

平成28年度富山県受託研究

和漢薬・バイオテクノロジー研究

研究成果報告書

国立大学法人

富 山 大 学

研究代表者 細 谷 健 一

目 次

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部副研究部長

まえがき

細 谷 健 一

I. テーラーメイド医療に資する抗体医薬・T細胞医薬 創出のための基盤技術の開発	1
I-1 T細胞ISAACの開発	3
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 教授 村 口 篤	
I-2 がん特異的T細胞検出システムの改良	7
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 助教 浜 名 洋	
I-3 T細胞抗原探索システムの開発	11
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸	
I-4 ウサギISAACを用いた抗体開発	13
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 助教 小 澤 龍 彦	
II. 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果と ペオニフロリン含有外用薬の開発	17
II-1 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害 改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験	19
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学) 応用薬理学 准教授 安 東 嗣 修	
II-2 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに 芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験	23
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 産婦人科学 教授 齋 藤 滋	

Ⅲ. 「富山県ブランド芍薬」の基盤・臨床研究	28
Ⅲ-1 富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の臨床効果に関する研究	30
富山大学・和漢医薬学総合研究所 漢方診断学分野	
教授 柴原直利	
Ⅲ-2 シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究	36
富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野	
教授 小松かつ子	

平成28年度

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部副研究部長 細谷 健一

まえがき

富山県からの受託研究「和漢薬・バイオテクノロジー」において、本年度は3つの研究課題に取り組みました。本報告書には、これら3つの研究課題に取り組んだ3研究班（村口研究班、安東研究班、柴原研究班）の平成28年度の研究成果が述べられています。

以下、その研究内容と研究者を紹介します。

村口研究班の研究テーマは、「テーラーメイド医療に資する抗体医薬・T細胞医薬創出のための基盤技術の開発」であり、本年度は、①T細胞ISAACの開発（村口篤氏）、②がん特異的T細胞検出システムの改良（浜名洋氏）、③T細胞抗原探索システムの開発（岸裕幸氏）、④ウサギISAACを用いた抗体開発（小澤龍彦氏）について、各氏の研究成果を報告しています。

安東研究班の研究テーマは、「芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果とペオニフロリン含有外用薬の開発」であり、本年度は、①動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験（安東嗣修氏）、②抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験（齋藤滋氏）について、各氏の研究成果を報告しています。

柴原研究班の研究テーマは、「『富山県ブランド芍薬』の基盤・臨床研究」であり、本年度は、①富山県産芍薬の品質評価にかかる臨床研究（柴原直利氏）、②シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究（小松かつ子氏）について、各氏の研究成果を紹介しています。

これらの成果が、現場において活かされるまでには時間が必要と考えられますが、これらの基礎的研究における大学の知の創造と蓄積の成果が、現場の方々に学問的立場からの示唆を与え、やがて応用されていくことを、長い目で見守りたいと思います。そして、このような幅広い和漢薬やバイオテクノロジーの研究成果が、広く県薬業界にも還元され、その活性化につながることを期待します。

最後になりましたが、本研究の実施にあたり、絶大なご支援を頂いた富山県関係機関に深く感謝申し上げます。

平成28年度受託研究課題

班	研究者	研究課題
I T細胞医薬創出のための基盤技術の開発・ T細胞医薬創出の医療に資する抗体医薬の開発	I-1 村口 篤	T細胞 ISAAC の開発
	I-2 浜名 洋	がん特異的 T 細胞検出システムの改良
	I-3 岸 裕 幸	T 細胞抗原探索システムの開発
	I-4 小澤 龍彦	ウサギ ISAAC を用いた抗体開発
II 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果とペオニフロリン含有外用薬の開発	II-1 安東 嗣 修	動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験
	II-2 齋藤 滋	抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験
III 「富山県ブランド芍薬」の基盤・ 臨床研究	III-1 柴原 直 利	富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の臨床効果に関する研究
	III-2 小松 かつ子	シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究

