^{7,8)}。生体内では TLR3 リガンドである poly (I:C) をアジュバントとしてインフルエンザワクチンを経鼻的に接種すると IgA 産生を誘導するが、*in vitro* での poly (I:C) による IgA 産生誘導機構について検討した報告は調べた限りにおいてない。

このような背景から、効果的に IgA 産生を誘導するアジュバント化合物の探索には、細胞レベルで poly (I:C) 刺激により IgA が産生される条件を見出し、その機構を理解する必要がある。今回、我々はマウス脾臓 B 細胞を用いた poly (I:C) 刺激による IgA 産生誘導系を確立したので報告する。

実験方法

1. 実験試薬

LPS 及び RA は Sigma 社より、poly (I:C), loxoribine 及び CpG B は InvivoGen 社から購入した。組換えマウス IL-5 は R&D systems 社から、IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 及び TGF- β は Peprotech 社から購入した。ビオチン化抗マウス CD43 抗体 (clone: S7), 抗マウス Fc γ 受容体抗体 (clone: 2.4G2) 及びストレプトアビジン結合磁気ビーズは BD Biosciences 社から購入した。

2. 細胞及び細胞培養

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。マウスをイソフルラン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。2% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて 1.0×10^8 cells/ml に懸濁し、抗マウス Fc γ 受容体抗体を添加して氷上で 15 分間置いた後、抗マウス CD43-ビオチン抗体を 50 倍希釈で添加して氷上で 30 分間静置した。2% FBS を含む 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。磁気細胞分離装置 IMag (BD Biosciences 社) により CD43 陰性細胞を精製し、これを脾臓 B 細胞とした。フローサイトメトリー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。培地として 10% FBS, 100 U/ml のペニシリン, 100 μ g/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 RPMI1640 培地 (GIBCO[®]) を使用し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

3. TLR リガンドやサイトカイン刺激による抗体産生の評価

TLR リガンドが抗体産生に及ぼす影響を調べるために、B 細胞を所定濃度の各種 TLR リガンドで刺激した後、96 ウェル平底培養プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように細胞を播種し、7 日間培養した。また、poly (I:C) による IgA 産生の誘導条件を調べるために、B 細胞を poly (I:C), TGF- β , RA 及び IL-5 を単独で、あるいは複数の組み合わせで刺激し、96 ウェル平底培養プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように細胞を播種し、7 日間培養した。このとき、各因子の濃度は、poly (I:C) 10 μ g/ml, TGF- β 0.5 ng/ml, RA 10 nM 及び IL-5 5 ng/ml に設定した。培養後、培養プレートを 200 \times g で 10 分間遠心分離することで培養上清を採取し、抗体濃度を測定した。

4. 抗体産生量の測定

培養上清中の IgM 及び IgA 濃度は、それぞれ Mouse IgM ELISA Quantitation Set 及び Mouse IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl 社) を用い、添付のプロトコルに従って定量した。

5. スクリーニング系の構築

スクリーニング系の構築は、IgA 産生がある程度誘導され、かつ化合物の添加により IgA 産生の増加が確認で

きるように, poly (I:C), RA 及び IL-5 の添加濃度を検討することで行った.

結 果

1. TLR リガンドが抗体産生に及ぼす影響

TLR 3, 4, 7 及び 9 のリガンドである poly (I:C), LPS, loxoribine 及び CpG B による刺激が B 細胞の抗体産生に及ぼす影響を調べた. IgM 産生において, 大腸菌由来の LPS により IgM 産生を顕著に増大することがわかった (Fig. 1). また, IgA 産生においても, 同様に LPS 刺激により IgA 産生が増大した. 粘膜アジュバントとして有効性が確認されている poly (I:C) 単独での刺激下では, IgM 及び IgA 産生のいずれもコントロール群と比較して変化がなかった.

2. IgA クラススイッチ組換え誘導因子が抗体産生に及ぼす影響

B 細胞を用いた *in vitro* 培養系では, LPS と TGF- β あるいは RA との共刺激により B 細胞に IgA クラススイッチ組換えが誘導され, さらに IL-5 刺激が抗体産生量を増大することが知られている. そこで, poly (I:C) と IgA クラススイッチ誘導因子である TGF- β あるいは RA, IL-5 による共刺激が抗体産生に及ぼす影響を検討した. Poly (I:C) 刺激下において, IL-5 の有無にかかわらず, TGF- β 刺激により IgA 産生は抑制された (Fig. 2a). また, IL-5 は単独で IgA 産生を増大させるが, poly (I:C) と IL-5 あるいは RA と IL-5 の共刺激を加えても, IgA 産生のさらなる増大は認められなかった. 一方で, poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激下において, IgA 産生量が有意に増大し (Fig. 2b), これらの共刺激が顕著な IgA 産生を誘導することが分かった.

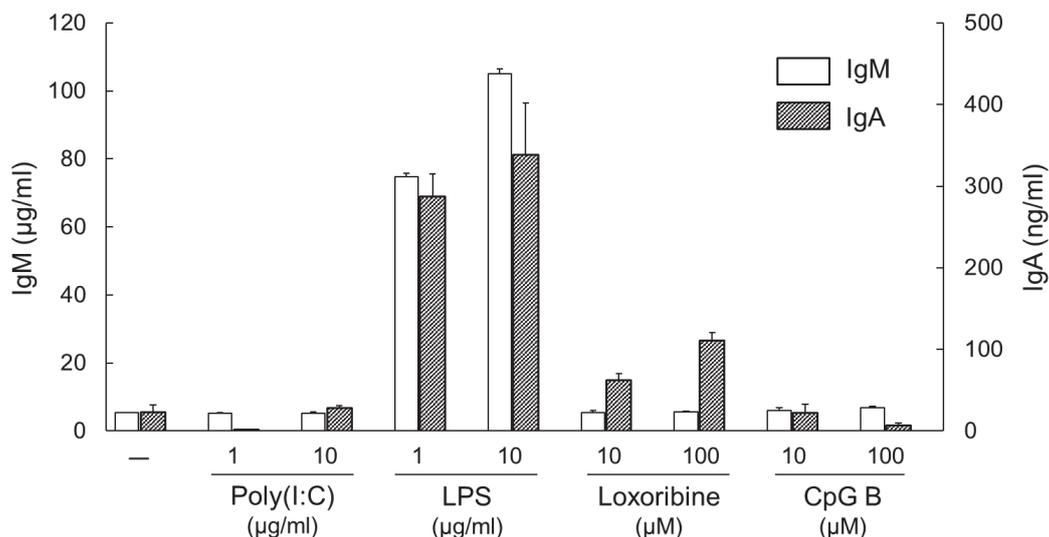


Fig. 1 Effects of stimulation with TLR ligands on production of IgM and IgA

Splenic B lymphocytes were stimulated with TLR ligands and cultured for 7 days. IgM and IgA concentrations in the supernatants were determined by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean ($n = 3$).

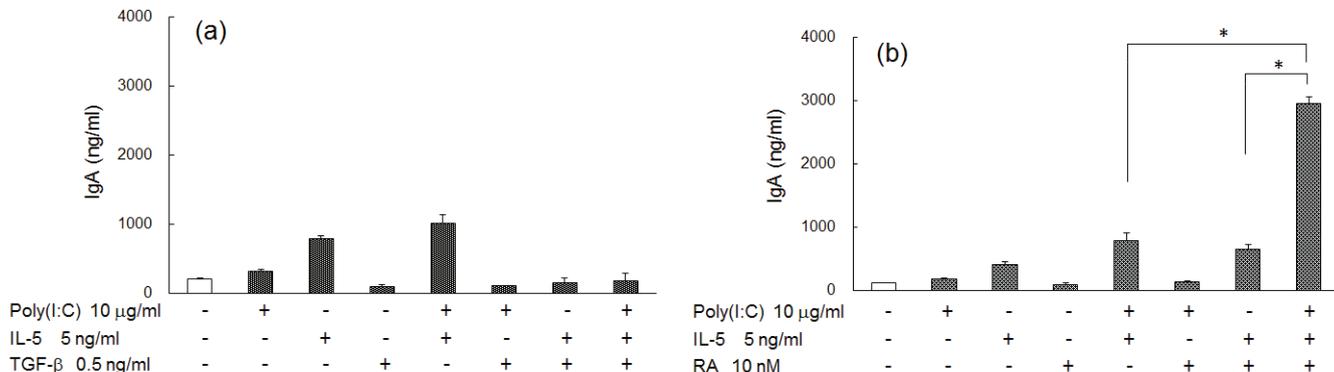


Fig. 2 IgA production induced by stimulation with poly (I:C)

(a) Splenic B lymphocytes were treated with poly (I:C), TGF- β and IL-5. (b) B lymphocytes were treated with poly (I:C), RA and IL-5. After culture for 7 days, IgA concentrations in the supernatant were determined by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean ($n = 3$). * $P < 0.01$ (Student's t-test).

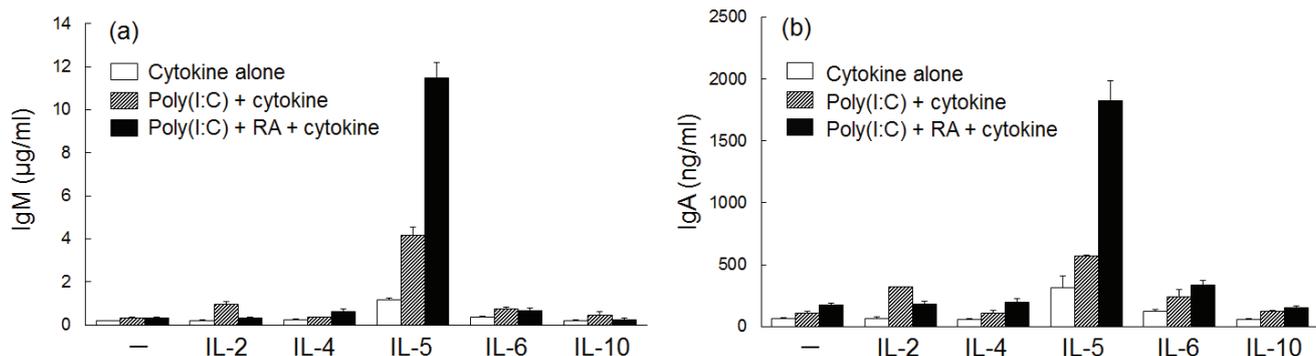


Fig. 3 Effects of cytokines on production of IgM and IgA by stimulation with poly (I:C) and RA

Splenic B lymphocytes were stimulated with poly (I:C), RA and several cytokines. After culture for 7 days, (a) IgM concentrations in the supernatants were determined by ELISA. (b) IgA concentrations in the supernatants were determined by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean (n = 3).

3. サイトカインが抗体産生に及ぼす影響

Poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激により IgA 産生が増強することが明らかとなったが, IL-5 以外のサイトカインとの共刺激が抗体産生にどのような影響を及ぼすかについても検討を行った. IL-2, IL-4, IL-6 及び IL-10 単独での刺激下では, IgM 及び IgA 産生の顕著な増加は認められなかった. 一方, IL-5 については, 単独, poly (I:C) との共刺激あるいは poly (I:C) と RA との共刺激のいずれにおいても, IgM 及び IgA 産生量が有意に増加した (Fig. 3).

4. IgA 産生誘導系を用いたスクリーニング系の構築

Poly (I:C) 及び IL-5 存在下, RA の濃度依存的に IgA 産生が誘導されることを利用し, poly (I:C), RA 及び IL-5 の濃度をそれぞれ 5 µg/ml, 1 nM 及び 5 ng/ml に設定することで, IgA 産生を指標とした粘膜アジュバントのスクリーニング系を構築した (データは示していない).

考 察

我々は, これまでに培養細胞を用いた *in vitro* での免疫評価系を構築し, 天然化合物をはじめとする様々な化合物の生活習慣病などに対する薬効評価を行ってきた⁹⁻¹²⁾. 安全かつ効果的な粘膜アジュバントの開発においても適切な *in vitro* 評価系を確立し, 各種化合物の粘膜アジュバントとしての有効性を評価できれば, 新たな作用機序を有するアジュバント化合物を獲得できる可能性が高い. そこで, 粘膜免疫において重要な因子である IgA の産生を指標とした *in vitro* 評価系を構築し, IgA 産生を増強する天然化合物のスクリーニングを行うことで効果的かつ安全な粘膜アジュバントの開発を進めてきた.

粘膜免疫に特徴的な IgA の産生誘導機構については, 腸管粘膜免疫においてはいくつかの知見が得られているが,

鼻腔粘膜における粘膜免疫応答機構に関しては明らかになっていない点が多い. 腸管粘膜における B 細胞の IgA 産生誘導の作用機序を例にとると, IgM 陽性 B 細胞に, T 細胞依存性経路では T 細胞からの刺激と TGF-β により, T 細胞非依存性経路では腸内細菌などによる TLR リガンドの刺激と RA, あるいは BAFF や APRIL により IgA クラススイッチが誘導されて IgA 陽性細胞となり, IL-2, IL-5 や IL-6 などのサイトカインが IgA 産生細胞への分化を誘導することが知られている⁴⁻⁶⁾. *In vitro* の検討において, ウイルス認識に関与しているといわれる TLR 3, 4, 7 及び 9¹³⁾ の TLR リガンドごとに IgM 及び IgA 産生には差異があり, LPS による刺激は IgM 及び IgA 産生を顕著に増強することがわかった (Fig. 1). この IgM 及び IgA 産生量の増加は, LPS 刺激による細胞増殖の促進により, もともと存在していた IgM 陽性細胞数及び IgA 陽性細胞数が増加した結果であり, IgA クラススイッチ組換えは誘導されていないものと推察される. 一方, poly (I:C) による細胞増殖はほとんど見られず, IgM 及び IgA 産生量はコントロール群と同程度であった.

In vivo において poly (I:C) がインフルエンザワクチンの粘膜アジュバントとしてワクチン抗原特異的な IgA を産生するが, その作用機序は明らかとなっていない. そこで, *in vitro* での B 細胞培養系において poly (I:C) による IgA クラススイッチ誘導に関与する各種因子による刺激を検討したところ, 興味深いことに, IgA 産生を誘導するのは, poly (I:C) と TGF-β との共刺激ではなく, poly (I:C) と RA 及び IL-5 の共刺激であることが明らかとなった (Fig. 2a, b). また, LPS と RA との共刺激系において, IL-2 と IL-5 は同程度に IgA 産生を増大させることが報告されているが⁸⁾, poly (I:C) と RA との共刺激系においては, IL-5 のみが顕著に IgA 産生を増加させた (Fig. 3b). さらに, poly (I:C) と RA との共刺激系では, それらの単独での刺激と比較して IgA 産生の増加は認められなかつ

たが, poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激により有意に IgA 産生が増加した. これらの結果より, poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激がB細胞のIgAクラススイッチ組換え誘導し, しかも, LPS と RA による IgA 産生誘導とは異なる機序で作用しているものと推察される. 一方で, 破傷風毒素ワクチンに poly (I:C) と RA とを併用することで, IgG 陽性細胞数が増加し, さらには抗体産生細胞への分化が促進され, IgG 産生が増大することが報告されている¹⁴⁾. 今後, poly (I:C), RA 及び IL-5 による IgA 産生誘導系において, IgA クラススイッチ組換え及び IgA 産生細胞への分化について, どの因子がどのように作用しているのかを明らかにしていく予定である.