I. テーラーメイド医療に資する抗体医薬・ T細胞医薬創出のための基盤技術の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 教授 村口 篤

【背景・目的】

がんの治療法として、外科的手術、放射線治療、抗ガン剤治療などが一般的である。しかし、これらの治療に効果がみられない場合、免疫システムを用いた治療（ペプチドワクチン療法、抗体医薬、免疫細胞療法など）が試みられている。免疫システムは個々の患者により異なること、さらに、がんの性質も個々の患者で様々であることから、免疫学的治療は個々の患者に応じた治療、すなわち、テーラーメイド医療として行われることが望ましい。しかし、従来、がん患者のリンパ球を使って、がんの特異的な抗体やTリンパ球を取得するためには、2～3ヶ月を要していたことから、せっかくがんの特異的な抗体やTCRが取得できても、がんが進行してしまうため、元の患者の治療に応用することは困難であった。

我々は、近年、ヒトのBリンパ球から抗原特異的ヒト抗体を1週間弱で取得するシステム（ISAAC法）（図1）（Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012）を開発した。さらに、最近、抗原特異的T細胞受容体（TCR）を最短10日以内に検出・取得するシステム（hTEC10法）（図2）（Kobayashi E et al, 2013; Kobayashi E et al, 2014）を開発した。それぞれの技術は、世界的に権威のある科学雑誌Nature Medicineに発表し、大きな反響を生んだ。本研究では、これらの技術の事業への応用を視野に入れながら、これらの技術をさらに最適化することにより、個々の患者に最適な抗体医薬やTCR遺伝子を短期間で、しかも確実に取得・提供できるシステムを作り出すことを目的とする。

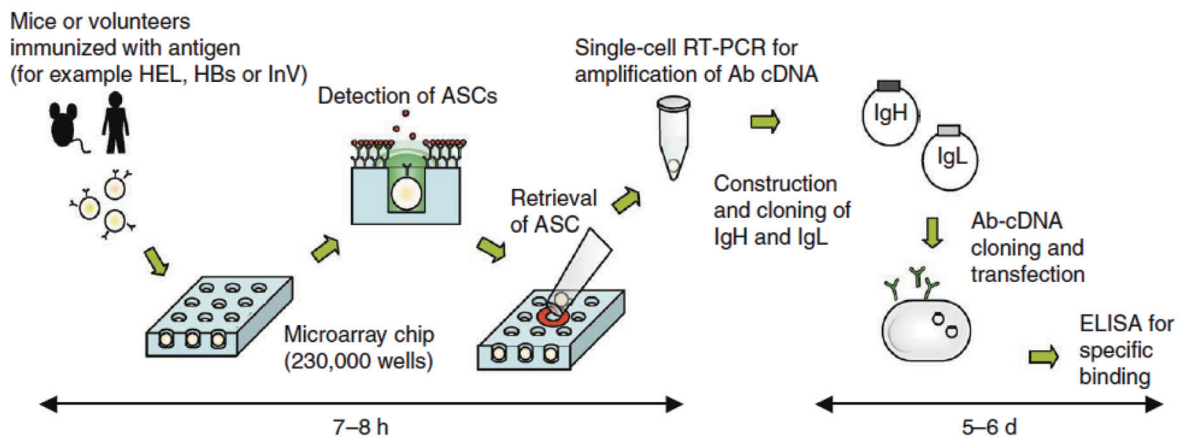


図1 ISAAC法（Jin A et al, Nature Medicine, 2009より転載）

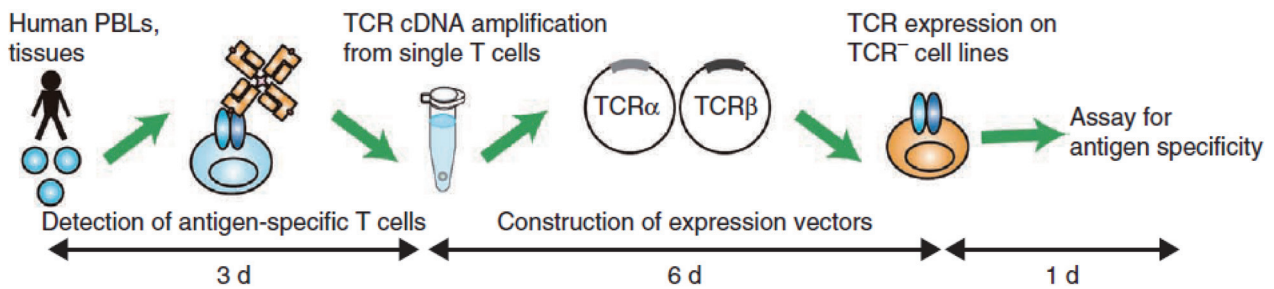


図2 hTEC10法 (Kobayashi E et al, Nature Medicine, 2013より転載)