本研究で確立した poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激による IgA 産生誘導系をもとに, IgA 産生を指標として, これまでに100種類以上の天然化合物についてスクリーニングを行っている. いくつかの化合物に IgA 産生増強作用を見出しており, 本研究で構築した評価系は粘膜アジュバントの探索に応用できると考えられる. また, このスクリーニング系をもとに TLR リガンドなどの刺激を検討することで, 粘膜アジュバントとしての有効性の評価系としての利用に限らず, 例えば, 感染症予防や腸内環境の恒常性の維持に関わる腸管での IgA 産生を増強する食品成分の評価など, より広範囲の化合物の一次スクリーニング系として応用できると期待される.

謝 辞

本研究は, 一般財団法人化学及血清療法研究所, デンカ生研株式会社, 及び一般財団法人阪大微生物病研究会との共同研究「ワクチン用新規アジュバント開発のための基盤研究プロジェクト (代表者: 高津 聖志, 富山県薬事研究所)」として実施された. 各企業の方々に心より感謝申し上げます.

参考文献

- 1) Brandtzaeg P., Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions., *Scand J Immunol.*, **70** (6), 505-515 (2009)
- 2) Elson CO., Ealding W., Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin., *J Immunol.*, **132** (6), 2736-2741 (1984)
- 3) Ichinohe T., Watanabe I., Ito S., Fujii H., Moriyama M., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Chiba J., Kurata T., Sata T., Hasegawa H., Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection., *J Virol.*, **79**(5), 2910-2919 (2005)
- 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) Coffman RL., Leberman DA., Rothman P., Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching., *Adv Immunol.*, **54**, 229-270 (1993)
- 6) Cerutti A., The regulation of IgA class switching., *Nat Rev Immunol*, **8** (6), 421-434 (2008)
- 7) 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)
- 8) Tokuyama H., Tokuyama Y., The regulatory effects of all-trans-retinoic acid on isotype switching: retinoic acid induces IgA switch rearrangement in cooperation with IL-5 and inhibits IgG1 switching., *Cell Immunol.*, **192**(1), 41-47 (1992)
- 9) 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薬物の探索, 富山県薬事研究所年報, **38**, 21-27 (2011)
- 10) 松永孝之, 小笠原勝, 高津聖志, 膵臓β細胞のリボース誘発細胞死に対する保護効果を有する天然物の探索, 富山県薬事研究所年報, **39**, 17-20 (2012)
- 11) 宮本 (山口) 朋美, 本田裕恵, 田村隆幸, 横田洋一, 松永孝之, 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, 富山県薬事研究所年報, **40**, 33-38 (2013)
- 12) 本田裕恵, 宮本 (山口) 朋美, 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 (5) シャクヤクエキスの IL-6 産生抑制効果に関する検討, 富山県薬事研究所年報, **40**, 39-45 (2013)
- 13) 植松智, 審良静男, TLR ファミリーとウイルス感染, ウイルス, **54**(2), 145-152 (2004)
- 14) Ma Y., Ross AC., Toll-Like receptor 3 ligand and retinoic acid enhance germinal center formation and increase the tetanus toxoid vaccine response, *Clin Vaccine Immunol.*, **16**(10), 1476-1484 (2009)

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

川筋 透, 松永 孝之

Pharmacokinetic studies of diosmetin and diosmin in mice

Toru KAWASUJI and Takayuki MATSUNAGA

要 約

ジオスメチン及び配糖体ジオスミンのマウスにおける吸収性を、ODS カラムを用いた HPLC-UV 法 (275 nm, 345 nm) によって検討した。ジオスメチン (100 mg/kg) の経口投与後、マウス血漿中にジオスメチンは検出されず、グルクロニダーゼ処理血漿中にジオスメチンが検出された。投与30分、1時間及び4時間後でのジオスメチンのグルクロニダーゼ処理血漿中濃度は、それぞれ1.3 µg/mL、1.3 µg/mL 及び0.7 µg/mL であった。一方、ジオスミン (2 g/kg) の経口投与4時間後、グルクロニダーゼ処理血漿中にジオスメチンは検出されなかった。これらの結果から、ジオスメチンは、消化管から吸収され、グルクロン酸抱合体としてマウスの血漿中に存在することが示唆された。

Summary

The absorption of diosmetin and its glycoside, diosmin in mice was investigated by HPLC-UV (275 nm, 345 nm) using ODS column. Diosmetin was not detected in mouse plasma but was detected in glucuronidase-treated mouse plasma after oral administration of diosmetin (100 mg/kg). The concentration of diosmetin in glucuronidase-treated plasma at 30 min, 1h and 4 h after administration were 1.3 µg/mL, 1.3 µg/mL and 0.7 µg/mL, respectively. On the other hand, diosmetin was not detected in glucuronidase-treated plasma after oral administration of diosmin (2 g/kg). These results suggest that diosmetin is absorbed from gastrointestinal tract and is presented as glucuronide in mouse plasma.

キーワード：ジオスメチン、ジオスミン、マウス、血漿、グルクロン酸抱合体

Key words : Diosmetin, Diosmin, Mouse, Plasma, Glucuronide

生理活性天然物の有用性評価において、吸収・代謝に関する情報は重要である。また、マウスを用いて薬効評価試験を行う場合には、マウスに経口投与した場合の血中濃度を知っておくことが望ましい。

フラボノイドの体内動態に関して、多くのフラボノイドでは、動物体内で大部分が抱合体化され、遊離型は痕跡程度しか見出せない場合が多いとされている¹⁾。

ジオスミンは、柑橘類に含まれるフラボノイドの1つであり²⁾、ジオスメチンにルチノースが結合したフラボン配糖体である。ジオスミン及びジオスメチンには、種々の生理活性が知られており^{3,4)}、ヒトやラットでの体内動態が報告されているが⁵⁻⁸⁾、マウスでの体内動態に関する報告はほとんどみられない。

ジオスミンの体内動態に関して、ヒトとラットで異なる結果が報告されている^{5,7)}。ジオスミン経口投与後、ヒト血中にジオスミンは不検出であるが、ジオスメチンが検出されるとの報告⁵⁾がある一方で、ラット血中にジオスミンが検出されるとの報告⁷⁾もある。

また、ジオスメチンの体内動態に関しては、ジオスメチンを経口投与後、ラット血中にジオスメチンは検出されないが、ジオスメチンのグルクロン酸抱合体が検出されるという報告がある⁶⁾。

今回、ジオスメチン及び配糖体のジオスミンについて、マウスにおける体内動態を明らかにすることを目的として、経口投与後の血中濃度を測定し、消化管吸収性を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

ジオスメチン (LKT Laboratories)、ジオスミン (MP Biomedicals)、β-グルクロニダーゼ溶液 (和光純薬、25,000 units/mL、リンゴ貝起源、硫酸懸濁液)、安息香酸 (和光純薬) 他を使用した。

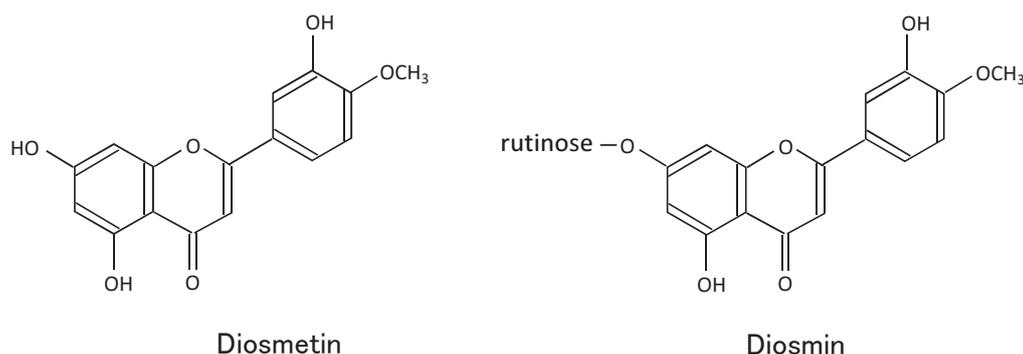


Fig. 1 Chemical structures of diosmetin and diosmin.

2. 投与・採血

投与前日夕刻に ICR 雄性マウス（体重25–40g）を個別金網ケージに移し、1 晩絶食（自由飲水）した。検体は0.5% Tween 80 水溶液に懸濁し、ジオスメチンは100 mg/kg、ジオスミンは2 g/kg の割合でゾンデを用いて強制経口投与し、一定時間経過後（～4 時間）に採血を行った。なお、溶媒投与群には0.5% Tween 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 背部皮下投与した（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 0.25 mg 入）に血液を採取した。血液は3,000 rpm 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 に保存した。

3. 標準液の調製

ジオスメチン DMSO 溶液（1 mg/mL）、ジオスミン DMSO 溶液（1 mg/mL）及び内部標準物質の安息香酸⁷⁾ のメタノール溶液（1 mg/mL）の各0.1 mL にメタノール 1.7 mL と水 2.0 mL を加えて25 µg/mL 混液を調製した（合計4.0 mL；メタノール45%，DMSO 5%）。次に、25 µg/mL 混液0.2 mL に、メタノール1.8 mL、水2.0 mL 加えて希釈し（合計4.0 mL）、ジオスメチン、ジオスミン及び安息香酸が各1.25 µg/mL となる標準液を調製し、0.2 µ のシリンジフィルター（ワットマン、13mm、ポリプロピレン）でろ過し、HPLC 分析における標準試料として使用した。

検量線の直線性を確認するため、25 µg/mL 混液 1 mL にメタノール 2 mL と水 2 mL を加えて5 倍希釈し5 µg/mL を調製した。同様な5倍希釈を繰り返し、1 µg/mL と0.2 µg/mL の標準液を調製した。

4. HPLC 分析

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、移動相は、メタノール/水/酢酸 (47:53:5)⁷⁾ とした。UV 検出器（島津製作所、SPD-10Avp）の波長は、275 nm⁷⁾ または345 nm⁵⁻⁶⁾ に設定した。流量は0.8 mL/分、カラム温度は34°C、注入量は10 µL とし、オートサンプラーで HPLC カラムに注入した。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. 血漿中のジオスメチン及びジオスミンの分析

マウスの血漿は、メタノールと DMSO 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、DMSO を12 µL（血漿量×0.3）、安息香酸メタノール溶液（10 µg/mL）を60 µL（血漿量×1.5）、メタノールを160 µL（血漿量×4）添加し、混和後、氷冷放置した。4,000 rpm で10分間遠心し、遠心上清を0.2 µ のシリンジフィルターでろ過し、HPLC 分析試料とした（272 µL；血漿の6.8倍希釈）。内標の安息香酸は、血漿中濃度が15 µg/mL となる。

血漿に標準品を添加し分析する実験では、血漿に DMSO を加える段階で、ジオスメチンまたはジオスミンの DMSO 溶液を血漿に添加して HPLC 分析試料を調製した。血漿40 µL に対して、2.5 µg/mL または25 µg/mL の DMSO 溶液12 µL（血漿量×0.3）を添加した場合は、それぞれ0.75 µg/mL 血漿または7.5 µg/mL 血漿の濃度となる。

6. 血漿中のグルクロン酸抱合体の分析

血漿中のグルクロン酸抱合体を検出するため、血漿を酸性化し、グルクロニダーゼを反応させ、脱抱合を行った⁹⁾。すなわち、マイクロチューブ中の血漿40 µL に対して1M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）4 µL を加え、吸排混和し、次に β-グルクロニダーゼ（25,000 units/mL）2 µL を加えて、吸排混和し、37°C 1 時間ドライバスで加温することでグルクロニダーゼ処理を行った。グルクロニダーゼ処理血漿の場合も、血漿の場合と同じ手順で抽出・除蛋白を

行い、HPLC分析試料を調製した。血漿40 μL に対してグルクロニダーゼ処理血漿は46 μL になり、DMSO・メタノールの添加量は同じあり、最終的にHPLC分析試料は278 μL となるので、最初の血漿に対して6.95倍希釈となる。この希釈倍率に基づいて、血漿中濃度を算出した。

実験結果

1. 標準品の溶出挙動

配糖体のジオスミン(約4.2分)、内標の安息香酸(約6.3分)、アグリコンのジオスメチン(約15.7分)の順に溶出した(Fig. 2)。345 nmでの分析では、275 nmでの分析と異なり、安息香酸のピークは検出されなかった。345 nmでのジオスミン及びジオスメチンのピークは275 nm

での場合よりも大きく、ピーク検出感度はやや高かった。

標準品の濃度とピーク面積の間に0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで直線性がみられた。

2. 標準品添加血漿の分析

血漿に標準品を添加した場合、HPLCクロマトグラム上のジオスメチンの溶出位置には、275 nmと345 nmのいずれの場合も妨害ピークはみられなかった。一方、ジオスミンの溶出位置には、345 nmでは妨害ピークはなかったが、275 nmでは妨害ピークがみられた。

血漿に標準品を添加した場合の回収率を275 nmでの分析で検討した(Fig. 3)。その結果、ジオスメチンを0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血漿または7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血漿の濃度となるように添加した場合の回収率は、それぞれ60.7% (n=3) 及び99.9

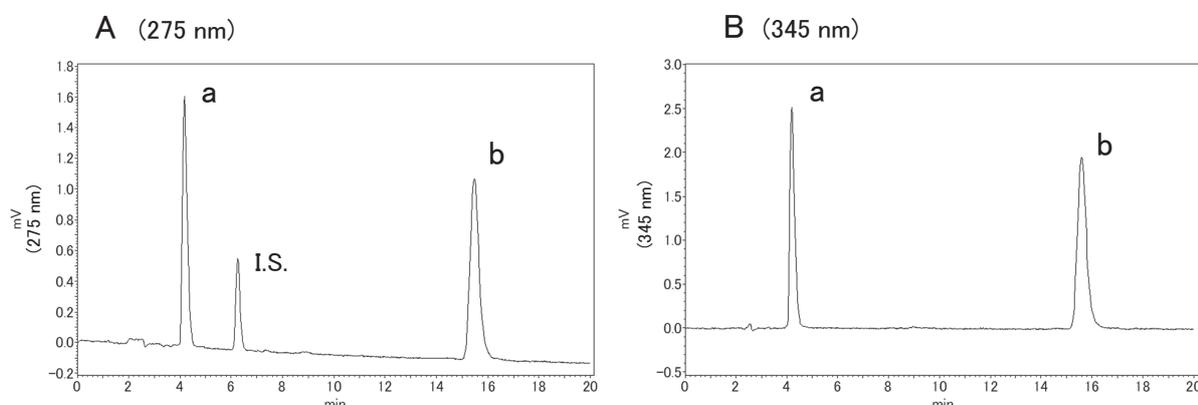


Fig. 2 HPLC chromatograms of standards of diosmetin and diosmin

a: diosmin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), b: diosmetin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), I.S.: internal standard benzoic acid (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ODS column was used. Mobile phase was methanol/water/acetic acid (47:53:5). Detector was conducted at 275 nm or 345 nm.

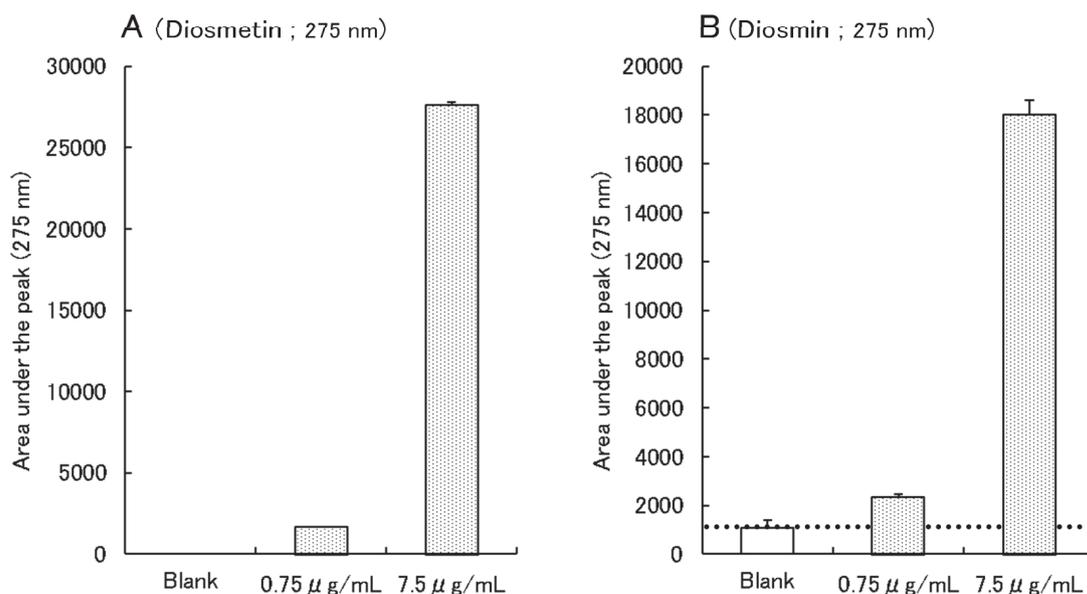


Fig. 3 Area under the peak in diosmetin- or diosmin-added mouse plasma

Diosmetin (A) or diosmin (B) was added to mouse plasma. Final concentrations were 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Blank: No addition. Each column is presented as a mean and S.E.(n = 3-5).

% (n=3)であった。一方、ジオスミンの場合は、無添加血漿におけるピーク面積 (n=5) を差し引いて回収率を計算したところ、ジオスミンを0.75 µg/mL 血漿または7.5 µg/mL 血漿の濃度となるように添加した場合の回収率は、それぞれ78.3% (n=3) 及び99.1% (n=3) となった。

3. ジオスメチン投与後のグルクロニダーゼ処理血漿中のジオスメチンの検出

ジオスメチンの100 mg/kg 経口投与30分後の血漿の分析では、ジオスメチンの溶出位置にピークは検出されなかった。一方、安息香酸の溶出時間 (約6.3分) の直前に、特異的ピークが検出された (約5.8分)。一方、血漿をグルクロニダーゼ処理すると、ジオスミンの溶出位置にピークが検出され、無処理血漿でみられた特異的ピーク (ジオスメチン関連グルクロナイド) は消失した (Fig. 4)。

ジオスメチン経口投与後のグルクロニダーゼ処理血漿中のジオスメチンの濃度は、30分値と1時間値がほぼ同じであり、4時間値はその約1/2であった。275 nm での分析と345 nm での分析では、ほぼ同じ結果が得られ、30分、1時間及び4時間後の濃度 (2波長での平均) は、それぞ

れ1.3 (1.29) µg/mL, 1.3 (1.35) µg/mL 及び0.7 (0.66) µg/mL であった (Fig. 5)。

なお、275 nm での内標法でも同様な濃度が算出され、30分、1時間及び4時間後の濃度は、それぞれ1.1 (1.13) µg/mL, 1.2 (1.16) µg/mL 及び0.6 (0.58) µg/mL (n=3) であった。

4. ジオスミン投与後の血漿分析

ジオスミンの2 g/kg 経口投与4時間後の血漿を345 nm で分析したところ (n=3)、ジオスミンのピークは検出されず、ジオスメチン投与時にみられる特異的なピーク (ジオスメチン関連グルクロナイド) も検出されなかった (Fig. 6,7)。また、グルクロニダーゼ処理血漿の分析 (n=3) では、ジオスメチンのピークも検出されなかった (Fig. 6,7)。

グルクロニダーゼ処理血漿の HPLC クロマトグラム上には、ジオスミンの溶出位置に不明ピークが出現したが、溶媒投与群にもみられるピークであり、ピークの大きさに差はほとんどみられなかった。

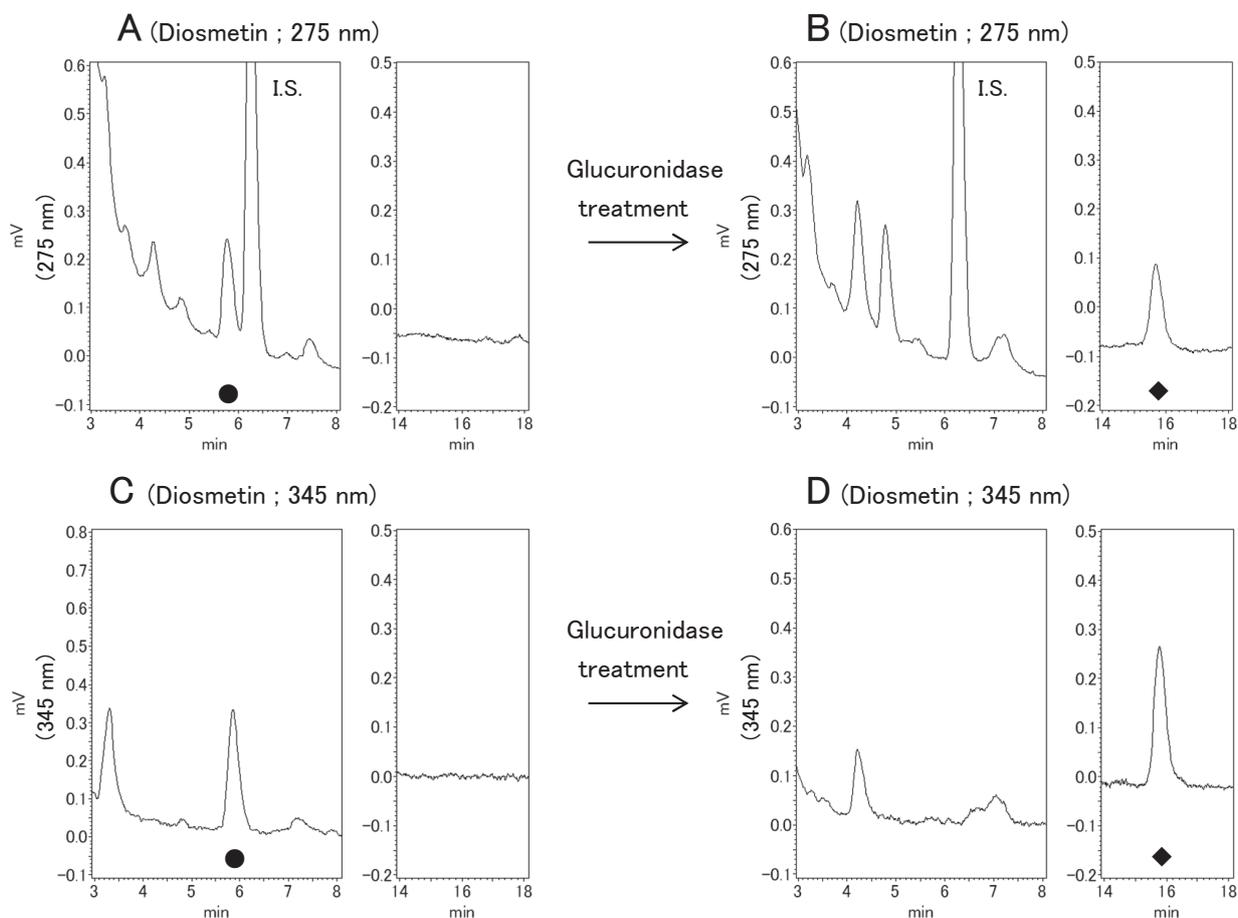


Fig. 4 HPLC chromatograms of glucuronidase-treated plasma of diosmetin-administered mice
Blood was collected 0.5 h after oral administration of diosmetin at 100 mg/kg. ●: diosmetin-related glucuronide, ◆: diosmetin. I.S.: internal standard (benzoic acid).

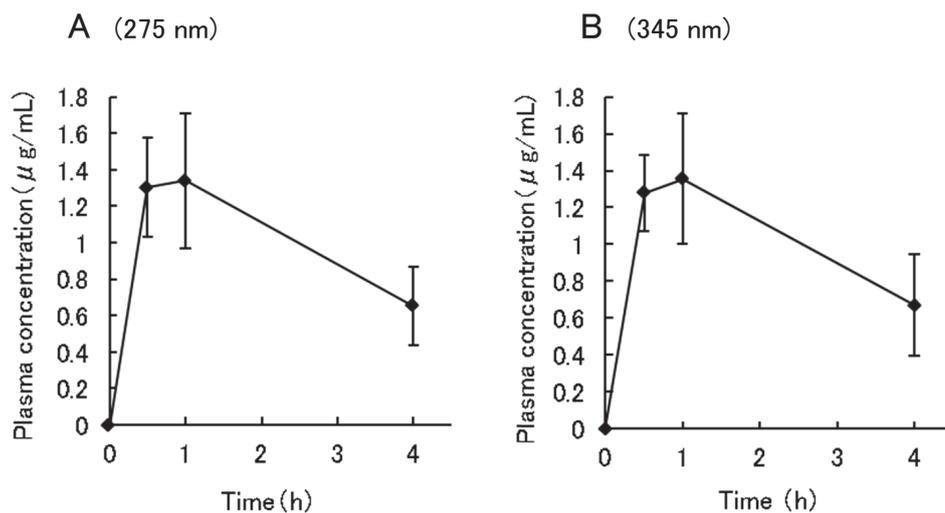


Fig. 5 Concentration of diosmetin in glucuronidase-treated mouse plasma
 Concentrations of diosmetin in glucuronidase-treated mouse plasma were determined at 275 nm (A) and 345 nm (B). Diosmetin was orally administered at 100 mg/kg. Each point is presented as a mean \pm S.E. of 3 mice.

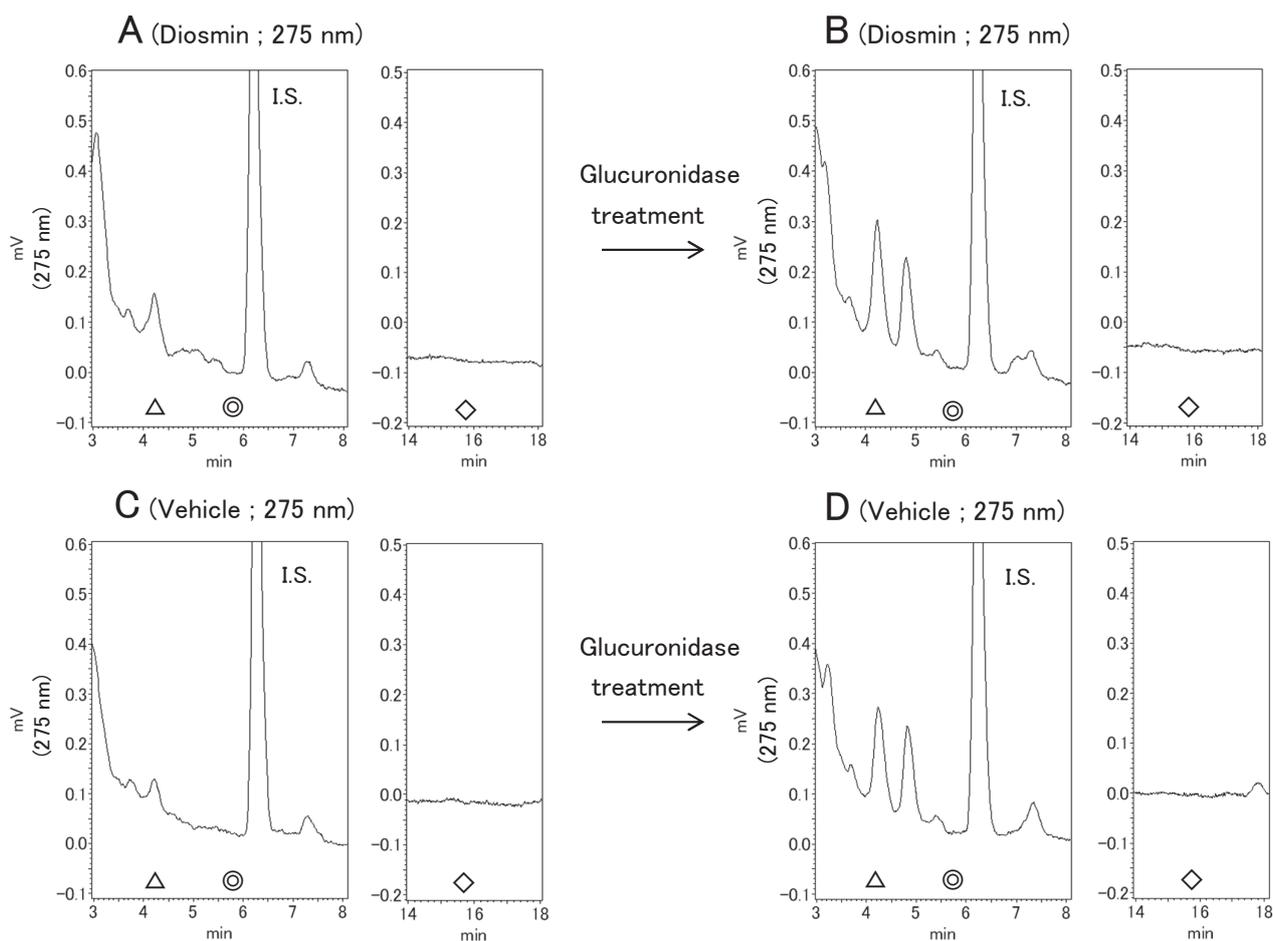


Fig. 6 HPLC chromatogram of glucuronidase-treated plasma of diosmin-administered mice (at 275 nm)
 Blood was collected 4 h after oral administration of diosmin at 2 g/kg. Vehicle: 0.5% tween 80 solution. Symbols show the retention time of diosmin (Δ), diosmetin-related glucuronide (\odot) and diosmetin (\diamond). I.S.: internal standard (benzoic acid).