【各班の概要】

村口は、チップから回収した単一 T 細胞より TCR cDNA を増幅する方法を改良し、従来より効率よく TCR を増幅できることを示し、T 細胞 ISAAC の効率を向上させた。さらに、腫瘍抗原未知の腫瘍に対して、その腫瘍特異的 T 細胞をチップを用いて検出するために、予備実験を行い、システムが動く可能性を示した。今後、このシステムを T 細胞 ISAAC に応用し、臨床サンプルを用いて、腫瘍特異的 TCR を確実に取得できるよう、システムのブラッシュアップを図っていく。

浜名は、抗原および MHC が未知の腫瘍に対して、腫瘍特異的 CTL の TCR を取得することを目的に、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の TCR を解析した。具体的にはマウスに移植したメラノーマの TIL より活性化マーカーを指標に、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を単一細胞ソートし、各リンパ球より TCR を増幅解析した。その結果、クローナルに増殖している集団が検出され、そのクローナルに増殖している集団の TCR をクローニングし、T 細胞に発現させることで、腫瘍特異的 CTL を作製できることを示した。この結果、抗原および MHC が未知の腫瘍より、腫瘍特異的 TCR を迅速・確実に取得できることが示された。

岸は、抗原ペプチド/MHC 複合体と TCR の cis 相互作用の系を用いた、抗原同定のためのレポーター細胞を作製した。そのレポーター細胞を用いて、モデルシステムで抗原が同定できる可能性を示した。

小澤は、がんの増殖に関与する ErbB2 の 677 番目の Threonine (ErbB2-Thr677) のリン酸化を特異的に認識できるウサギモノクローナル抗体を、ウサギ ISAAC システムを用いて作製した。チロシンキナーゼ型受容体である ErbB2 は乳がん細胞などのがん細胞で過剰に発現し、がん細胞の増殖に関与している。そのため、ErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、本抗体は、分子標的薬に対する ErbB2 の感受性を解析するために有用であると期待される。

【結論】

以上、各研究班は計画に沿って順調に成果を挙げてきた。これまでの研究で、がん患者のリンパ球から、がん治療のための TCR 遺伝子を迅速・確実に取得・作製することは、基本的に可能になってきた。今後は、臨床へ向けてのシステムの最適化が重要な課題と考える。また、がん治療用の抗体医薬の作製も進展すると期待される。これらの医療材料を迅速に作製することで元の患者の治療に応用することができるようになれば、がんの免疫学的テーラーメイド治療が可能になると期待される。

I - 1 T細胞 ISAAC の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 教授 村口 篤

【目的】

我々が最近開発した、hTEC10法は、フローサイトメータを用いて、ペプチド刺激に反応してサイトカインを産生する T リンパ球を検出することにより、抗原ペプチド特異的 T リンパ球を検出することができる (Kobayashi E et al, 2013)。しかし、その感度は高くなく、頻度の低いウイルス等の抗原に特異的な T リンパ球はバックグランドノイズの中に埋もれてしまい、ヒト末梢血リンパ球中において、抗原特異的 T リンパ球を直接検出することは困難であった。そのため、抗原ペプチド特異的 T リンパ球を検出するためには、2 週間程度リンパ球をウイルス等の抗原で刺激しながら培養し、抗原特異的 T リンパ球を増殖させてから、検出する必要があった。我々は、最近、予備的検討にて、B リンパ球に応用していた ISAAC 法 (Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012) で用いた細胞チップを T 細胞に応用すると、*in vitro* での培養を必要とせずに、ヒトより調製した末梢血 T リンパ球から直接ウイルス等の抗原に特異的な T 細胞が検出できることを示唆するデータを得ている。以下、細胞チップを用いて抗原特異的 T 細胞を検出する方法を T 細胞 ISAAC 法と呼ぶこととする。本研究では、hTEC10法と T 細胞 ISAAC 法の良い点を組み合わせて、より感度の高い、抗原特異的 T リンパ球検出法を確立することを目的とする。