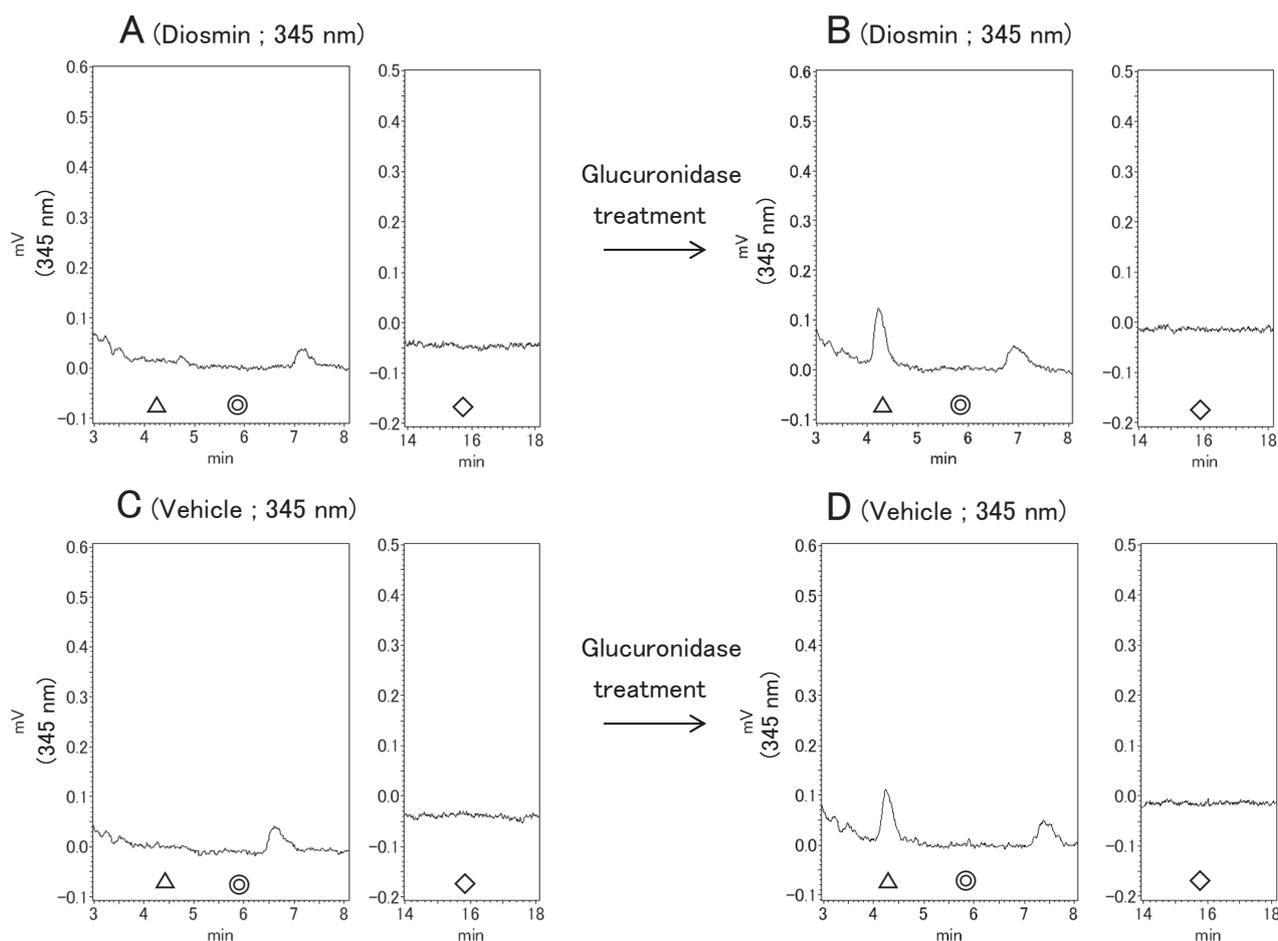


Fig. 7 HPLC chromatogram of glucuronidase-treated plasma of diosmin-administered mice (at 345 nm)
 Blood was collected 4 h after oral administration of diosmin at 2 g/kg. Vehicle: 0.5% tween 80 solution. Symbols show the retention time of diosmin (Δ), diosmetin-related glucuronide (\odot) and diosmetin (\diamond).

考 察

血液試料中のジオスメチンやジオスミンの HPLC 分析では、検出波長に 275 nm⁷⁾ または 345 nm^{5,6)} を用いる方法が報告されており、今回、275 nm と 345 nm の 2 つの波長を HPLC 分析で用いた。今回の HPLC 条件では、ジオスメチンの場合は、2 波長とも妨害ピークはなく濃度測定に問題はなく、検出感度は 275 nm より 345 nm のほうが高かった。ジオスミンの場合は、275 nm においてジオスミンの溶出位置に妨害ピークがみられ、345 nm での分析が適していた。

ジオスメチンは、ラットへの経口投与後、すぐに抱合体化し、グルクロン酸抱合体として血中に存在するとされ、グルクロン酸抱合体の血中濃度は高く、100 mg/kg の経口投与で 10 μ g/mL までになり、少なくとも投与後 6 時間は血中に存在すると報告されている⁶⁾。また、主たる抱合体は、ジオスメチン-7,3'-ジグルクロナイドとジオスメチン-3'-グルクロナイドであると報告されている⁶⁾。

グルクロン酸抱合体の分析のために、血漿をグルクロニ

ダーゼで処理する方法が用いられる⁹⁾。今回、マウスの血漿でグルクロニダーゼ処理を行い、血中のグルクロン酸抱合体の有無を検討した。ジオスメチンの経口投与後、マウス血漿中にジオスメチンのピークは検出されなかったが、マウス血漿をグルクロニダーゼ処理すると、ジオスメチンのピークが検出された。また、ジオスメチン投与マウスの血漿には、溶媒投与マウスにはみられない特異的なピークが検出され、そのピークはグルクロニダーゼ処理で完全に消失したことから、ジオスメチンのグルクロン酸抱合体のピークと考えられた。

ラットの場合⁶⁾と同様に、今回のマウスの場合も、ジオスメチンは経口投与後、グルクロン酸抱合体となって血中に存在しているものと考えられた。グルクロニダーゼ処理血漿中のジオスメチンの濃度は、100 mg/kg の経口投与 30 分後に 1.3 μ g/mL 血漿となり、1 時間後はほぼ同じ値を示し、4 時間後は、その約 1/2 の 0.7 μ g/mL 血漿になるという推移を示した。

ヒトでの体内動態研究では、ジオスミンの 10 mg/kg の投与で、血中にジオスミンは検出されないが、ジオスメチ

ンが検出され、1時間後に約400 ng/mLとなり、その後、濃度は低下しながら長時間にわたって血中にジオスマチンが検出されるという報告がある⁵⁾。一方、ラットの場合、ジオスミンが血中に比較的高い濃度で長時間にわたって検出されるという報告もみられる⁷⁾。さらに、別のヒトでの報告では、ジオスミンの投与で、ヒト血漿中に遊離型のジオスマチンはみられず、ジオスマチンのグルクロン酸抱合体が検出されている⁸⁾。

今回、配糖体であるジオスミンの体内動態をマウスで検討するにあたり、投与後3-4時間で最も高濃度にジオスミンが検出されるというラットでの報告⁷⁾もあることから、投与4時間後のマウスの血漿を分析対象とした。ジオスミンの2 g/kgという高用量の経口投与において、血漿中にジオスミンは検出されず、グルクロニダーゼ処理を行ってもアグリコンであるジオスマチンのピークは検出されなかった。

今回のマウスの実験では、血中にジオスミンは検出されず、ラットでの報告⁶⁾と異なる結果であった。ジオスミン投与でジオスマチン及びジオスマチンのグルクロン酸抱合体は検出されず、ヒトでの報告^{5,8)}と異なる結果であった。

今回のマウスにおける単回経口投与と実験での血中濃度分析では、ジオスマチンの消化管吸収性は良いが、ジオスミンの消化管吸収は悪いという結果であった。また、血中に存在するのはジオスマチンでなく、そのグルクロン酸抱合体という結果であった。薬効評価においては混餌による長期投与も行われることから、連続経口投与の場合の体内動態については今後の検討課題である。

文 献

- 1) 宮澤陽夫, 仲川清隆, 浅井 明: 天然抗酸化物質の吸収と代謝, 化学と生物, **38**, 104-114 (2000)
- 2) Kanaze F.I., Gabrieli C., Kokkalou E., Georgarakis M., Niopas I.: Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations, J. Pharm. Biomed. Anal., **33**, 243-249 (2003)
- 3) Monograph Diosmin, Artern. Med. Rev., **9**, 308-311 (2004)
- 4) Rezai-Zadeh K., Shytle R. D., Bai Y., Tian J., Hou H., Mori T., Zeng J., Obregon D., Town T., Tan J.: Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer's disease β -amyloid production, J. Cell. Mol. Med., **13**, 574-588 (2009)

- 5) Cova D., De Angelis L., Giavarini F., Palladini G., Perego R.: Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol., **30**, 29-33 (1992)
- 6) Boutin J.A., Meunier F., Lambert P.-H., Henning P., Bertin D., Serkiz B., Volland J.-P.: In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats, Drug Metab. Dispos. **21**, 1157-66 (1993)
- 7) MA Ying-li, MA Chao: Studies on pharmacokinetics of diosmin in rats, China Journal of Chinese Materia Medica (中国中藥雜誌), **32**, 418-420 (2007)
- 8) Silvestro L., Tarcomnicu I., Dulea C., Attili N.R.B.N., Ciuca V., Peru D., Savu S.R.: Confirmation of diosmetin 3-O-glucuronide as major metabolite of diosmin in humans, using micro-liquid-chromatography-mass spectrometry and ion mobility mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem., **405**, 8295-8310 (2013)
- 9) Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H., Kinoshita N.: Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans, FEBS Letters, **438**, 220-224 (1998)

漢方エキス含有錠剤の設計に関する研究

永井 秀昌, 明官 勇雄

Formulation Design of Chinese Herbal Extract Preparation

Hidemasa NAGAI, Isao MYOKAN

要 約

我々は、漢方エキスを主薬とする飲みやすい製剤の製造条件について検討するため、一般的な固形製剤の製造装置を用いて、添加剤の組み合わせを中心とした検討を行った。その結果、漢方エキスを流動化剤とともに流動層造粒機で造粒することで、崩壊性に優れた顆粒剤を得ることができた。さらに、この顆粒剤に崩壊剤を添加し、打錠することで、崩壊性に優れた漢方エキス含有錠剤を製錠した。本手法を用いてさらに崩壊性を改善することにより、口腔内崩壊錠やチュアブル錠の開発が可能になると考えられる。

Summary

We have studied the Formulation Design of Chinese Herbal Extract Preparation to produce an easily drinkable formula, using the commonly used machines in the field of pharmaceutical industry. We prepared granule of Chinese Herbal Extract using fluidized bed granulator, and the easily disintegrating tablet from the granule and highly designed disintegrant. These results suggest that if the disintegration of the tablet is improved further, it will be possible to develop the orally disintegrating tablet or chewable tablet containing a combination of Chinese Herbal Extracts.

キーワード：口腔内崩壊錠；漢方エキス製剤；芍薬甘草湯

Key words：Orally disintegrating tablets；Chinese herbal extract preparation；Shakuyakukanzoto

近年、小児や高齢の患者に対する服薬アドヒアランス改善のため、口腔内速崩壊錠（OD錠）やゼリー剤等の飲みやすさに配慮した製剤が相次いで研究開発されている。OD錠やゼリー剤は水なしで服用できることから、錠剤を嚥下するのに困難な高齢者の患者や水分摂取制限のある透析患者にも服用しやすく、服薬アドヒアランスの改善が期待できる剤形である¹⁾。

しかしながら、主薬が高含量の場合や吸湿性の高い生薬・漢方エキスを配合する場合には、崩壊時間が著しく遅延するために、飲みやすい剤形の開発が困難である。このため、一般的な製造装置を用いて製造可能な漢方エキス製剤のOD錠・チュアブル錠の開発を目的に研究を実施した。実験では、こむら返り等の下肢の痙攣性疼痛に有効な「芍薬甘草湯エキス」を主薬とするモデル処方について、添加剤の組み合わせにより、崩壊性に優れた錠剤の設計を試みた。

実験方法

1. 芍薬甘草湯を主薬とする処方の直打による錠剤化の検討
直打用処方として、Table 1 に示した処方を秤量し、

Table 2 の条件で製錠した。錠剤硬度は40N 程度になるように製錠した。打錠用の金型には、直径10 mm の標準R 杵を用い、1 錠あたり400 mg になるように打錠した。また、打錠後の錠剤について、硬度（ポータブルチェッカー PC-30、岡田精工(株)）を測定した。

Table 1 直打処方

主 薬	芍薬甘草湯エキス粉末	50%
賦形剤	D-マンニトール	38.5%
崩壊剤	クロスポピドン	5%
流動化剤	ケイ酸アルミン酸 Mg	4.5%
甘味料	スクラロース	1%
矯味剤	クエン酸	0.5%
滑沢剤	ステアリン酸 Mg	0.5%
合 計		100%

Table 2 打錠条件

打錠機	ロータリー式打錠機 (VELA5, (株)菊水製作所)
金 型	直径10 mm (標準 R)
仕込量	100 g
回転数	10 rpm
打錠圧	3 kN
重 量	400 mg / Tablet

2. 芍薬甘草湯を主薬とする処方¹⁾の造粒条件の検討（流動化剤の選択）

2-1. 造粒

Table 3 の処方400g を流動層造粒機（FL-LABO, フロイント産業²⁾）に仕込み、給気温度65℃、風量0.3 m³/min、スプレーエア-圧0.1MPa、パルスエア-圧0.22MPa で造粒を行った。スプレーは甘味料を溶かした水溶液を用い、80 g のスプレー量に達したら、スプレーのみ停止し乾燥した。また、チュービングポンプの電源を間欠タイマーで制御することにより、間欠的にスプレーを行った（噴霧：20秒、停止：10秒）。乾燥の終点は排気温度38℃とし、乾燥後の造粒物を1mmで篩下したものを物性評価に用いた。

Table 3 造粒処方

主薬	芍薬甘草湯エキス粉末	60.7%
賦形剤	D-マンニトール	29.45%
流動化剤	流動化剤※	3.6%
崩壊剤	クロスボビドン	5%
甘味料	ソーマチン	0.05%
甘味料	スクラロース	1.2%
合計		100%

※1) ケイ酸アルミン酸マグネシウム、2) 軽質無水ケイ酸、3) ケイ酸カルシウムを使用

2-2. 物性評価

得られた顆粒のかさ密度、粒子径分布を測定した。

3. 芍薬甘草湯を主薬とする打錠処方¹⁾の検討（崩壊剤の選択）

3-1. 打錠

2 で得られた打錠用顆粒（流動化剤：ケイ酸アルミン酸マグネシウム）を用い、Table 4 に示した処方100 g を秤量し、Table 5 の条件で製錠した。錠剤硬度は40N になるように製錠した。打錠用の金型には、直径10 mm の標準R 杵を用いた。芍薬甘草湯エキス量として、200 mg 配合する錠剤とした。

Table 4 打錠処方

芍薬甘草湯エキス粉末造粒品	82.4%
崩壊剤※	15%
ケイ酸アルミン酸マグネシウム	1.5%
クエン酸	0.5%
ステアリン酸マグネシウム	0.6%
合計	100%

※崩壊剤

- ①低置換度ヒドロキシプロピルセルロース（L-HPC 信越化学工業²⁾）
- ②カルボキシメチルセルロースカルシウム（ECG-505 五徳薬品³⁾）
- ③クロスボビドン（Polyplasdon XL ISP）
- ④ α -化でんぶん（SWELSTAR 旭化成ケミカルズ⁴⁾）
- ⑤クロスカルメロースナトリウム（KICCOLATE ニチリン化学工業⁵⁾）

Table 5 打錠条件

打錠機	ロータリー式打錠機（VELA5, 株式会社菊水製作所）
金型	直径10 mm（標準R）
仕込量	100 g
回転数	10 rpm
打錠圧	3~5 kN
重量	400 mg/Tablet

3-2. 物性評価

得られた錠剤の硬度、崩壊時間を測定した。崩壊度は崩壊試験器（NT-2HS, 富山産業⁶⁾）及び口腔内崩壊錠試験器（ODT-101, 富山産業⁶⁾）を用いて6錠ずつ測定した。また、硬度はポータブルチェッカーPC-30（岡田精工⁷⁾）を用いて測定した。

実験結果

1. 芍薬甘草湯をモデル処方とする処方¹⁾の直打による錠剤化の検討

実験1の結果より、芍薬甘草湯エキスを50%配合する処方を用い、直打法による製錠を検討した結果、杵へのスティッキング及び錠剤のバインディングが発生し、製錠が不能であった。これは、エキス粒子の吸湿性が極めて高いためであると考えられる。この結果より、エキスを高含量配合する処方では直打法による製錠は困難であると考えられる。

2. 芍薬甘草湯をモデル処方とする処方¹⁾の造粒条件の検討（流動化剤の選択）

次に、流動層造粒機を用いて打錠用顆粒の造粒を行った。流動層造粒機を用いて造粒を行う際、吸湿性の高いエキスの凝集を防ぐため、流動化剤を3.6%配合した。流動化剤としてケイ酸アルミン酸マグネシウム、軽質無水ケイ酸、ケイ酸カルシウムの3種類を用いた。また、スプレーする溶液は甘味料を溶解した水とし、間欠スプレー法を用いてスプレーを行った。間欠スプレーは間欠タイマーを用いてポンプの電源を制御することにより、噴霧を20秒、停止を10秒とする条件でスプレーを実施した。

その結果、いずれの流動化剤を用いた処方でも、エキスを凝集することなく造粒でき、Table 6 の物性を持つ打錠用顆粒を得ることができた。いずれの処方でも流動性には優れており、顆粒の口腔内での崩壊性も良好であった。

3. 芍薬甘草湯をモデル処方とする処方¹⁾の打錠処方¹⁾の検討（崩壊剤の選択）

次に、2 で得られた造粒品を用いて、Table 4 の処方¹⁾で打錠を行った。打錠処方には流動化剤としてケイ酸アルミ

Table 6 打錠用顆粒の物性

処方	1	2	3
流動化剤	ケイ酸アルミン酸 Mg	軽質無水ケイ酸	ケイ酸カルシウム
造粒性	良好	良好	良好
かさ密度 (g/cm ³)	0.349	0.404	0.375
平均粒子径 (μm)	159.1	135.2	128.4
幾何標準偏差	1.5	1.6	1.6

Table 7 錠剤の物性

処方	A	B	C	D	E	F
崩壊剤	なし	低置換度ヒドロキシプロピルセルロース	カルボキシメチルセルロースカルシウム	クロスボビドン	α-化でんぷん	クロスカルメロースナトリウム
打錠性	良好	良好	良好	良好	良好	良好
崩壊時間 (秒)	22 min	4.6 min	3.8 min	2 min	10 min	9 min
口腔内崩壊錠試験器崩壊時間 (秒)		5.0 min	4.9 min	2.7 min	7 min	5.5 min

ン酸マグネシウム3.6%を配合した造粒品を用い、崩壊剤の種類を変えることによって崩壊性を検証した。その結果、いずれの処方においてもスティッキング等の打錠トラブルは発生することなく、製錠が可能であった (Table 7)。

錠剤の崩壊時間を測定した結果、崩壊剤無しの処方では崩壊時間が20分以上と極めて悪かったが、崩壊剤を後添加で15%配合することにより、顕著な崩壊性の改善が認められ、いずれの崩壊剤でも10分以内に崩壊した。このうち、クロスボビドンを15%配合した処方Dの崩壊性が最も優れており、局方の崩壊試験器で2分以内、口腔内崩壊錠試験器で3分以内の崩壊性が認められた (Table 7)。

考 察

今回、漢方エキスを主薬とする処方の崩壊性に優れた錠剤の製造条件を検討するため、芍薬甘草湯エキスを主薬とするモデル処方を用いて実験を行った。錠剤の製法として、直打法を検討したところ、エキスの吸湿性の高さから打錠障害が発生し、製錠は困難であった。エキスを高含量配合する処方の直打法による製錠は困難であると考えられる。このため、流動層造粒機を用い、打錠用顆粒の造粒を行った。その結果、流動化剤を3%、崩壊剤クロスボビドンを5%配合し、結合剤を使用せず、水で間欠噴霧することにより、崩壊性に優れた打錠用顆粒が得られた。この打錠用顆粒を用い、崩壊剤を15%後添加して打錠することによって、打錠性及び崩壊性に優れた錠剤の製錠が可能であった。さらに、崩壊剤の種類を変えて比較した結果、クロスボビドンを配合した処方の崩壊性が最も優れていることが確認された。クロスボビドンは膨潤・崩壊作用に優れた崩

壊剤であり²⁾、少量の水を吸収し、膨潤して崩壊することで錠剤内部にも毛細管現象により水が浸入し、崩壊が進んでいくと考えられる。しかしながら、配合する崩壊剤の量が多いため、製剤の安定性については今後の課題である。

今回の実験結果をもとに、芍薬甘草湯エキスを配合する、服用しやすい製剤の開発に向け、検討していく予定である。

文 献

- 1) 並木 徳之, 「脳卒中慢性期管理における嚥下障害とOD錠の意義—薬剤師の立場から」, NIKKEI Drug Information, 4, 43-45 (2010)
- 2) 勝野 貴臣, 岸 潤一郎「クロスボビドン (Kolidon CL グレード) の物理化学的特性と口腔内崩壊錠への応用」, 製剤機械技術学会誌, 21(4), 435-440 (2012)

ペーパーポットを用いたトウキの栽培試験

田村 隆幸, 高田 正明, 大江 勇

Studies on cultivation method of *Angelica acutiloba* Kitagawa using paper pot

Takayuki TAMURA, Masaaki TAKATA, Isamu OE

要 約

近年、当センターにおいて従来の圃場での育苗法では虫害や干害によって必要な苗が確保できない年が続いた。そこで、生存率が高く、かつ効率的なトウキの育苗法を確立することを目的に、ペーパーポットを用いた育苗法を検討した。8月に播種し、追肥を行わずに育苗した結果、発芽後の防虫ネット被覆で虫害を防ぐことにより、生存率は99%であった。翌年の定植時には目的の太さには生育していなかったものの、定植後の生育は良好で、総合的な収量では慣行法での苗を上回り、エキス含量でも日本薬局方の規格に適合したことから、有用な育苗法として期待できる。

Summary

By the current seedling raising method for *Angelica acutiloba* Kitagawa, a required number of seedlings were not provided according to an insect damage and a drought in recent years. Therefore, for the purpose of establishing the new efficient seedling raising method, usefulness of paper pot was examined. Sowing is carried out in August, and the seedlings were raised without additional fertilizer. As a result, survival rate of the seedlings was 99%, the examination seedling exceeded the habitual method in the yield whose trial calculation was made synthetically. And the extract content also suited the standard of The Japanese Pharmacopoeia (Sixteenth Edition).

These results indicate the possibility that the seedling raising method using paper pot is useful.

キーワード：トウキ, 育苗, ペーパーポット

Key words: Japanese Angelica Root, Seedling raising, Paper pot

生薬「当帰(トウキ)」は、第16改正日本薬局方¹⁾(以下、「日局16」という。)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、貧血、冷え症などの婦人科疾患に用いられる漢方処方をはじめとして、強壯、鎮静、鎮痛等の作用を期待して多くの処方に配合される。日本で使用される当帰は、かつては全てが国産であったが、平成22年度の使用量調査²⁾では約674トンの年間使用量のうち約76%が中国からの輸入品となっている。自給率の向上のため、国内栽培の拡大が求められているが、中国産の価格に対抗するには、現在の栽培法の効率化、省力化が必要である。

原植物であるトウキ *A. acutiloba* の栽培は、通例、播種して1年間生育させた苗を春に移植し、その年の秋に根を収穫する。富山県薬用植物指導センターでは、栽培農家が1年で生産できるよう、栽培振興の一環として1年生苗の供給を行ってきた。数年前までは、従来の圃場での

育苗でもほとんど枯死することなく、栽培農家が必要とする苗数が得られていた。

しかし、平成22, 23年度は、ネキリムシ(カブラヤガ等の幼虫)による食害と、夏期の雨不足による干害が原因で、播種面積の70%以上の苗が枯死することが続いた。圃場での育苗には、虫害及び干害に関する次の課題があり、根本的な育苗方法の改善が必要である。

- ①害虫の発生は年と場所によって変動が大きく、干害の発生も予測困難であるため、被害により苗の生存率が低くなった場合を想定して育苗面積を拡大せざるを得ない。
- ②生存率の低い方法での育苗面積の拡大は、除草等の管理労力、散水、種子の浪費、圃場の有効活用面でデメリットが大きい。
- ③圃場での殺虫剤の明確な効果が得られていない。
- ④干害に対して寒冷紗での日除けは効果的であったが、育苗面積が広いと費用対効果が低い。

⑤同一圃場内でも苗の生育が不均一になるため、規格（太さ：5～8 mm）※に合う苗を選別する必要がある。また、生育に及ぼす変動要因が多く、再現性が得られにくい。

そこで、野菜等の育苗に用いられるペーパーポット（特殊加工された紙製の移植用集合鉢）を用いて、上記の全ての課題を解決し得るトウキの育苗法を確立することを目的とし、栽培試験を行った。

ペーパーポットは、円筒状の多数の紙鉢が相互に水溶性の糊で接着されており、用土を充填し、播種、育苗した後、移植時には一本の紙鉢に分離し、紙鉢ごと定植できる。これらの利点により、上記の課題解決が期待される（表1）。

表1 ペーパーポットの利点と解決可能な圃場育苗での課題

ペーパーポットの利点	解決可能な課題
害虫のいない用土を使用	①, ③, ⑤
省スペースで、散水、除草が効率的	①, ②, ③, ④
苗1本当たりの用土が一定で養分制御が容易であり、苗の大きさが揃うため、定植前の苗の選別が不要。圃場より再現性が高い。	⑤

※苗の規格については、10 mm 以上の太い苗を植付けると花茎が上がった後、枯れて根が生薬として利用できなくなることから、一般に花茎が上がりにくい太さとして、「5～8 mm」を定植用の苗の規格としている。

実験方法

1. 材料

(1)種子

富山県薬用植物指導センターにおいて平成23年8月に採種したトウキ *A. acutiloba* 種子

(2)ペーパーポット

日本甜茶製糖(株)製の規格「ソー-1」

口径1.9 cm, 高さ13 cm

(3)用土

(株)わかば製, たねまき培土

pH: 6.5, N 150mg, P 400mg, K 100mg (1 L 当たり)

2. 播種・育苗

平成24年6月29日及び8月1日、ペーパーポットに用土を充填し、各紙鉢に3粒ずつ播種し、薄く覆土した。当センターの育苗ガラスハウス内に置き、自動散水下（ミスト散水、1日2回（8時、17時）、各15分間）で育苗した。8月1日に播種したものについては、発芽後、防虫ネットを被覆した。発芽から約1ヶ月後には、各紙鉢に苗が1本になるよう間引きした。12月には屋外に移動し、翌年

の圃場への定植まで放置した。定植までの間、追肥は施さなかった。

3. 定植・管理

(1)基肥（10 a 当たり）

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

(2)整畦

畦幅90 cm, 畦高20 cm, 白マルチ被覆

(3)定植

平成25年4月12日、株間25 cm, 条間40 cmのチドリ植えて、各植え穴に紙鉢を1本ずつ、根の先端を中央部に向けて斜めに定植した。

(4)追肥（10 a 当たり）

6月に油粕50 kg, 過磷酸石灰20 kg, 化成肥料（N:P:K=15:15:15）30 kgを、8月に化成肥料（N:P:K=15:15:15）20 kgを施した。

4. 調査

平成25年4月12日、定植前の苗の生存数、根の太さを調査した。定植後の9月23日には一部を掘り上げて根の生育を調査した。残りの株は11月25日に収穫し、軽く土を払い落してハサ掛け乾燥し、2月14日に湯通しを行い、仕上げ乾燥した後、重量を測定した。

5. エキス含量、乾燥減量の測定

平成25年9月23日に掘り取り調査した5株、及び11月25日に収穫した株から選んだ平均的な生育の3株について、1株ごとに粉末にして試料とした。測定は、第16改正日本薬局方生薬試験法に準じて実施した。

結果

1. 苗の生育

(1)平成24年6月29日播種の苗

7月23日から発芽が始まり、8月6日にはほぼ全ての紙鉢で発芽が確認できた（図1）。8月13日、葉が地際で切断される被害が発生したため、被害箇所付近の用土を掘ったところ、ネキリムシ類（カブラヤガ等の幼虫）が見つかった（図2）。その後、頻繁に害虫を捕獲するものの、日中は用土の中に潜っているため完全には捕獲できず、被害は止まらなかった。ほぼ全ての苗が被害を受けたため、この6月29日播種の育苗は中止した。

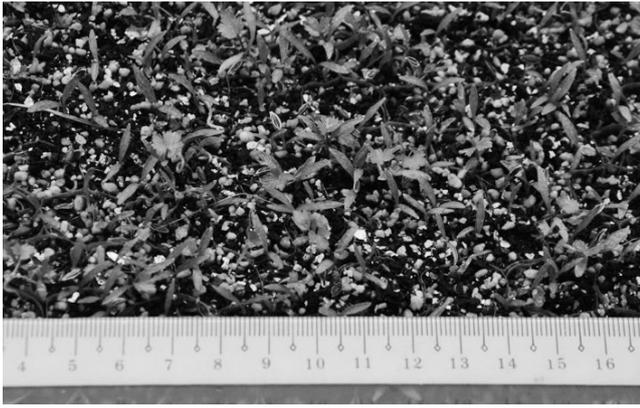


図1 ペーパーポットで発芽したトウキ
(播種：平成24年6月29日，撮影：8月6日)



図2 トウキを食害したネキリムシ類
(カブラヤガ等の幼虫)

(2)平成24年8月1日播種の苗

8月23日から発芽が始まり，9月3日にはほぼ全ての紙鉢で発芽が確認できた。6月29日播種の苗で虫害が発生したため，発芽後に防虫ネットを被覆したところ，虫害は見られず，11月には図3のように生育した。

圃場に定植する平成25年4月12日における生存率は99%であった(1400鉢のうち1381本が生存)。根頭部の太さは2.3 mm，根の長さは12.8 cmであった(いずれも $n = 30$)。

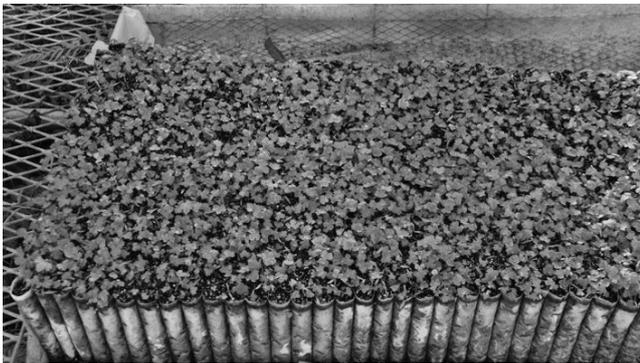


図3 ペーパーポットで育苗したトウキ
(播種：平成24年8月1日，撮影：11月25日)

2. 定植後の生育

280本のペーパーポット苗を1本ずつ定植し，次の調査を実施した。

(1)中間調査

平成25年9月23日の調査では，草丈は，32.4 cmであった($n = 30$)。同日，地上部の生育が標準的な5株を選び，掘り取った。葉及び葉柄の基部を切り取り，根の重量を測定した結果，乾燥前で107.0 g，乾燥後で25.5 g，歩留まり23.8%であった($n = 5$)。なお，このときの乾燥は，実際に生薬に調製する方法とは異なり，掘り取った直後に水洗し，日陰で自然乾燥とした。調査時の生育状況を図4に，水洗直後の地下部の様子を図5に示す。



図4 定植後の生育状況
(定植：平成25年4月12日，撮影：9月23日)



図5 根の生育状況
(定植：平成25年4月12日，撮影：9月23日)

考 察

(2) 収量調査

定植した280本の苗のうち、畦の両端の各5mの合計80株については、調査対象外とした。差し引いた200株のうち、収穫までに抽苔した株は7株(抽苔率4.0%)で、その他の原因で枯死した9株を合計すると、16株が収穫不可であった。中間調査の5株を差し引くと、195株のうち、179株が収穫可能で、生存率は91.8%であった。

平成25年11月25日に収穫した株を、生薬に調製し(図6)、平成26年3月7日に重量を測定したところ、1株当たりの平均は52.5gであった(n=179)。

ペーパーポットで育苗し、栽培した収量性について、10aでの栽培(5,000株)に換算し、慣行法(圃場で播種、育苗)と比較した結果を表2に示す。

3. エキス含量及び乾燥減量

(1) エキス含量

中間調査(9月)で得た株では平均42.2%(n=5)、収穫(11月)で得た株では平均46.8%(n=3)であった。測定した全ての株が、日局16の規格値である35.0%以上に適合した。

(2) 乾燥減量

中間調査(9月)で得た株では平均9.7%(n=5)、収穫(11月)で得た株では平均7.2%(n=3)であった。



図6 ペーパーポット苗による生薬トウキ

ペーパーポットを用いてトウキの育苗を検討したところ、平成24年6月に播種したものについては虫害によりほとんどの苗が枯死したが、発芽後に防虫ネットを被覆した同年8月播種の苗では被害が見られなかった。これは、害虫が混入していない土壌を用いていたことから、発芽後に成虫が卵を産み付けに来て、虫害が発生したと考えられる。使用できる登録農薬がない現状では、防虫ネットを被覆することが有効な手段であることが確認できた。

平成24年8月に播種し、追肥せずに育苗したペーパーポット苗は、翌年4月の定植時には、根頭部の太さが2.3mmであり、慣行法の定植用苗の5~8mmと比較すると半分以下の細い苗であった。8月に播種する場合には、今後、追肥の検討が必要であると考えられる。ペーパーポット苗の定植後の生育については、慣行法の苗と比較して、5~8月の地上部では劣っていたが、9月頃になるとほとんど差がなくなった。この苗から得られた生薬の重量を慣行法の苗と比較すると、1株当たりの重量は約9割であるが、生存率が1.6倍であったことから、10a当たりの収量に換算すると、約1.4倍となり、総合的に上回った。この要因としては、慣行法の苗では苗床から一度掘り起こして選別し、定植まで仮植え状態で土中に保存するのに対し、ペーパーポットでは根に土が付いた紙鉢ごと植えられるために、根の損傷がほとんどなく、その後の生育が順調であったことが推察される。

生薬のエキス含量については、ペーパーポットで育苗し、定植後の9月の中間調査及び11月の収穫で得られた全ての調査株で、日局16の規格(35.0%以上)に適合したことから、品質面においても、ペーパーポット育苗は有効であると考えられる。

以上のことから、本育苗法は慣行法より生存率が高く、管理が効率的に実施できる優れた方法となり得る。また苗の定植機械が開発された場合にも、活着で有利なペーパーポット苗が栽培の拡大に寄与するものと考えられる。

表2 ペーパーポット育苗法及び慣行法の収量性の比較

育苗法	苗の太さ (根頭部)	試験対象 株数	抽苔率 (抽苔による 収穫不可率)	収穫 株数	収穫 可能率	生薬の収量	
						1株 当たり	10a換算 (収穫可能率を 考慮)
慣行法 (圃場播種)	5~8mm	180株	8.6%	110株	61.1%	58.2g	177.8kg
ペーパーポット	平均 2.3mm	200株	4.0%	179株	91.8%	52.5g	241.0kg

ま と め

本研究では、従来の圃場でのトウキ育苗における生存率低下や非効率的な部分を改良し、新たな育苗法を確立することを目的として、ペーパーポットを用いた方法を検討した。その結果、発芽後には防虫ネットの被覆が必要であること、8月播種で追肥を行わないと、翌年の定植時には目的の太さに生育しないことが明らかとなった。小さい苗であったものの、定植後の生育は良好で、総合的な収量では慣行法での苗を上回り、エキス含量でも日局16の規格に適合したことから、有用な育苗法として期待できる。

謝 辞

本研究の着手に際し、ペーパーポット育苗に関するご助言をいただきました独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部、研究サプリーダー菱田敦之先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省；第16改正日本薬局方，1554-1555（2011）
- 2) 日本漢方生薬製剤協会，原料生薬使用量等調査報告書—平成21年度および平成22年度の使用量—（2013）

V 資 料

「平成25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 2013

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24年で全国第3位（6,083億円）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。

平成21～24年度においては、定量試験、溶出試験及び確認試験など様々な試験項目について実施してきた¹⁾。平成25年度においては、過去より実施している試験項目のほかに、新たにpH及び水分の試験項目を追加して実施し、結果解析、原因調査及び改善指導を実施したので、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(+)-アスコルビン酸及び炭酸水素ナトリウムのpH試験、クエン酸一水和物の水分試験、スルファピリジンの融点試験、アセタゾラミドの定量試験、日局トラネキサム酸錠の定量試験及び質量偏差試験、USPプレドニゾン錠の溶出試験とした（下表参照）。なお、pH、水分、融点、定量（紫外可視吸光度測定法）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。

試験方法については、製剤定量試験で試料溶液調製方法の変更やカラム長さの指定をなくすなど、若干の変更は行ったが、基本的には日局に準じた方法とした。溶出試験については、USPキャリブレーター（プレドニゾン錠）の試験方法に準じた方法とした。

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	L(+)-アスコルビン酸	pH計	29
	pH	炭酸水素ナトリウム	pH計	29
	水分	クエン酸一水和物	水分計（容量滴定法）	23
	融点	スルファピリジン	融点測定装置	27
	定量 （紫外可視吸光度測定法）	アセタゾラミド	分光光度計、乾燥機	29
製剤試験	定量(HPLC)、質量偏差試験	日局トラネキサム酸錠	HPLC、乾燥機、pH計	30
	溶出試験	USPプレドニゾン錠	溶出試験器、分光光度計	13

(2) スケジュール

平成25年7月29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9月6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、12月10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。

(3) 評価方法

1) 溶出試験以外の試験項目の評価方法

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

2) 溶出試験の評価方法

USP キャリブレーター (プレドニゾン錠, ロット Q1L136) の基準で評価した。

(4) 評価結果に基づく対応

不適合 (| Z | > 3) または USP 基準不適合) の業者に対しては、原因調査 (アンケートまたは聞き取り調査) 及び改善指導を実施するとともに、再試験を依頼した。また、「2 < | Z | ≤ 3」の業者に対しても、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適合の業者及び再試験を希望した「2 < | Z | ≤ 3」の業者から、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(+)-アスコルビン酸の pH 試験

試験検査能力の把握及び技術指導のために、報告された pH 値を用いて Z スコアを算出したところ、29社のうち、| Z | > 3 が 3 社、2 < | Z | ≤ 3 が 3 社であった。また、5 社が再試験を実施したところ、4 社は | Z | ≤ 2 であった。(図 1~3 参照)

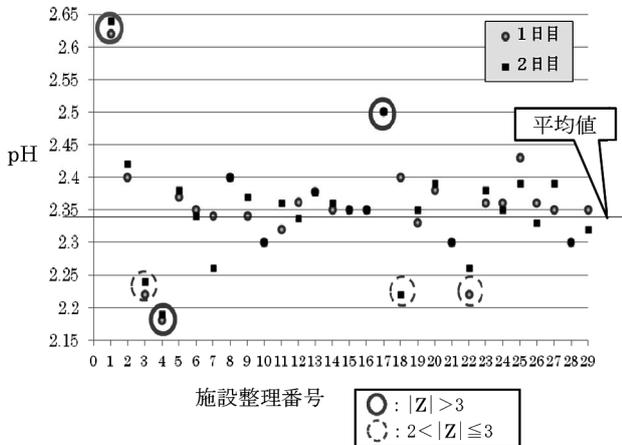


図 1: L(+)-アスコルビン酸の pH 試験の報告値

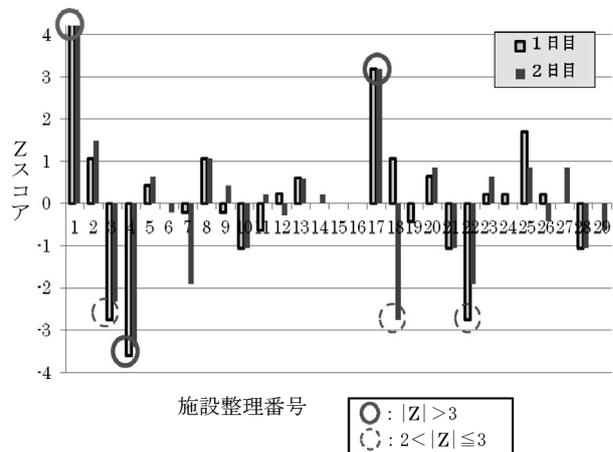


図 2: L(+)-アスコルビン酸の pH 試験の Z スコア

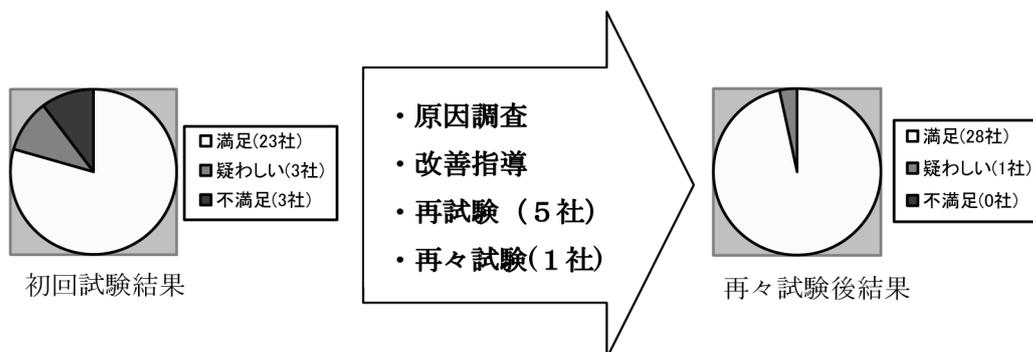


図 3: L(+)-アスコルビン酸の pH 試験の評価結果

再試験を実施しても $|Z| > 2$ であった1社に対しては、実地に原因調査及び指導を行ったところ、再々試験で $|Z| \leq 2$ となり、また試験機器の経時的な安定性に問題があることが分かった（同一試料を測定しても1時間でpH2.32がpH2.26にずれる）。

$|Z| > 2$ のものについては、試験機器（電極を含む）の状態が試験結果に影響した可能性があるため、使用前点検項目など管理方法を見直すことが必要と考えられた。また、pH標準液による校正を適切に実施するために、試験者の基本的な操作（例えばpH標準液と試料溶液の温度差は $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内にするなど）についても、問題点がないか確認することが重要であると考えられた。

(2) 炭酸水素ナトリウムの pH 試験

(1)と同様にZスコアを算出したところ、29社のうち、 $|Z| > 3$ はなかったが、 $2 < |Z| \leq 3$ が1社であった。その1社が再試験を実施したところ、 $|Z| \leq 2$ であった。（図4～6参照）

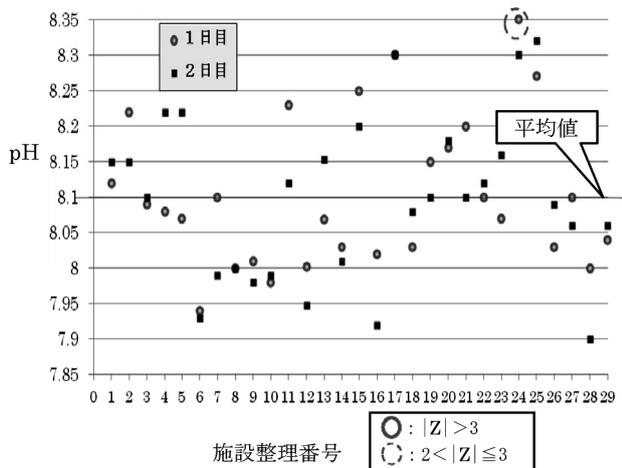


図4：炭酸水素ナトリウムの pH 試験の報告値

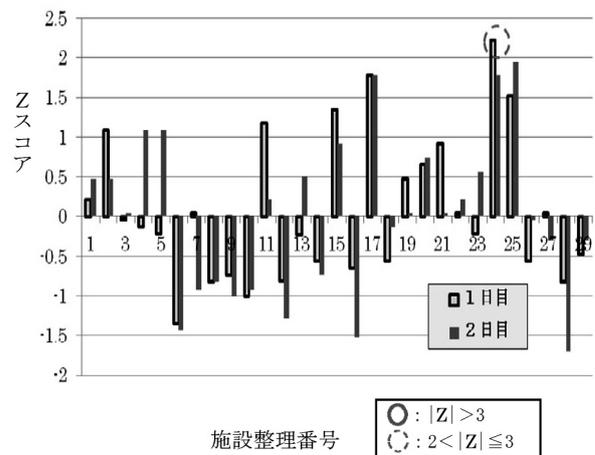


図5：炭酸水素ナトリウムの pH 試験のZスコア

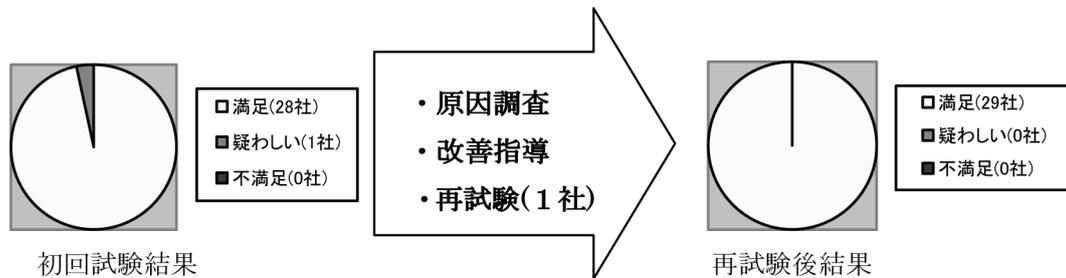


図6：炭酸水素ナトリウムの pH 試験の評価結果

(3) クエン酸一水和物の水分試験

23社のうち、 $|Z| > 3$ が3社、 $2 < |Z| \leq 3$ が2社であった。また、4社が再試験を実施したところ、全て $|Z| \leq 2$ であった。（図7～9参照）

水分値が高いものについては、試験室内の湿度が高かったことが試験結果に影響した可能性があるため、試験実施時に湿度を測定して管理することが必要と考えられた。また、空気中の水分の混入を防止するために、試験者の基本的な操作についても問題点がないか確認することが重要と考えられた。

(4) スルファピリジンの融点試験

27社のうち、 $|Z| > 3$ が2社、 $2 < |Z| \leq 3$ が2社であった。また、4社が再試験を実施したところ、3社が $|Z| \leq 2$ であった。（図10～12参照）

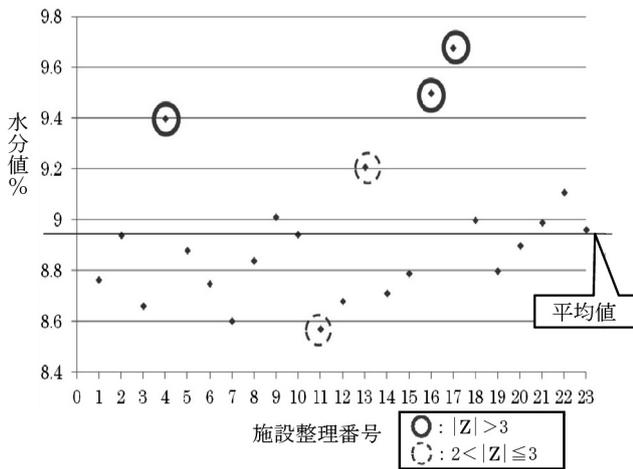


図 7：クエン酸一水和物の水分試験の報告値

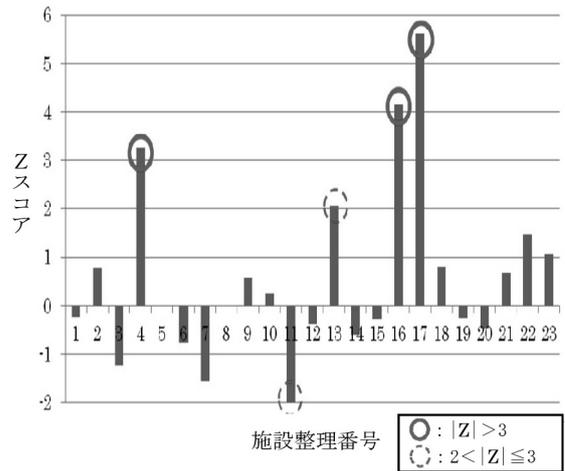


図 8：クエン酸一水和物の水分試験のZスコア

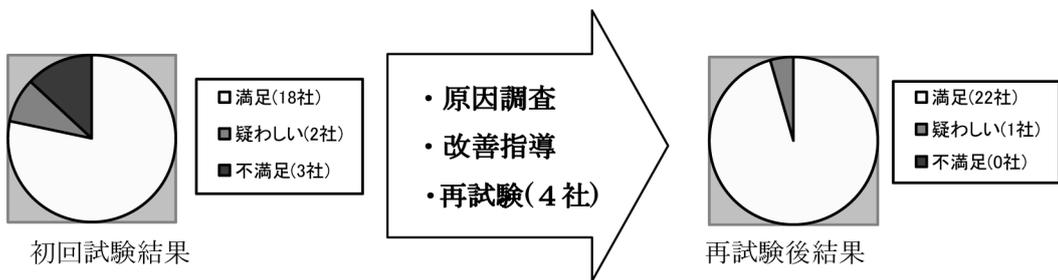


図 9：クエン酸一水和物の水分試験の評価結果

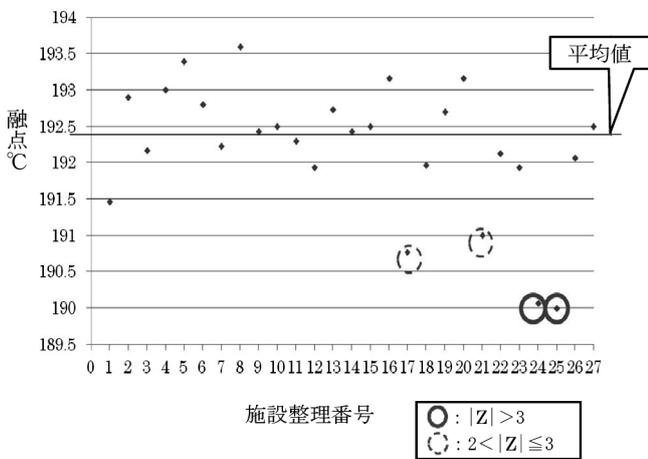


図 10：スルファピリジンの融点試験の報告値

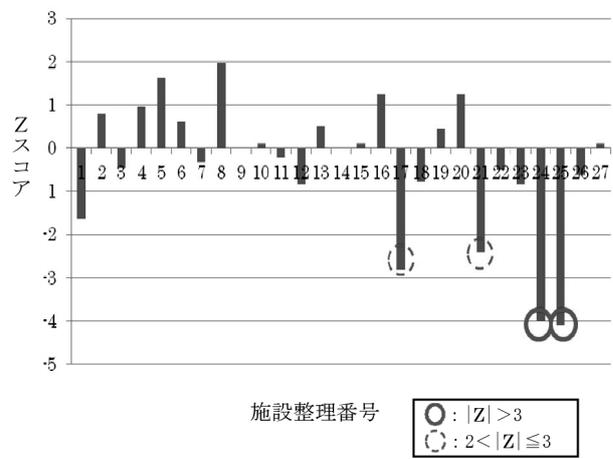


図 11：スルファピリジンの融点試験のZスコア

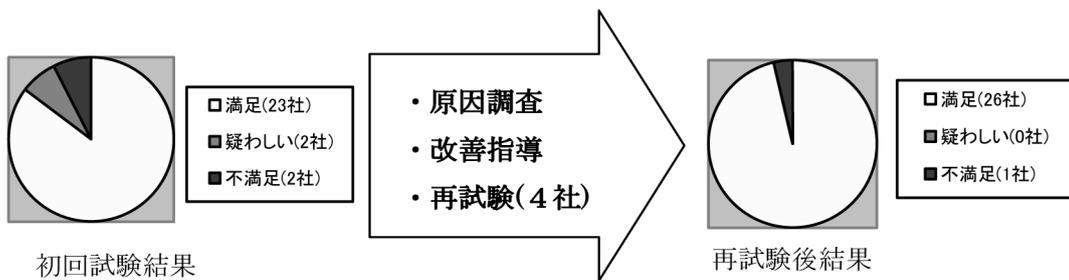


図 12：スルファピリジンの融点試験の評価結果

融点の低いものについては、試料の事前乾燥の有無や昇温速度が試験結果に影響していた可能性があるため、日局の内容を再確認するとともに、日局融点測定用標準品を用いて装置の適格性を確認することが重要と考えられた。

(5) アセタゾラミドの定量試験（紫外可視吸光度測定法）

29社のうち、 $|Z| > 3$ が2社、 $2 < |Z| \leq 3$ が2社であった。また、3社が再試験を実施したところ、全て $|Z| \leq 2$ であった。（図13～15参照）

$|Z| > 2$ のものについては、妨害物質の混入や抽出不足などが試験結果に影響した可能性があるため、使用前に器具を精製水でリンスするなどして混入を防止し、溶解状態確認や超音波処理を適切に実施することが重要であると考えられた。

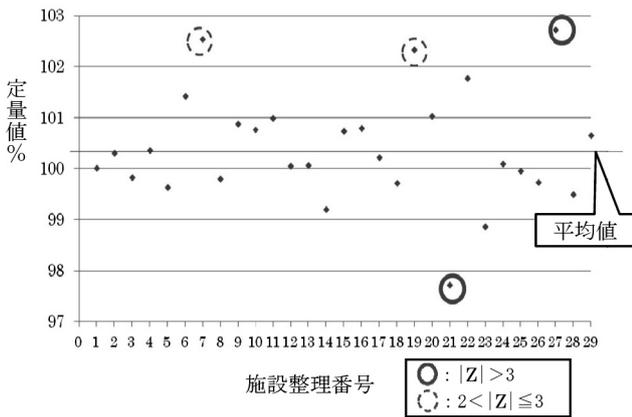


図13：アセタゾラミドの定量試験の報告値

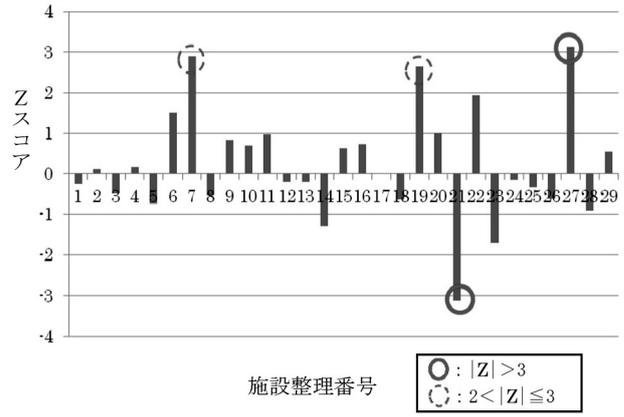


図14：アセタゾラミドの定量試験のZスコア

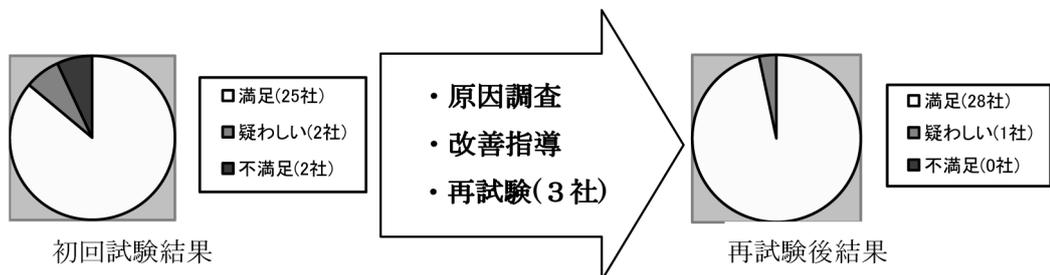


図15：アセタゾラミドの定量試験の評価結果

(6) 日局トランネキサム酸錠の定量試験(HPLC)及び質量偏差試験

定量試験については、30社のうち、 $|Z| > 3$ はなかったが、 $2 < |Z| \leq 3$ が4社であった。1社が再試験を実施したが、 $|Z| \leq 2$ とはならなかった。（図16～18参照）

含量値の低いものは錠剤の粉碎不足や抽出が不十分であったことなどが、含量値の高いものは標準溶液の調製にミスがあったことなどが、試験結果に影響した可能性があるため、試験者の習熟度が低い場合にはサポートする体制を設けるなどして、これらの操作を適切に行う必要があると考えられた。

システム適合性（システムが試験実施に適切な性能で稼働していることを確かめる目的で日局に規定されている試験）についてはほぼ全社が適合しており、隣接する類縁物質のピークとの分離も良好であった。

質量偏差試験については、全社の判定値が日局に適合しており、特に問題は見られなかった。

(7) USP プレドニゾン錠の溶出性

13社（自動サンプリング4社、手動サンプリング9社）のうち、幾何平均で1社（手動サンプリング）が不適合、変動係数で別の1社（自動サンプリング）が不適合であった。また、その2社が再試験を実施したところ、適合であった。（図19～21参照）

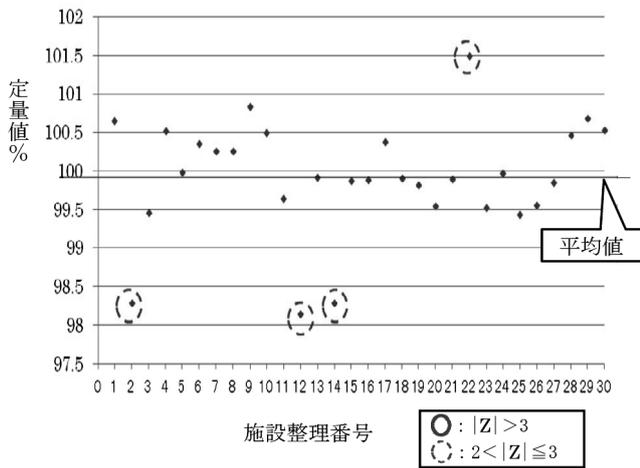


図16：日局トラネキサム酸錠の定量試験の報告値

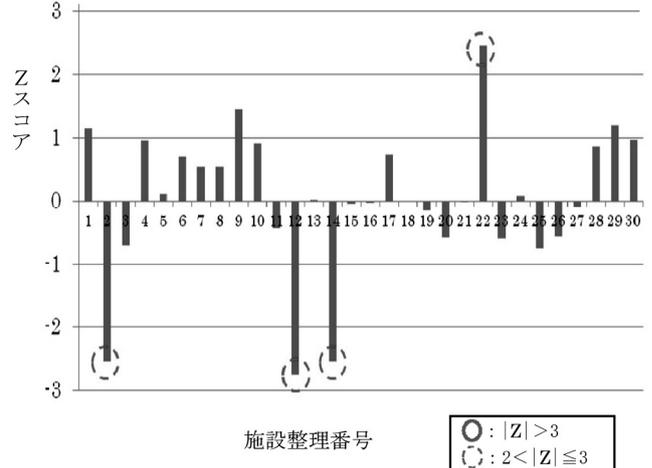


図17：日局トラネキサム酸錠の定量試験のZスコア

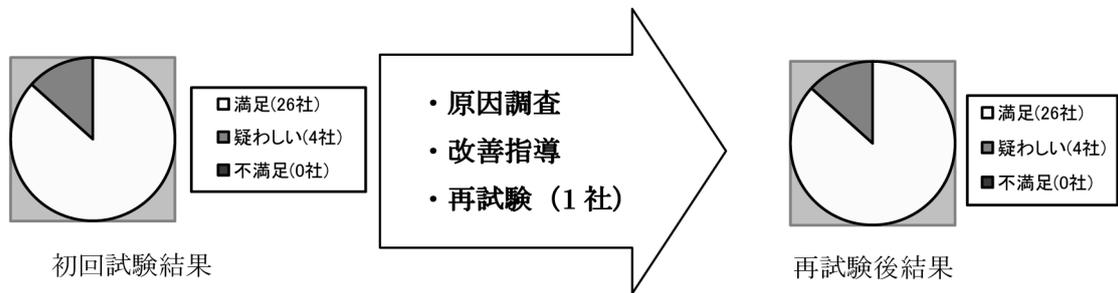


図18：日局トラネキサム酸錠の定量試験の評価結果

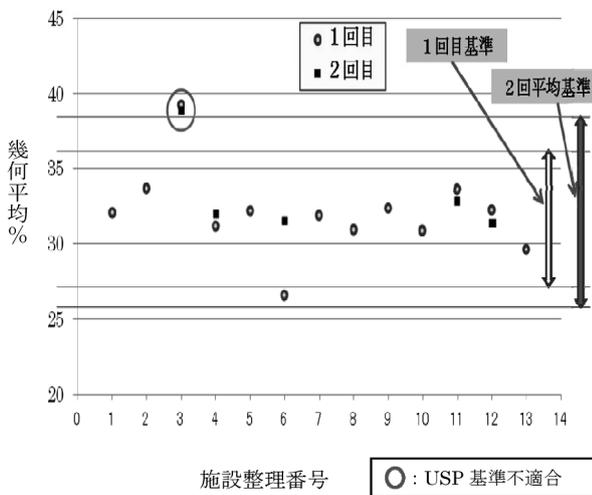


図19：USP プレドニゾン錠の溶出試験の幾何平均

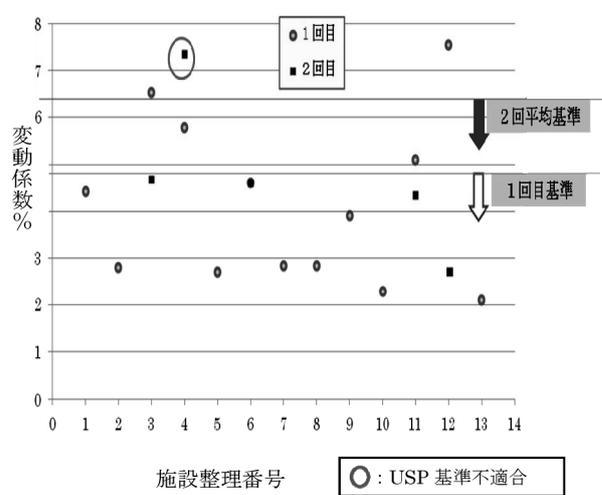


図20：USP プレドニゾン錠の溶出試験の変動係数

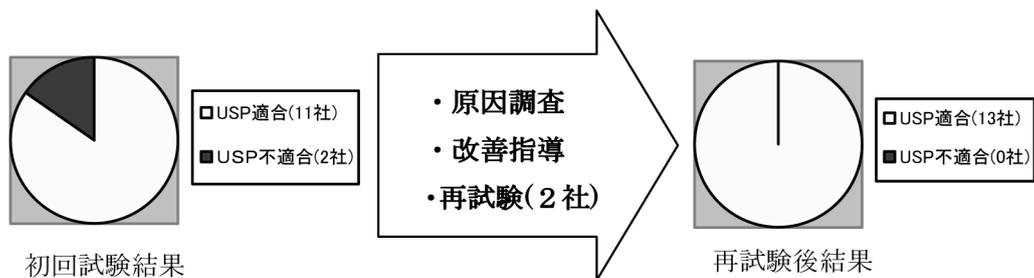


図21：USP プレドニゾン錠の溶出試験の評価結果

自動サンプリングの場合は流路汚染が、手動サンプリングの場合は操作ばらつきなどが試験結果に影響した可能性があるため、装置の洗浄やメンテナンス、及び試験者の操作について問題がないか再確認することが重要と考えられた。

3. まとめ

全体としては93.3%が適合 ($|Z| \leq 3$ または USP 適合) であり、前年度 (94.4%) とほぼ同程度の割合であった。また、今年度新たに追加した試験項目である「pH (L(+)-アスコルビン酸)」及び「水分」については、単純な試験操作であるにもかかわらず、 $|Z| > 3$ が 1 割以上を占めており、 $2 < |Z| \leq 3$ も 1 割程度を占めていた。pH 測定においては 4 以下という pH 領域であったことが、水分測定においては湿度が高い時期であったことが、影響していた可能性が考えられる。

しかし、不適合 ($|Z| > 3$ または USP 不適合) の企業は全社が再試験を実施し、さらに $2 < |Z| \leq 3$ の企業も半数以上 (57%) 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良好な結果 ($|Z| \leq 2$ または USP 適合) 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る。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

VI 誌上・学会発表など

1. 原著の抄録

家庭薬研究 32, 19-27 (2014)

HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 6 報) — 生薬成分について —

野本 有沙, 堀井 周文, 田中 啓介, 古寺 篤子, 福田 大輔, 堀 祐輔,
横田 明佳, 永井 喜美, 中山 恵理, 関本 直也, 横田 洋一

センソ配合製剤である六神丸のブフォステロイドの定量及びサンシュユの日本薬局方のロガニンの定量の分析時間の短縮化について, HPLC 法に使用する ODS カラムを粒径 5 μm , 内径 4.6mm, 長さ 150mm から粒径 3 μm , 内径 4.6mm, 長さ 75mm に変更することにより検討した. その結果, 前者においては Cadenza CD-C18 (Imtakt) により, 3 種のブフォステロイドおよびジンコウ由来のピークが良好に分離し, 分析時間もほぼ 50% 短縮できた. 後者においては, CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (資生堂), YMC-PACK ODS-A (YMC), L-Column 2 ODS (CERI) が良好な結果を示し, 分析時間も 30% ~ 50% に短縮が可能であった.

家庭薬研究 32, 28-33 (2014)

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析の効率化について — アルカリ性移動相を用いた分析法におけるカラム耐久性調査及び 内標準物質に色素を用いた多波長同時分析 —

佐々木 綾子, 野坂 宜宏, 関 友香里, 村井 拓朗, 種 絵梨子, 竹脇 奈々子,
山本 豊巖, 榊原 唯志, 蛭谷 早紀子, 上野 英志, 横田 洋一

1. 昨年度, 塩基性物質である鼻炎用医薬品の HPLC 分析の効率化を図るため, 従来のイオンペア法に替え, 耐アルカリ性カラムを用いたアルカリ性移動相による分析法を作成したが, その耐久性に若干の課題が残った. そこで今回, 3 種の市販の耐アルカリ性カラムを用い, アルカリ性移動相条件で 300 回の標準溶液の注入を行うことで, 耐久性を検証したところ, Triart C18 (YMC) において, 良好な結果が得られた.

2. 内標準法による紫外域での HPLC 分析では, 全成分の溶出後に内標準物質を設定することが多く, このため分析時間が長時間となる場合が多い. そこで, 可視域で吸収のある色素などを内標準物質として使用できれば, 紫外域での妨害物質等が存在する位置においても, 可視域では内標準物質を設定でき, 分析時間の短縮につながると考えた. そこで鼻炎用点鼻薬の HPLC 分析において, 青色 1 号を内標準物質として用い, フォトダイオードアレイ検出器で, 紫外域及び可視域の同時分析を行うこととした. 被検成分の直線性や回収率について検討したところ, 良好な結果が得られ, 本法の実用性が示唆された.

水系基剤を用いた腸溶性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

水上 一也, 寄木 優作, 杉窪 克哉, 無江 邦充, 布目 基倫, 川岸 貴博, 堀内 始, 野口 博和,
藤村 友明, 霜鳥 武司, 斉藤 充広, 成島 遼太, 藤岡 準平, 南 敬照, 中齋 浩文, 池田 久尚,
明官 勇雄, 永井 秀昌

水系の基剤を用いた腸溶性フィルムコーティング方法を確立することを目的として、水系の腸溶性コーティング基剤であるヒプロメロース酢酸エステルコハク酸エステル (HPMCAS) 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。

その結果、アセチルサリチル酸錠に対する腸溶性フィルムコーティングでは、①HPMCAS 溶液濃度を7%とし、②錠剤に対して HPMCAS を5%以上コーティングする条件で、③錠剤径の違いに影響されない最も効率の良いコーティングが行えることを確認した。特に、HPMCAS のコーティングにおいては、その懸濁液が熱に不安定なことから、溶液濃度を低くし、排気温度を低く保ちながらコーティングすることが重要であると考えられる。

ファインセラミックスジルコニア (YSZ) 打錠臼の開発

黒川 正博, 山岸 英樹, 永井 秀昌, 真田 和昭, 江藤 敬太郎

従来の打錠臼に使用されている材料は、SKD11に代表されるダイス鋼材や超硬材などの金属が使用されている。しかしながら、杵の上下摺動により臼内表面のクロムメッキは、打錠を重ねることで表面が傷つき、酸性や塩基性製剤等によって腐食され易く、錆を発生するなどの問題が生じている。そこで、今回新たに開発したファインセラミックジルコニア (YSZ) 打錠臼について、その性能を検証した。杵の耐久性を検証するため、摩耗性の高いセンナ顆粒を用いて生産機で62,145ショットし、ダイス鋼臼 (SKD11+HCr) 及びジルコニア臼の耐久性評価を行った。その結果、ジルコニア臼はダイス鋼臼に比べて表面粗さの変化量は小さく、4倍以上の耐久性があることが明らかとなった。また、打錠後の錠剤の物性を評価した結果では、両者の間で得られた錠剤の規格に差は認められず、従来の打錠臼と同品質の錠剤の製造が可能であると考えられる。

2. 講演・学会発表

「Isoliquiritigenin and glycyrrhizin inhibit the inflammasome activation in a different manner.」

Honda H., Nagai Y., and Takatsu K.

The 100th Annual Meeting of The American Association of Immunologists (第100回アメリカ免疫学会), 2013, 5, 5, Honolulu.

「Regulatory mechanisms of Radioprotective 105/MD-1 expression in inflammatory macrophages in the adipose tissue.」

Watanabe Y., Nagai Y., and Takatsu K.

「第78回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 第21回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 合同学術集会, 2013, 5, 20, Tokyo.

「腸管免疫における IL-5 産生 ILC2 の役割の解明」

生谷 尚士, 柳橋 努, 長井 良憲, 高津 聖志

第34回日本炎症・再生医学会, 2013, 7, 2-3, 京都.

「メタボリック症候群における慢性炎症を制御する自然免疫シグナルの解析」

長井 良憲, 渡邊 康春, 本田 裕恵, 戸邊 一之, 高津 聖志

第34回日本肥満学会, 2013, 10, 11, 東京.

「自然免疫受容体 TLR4/MD-2 複合体の新規リガンド創製を目指したイソプレノイド脂質の構造解析と合成研究」

溝手 啓介, 佐伯 昭典, 本田 裕恵, 岡本 直樹, 木村 隆仁, 長井 良憲, 高津 聖志, 藤本 ゆかり, 深瀬 浩一
日本化学会秋季事業 第3回CSJ化学フェスタ2013, 2013, 10, 21, 東京.

「副腎白質ジストロフィー: レンチウイルスベクターを用いた ABCD1 遺伝子発現と骨髄移植」

松本 隼, 守田 雅志, 渡邊 康春, 長井 良憲, 小林 博司, 高津 聖志, 今中 常雄.

平成25年度日本薬学会北陸支部第125回例会, 2013, 11, 17, 石川.

「甘草成分はTLR4及びNLRP3インフラマソーム活性化を阻害する」

本田裕恵, 長井良憲, 高村(赤司)祥子, 齋藤伸一郎, 三宅健介, 高津聖志.

第19回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2013, 12, 7, 滋賀.

「The roles of IL-5 producing ILC2 in the intestinal immunity」

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

第42回日本免疫学会学術集会, 2013, 12, 11, 千葉.

「 β 3-adrenergic receptor-mediated lipolysis of adipocytes induces accumulation of large number of neutrophils and pro-inflammatory responses in mouse adipose tissue」

Watanabe Y., Nagai Y., Tsuneyama K., Takatsu K.

第42回日本免疫学会学術集会, 2013, 12, 13, 千葉.

「ワクチン用新規アジュバント開発のための基盤研究」

高津 聖志

第7回次世代アジュバント研究会, 2014, 1, 21, 豊中.

「粘膜アジュバント開発のための評価系の確立－自然抗体産生を指標としたアプローチ」

山崎 思乃, 宮本 朋美, 田部井 美樹, 柳橋 努, 本田 裕恵, 松永 孝之, 長井 良憲, 高津 聖志
第7回次世代アジュバント研究会, 2014, 1, 21, 豊中.

「HPLC法の分析時間短縮化に関する検討(第6報)－生薬成分について－」

野本 有沙, 堀井 周文, 田中 啓介, 古寺 篤子, 福田 大輔, 堀 祐輔, 横田 明佳, 永井 喜美, 中山 恵理,
関本 直也, 横田 洋一
第33回家庭薬開発シンポジウム, 2014, 2, 17, 富山市.

「高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析の効率化について」－アルカリ性移動相を用いた分析法におけるカラム耐久性調査及び内標準物質に色素を用いた多波長同時分析－

佐々木 綾子, 野坂 宜宏, 関友 香里, 村井 拓朗, 種 絵梨子, 竹脇 奈々子, 山本 豊巖, 榊原 唯志,
蛭谷 早紀子, 上野 英志, 横田 洋一
第33回家庭薬開発シンポジウム, 2014, 2, 17, 富山市.

「水系基剤を用いた腸溶性フィルムコーティング条件の検討」

水上 一也, 寄木 優作, 杉窪 克哉, 無江 邦充, 布目 基倫, 川岸 貴博, 堀内 始, 野口 博和, 藤村 友明,
霜鳥 武司, 斉藤 充広, 成島 遼太, 藤岡 準平, 南 敬照, 中齋 浩文, 池田 久尚, 明官 勇雄, 永井 秀昌
第33回家庭薬開発シンポジウム, 2014, 2, 17, 富山市.

「ファインセラミックスジルコニア(YSZ)打錠白の開発」

黒川 正博, 山岸 英樹, 永井 秀昌, 真田 和昭, 江藤 敬太郎
第33回家庭薬開発シンポジウム, 2014, 2, 17, 富山市.

3. 共同研究論文リスト

- Takatsu K.:** Chapter 5 Eosinophilopoiesis: Chapter 5.4 Interleukin-5 and its Receptor molecules, In “Eosinophil in Health and Disease” (Eds. J.J. Lee and H.F. Rosenberg), pp97–105, *ELSEVIER/Academic Press*, New York, 2013.
- Nagai Y., and **Takatsu K.:** Section2. Part E. 26. Role of the immune system in obesity-associated inflammation and insulin resistance. In Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity” (Ronald R. Watson), pp281–293, *ELSEVIER/Academic Press*, New York, 2014.
- 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.
- Nagai Y., Watanabe Y., and **Takatsu K.:** The TLR family protein RP105/MD-1 complex: a new player in obesity and adipose tissue inflammation. *Adipocyte*. 2 : 61-66, 2013.
- Watanabe Y., Nagai Y., and **Takatsu K.:** Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients*. 5(9) : 3757–3778, 2013.
- 長井 良憲, 渡邊 康春, 高津 聖志.: 自然免疫系受容体 RP105/MD-1 によるメタボリック症候群の制御. *内分泌・糖尿病・代謝内科*. 37(6) : 61–616, 2013.