昨年度は、ヒト末梢血リンパ球の中から、細胞チップを用いて、ウイルス抗原ペプチドに反応しサイトカインを産生する、T リンパ球を検出できることを示した。これまで、T 細胞 ISAAC では、取得した単一 T 細胞から 5'-RACE 法を用いて TCR cDNA を増幅していたが、増幅効率が良くなかった。今年度は、浜名が昨年度に報告した Multiplex one-step RT-PCR 法 (Hamana H et al, 2016) を用いて、T 細胞 ISAAC で取得した T 細胞から、抗原特異的 TCR の遺伝子が取得できるかを検証した。また、腫瘍に特異的な T 細胞を検出する場合、抗原が未同定ことが多い。そこで、本年度は、抗原が未知の抗原提示細胞に反応する T 細胞を、T 細胞 ISAAC を用いて検出するための工夫を行った。

【方法】

1) 細胞チップ

図 1 に示すように、ちょうどリンパ球が1個入る大きさ・形状の微小ウェルが規則正しく約4.5万個から23万個、1 × 2 cm 四方の範囲に配置されたチップ（マイクロウェルアレイチップ）を用いた。

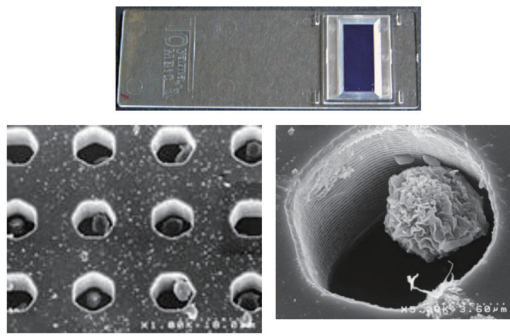


図1 マイクロウェルアレイチップ

(上) マイクロウェルアレイチップの全体像。

(下左) 拡大したマイクロウェルの電子顕微鏡像。

(下右) 1リンパ球が1ウェルに入っている電子顕微鏡像。

2) ヒト末梢血リンパ球由来 T 細胞

ポジティブコントロールとして、これまでに、EB ウイルスの BRLF-1 由来 T 細胞の存在をフローサイトメトリーにて確認している、HLA-A24 陽性の健康人ボランティアの末梢血リンパ球を用いた。末梢血リンパ球より、ヒト CD8+ T リンパ球分離キット (EasySep, Stemcell 社) を用いて、CD8 陽性 T 細胞を分離し、T 細胞 ISAAC に用いた。

3) T 細胞 ISAAC

細胞チップの表面にヒト IFN- γ 特異的抗体をコートした後、チップ表面への余分なタンパク質の非特異的結合を防ぐためにブロッキングを施した。このように前処理した細胞チップに、ヒト末梢血由来 CD8 陽性 T 細胞を播種した。ウェルに入らなかった余分な細胞を洗い去り、T 細胞を各ウェルに 1 個ずつ配置させた。その後、チップ上に抗原となる BRLF-1 由来ペプチドを加え、約 6 時間培養した。この 6 時間の間に BRLF-1 由来ペプチドに特異的な TCR を発現している T 細胞では、自身の HLA 上に BRLF-1 由来ペプチドが提示され、それが自身の TCR を活性化することで、IFN- γ を分泌する。分泌された IFN- γ はウェルからチップ表面へ拡散していき、チップ表面にコートされた IFN- γ 特異的抗体にトラップされる。次に、蛍光標識した別の IFN- γ 特異的抗体を加え、チップ表面にトラップされている IFN- γ に結合させた。その蛍光標識 IFN- γ 特異的抗体の結合を蛍光顕微鏡で観察した。IFN- γ 分泌細胞を回収し、multiplex one-step RT-PCR 法により TCR cDNA を増幅した (図 2)。42 個の細胞を回収し、29 個の細胞から TCR α 鎖および β 鎖の cDNA を増幅することができた (表 1)。この結果より、5'-RACE 法を使用していたときに較べて、増幅効率が向上したことが検証された。

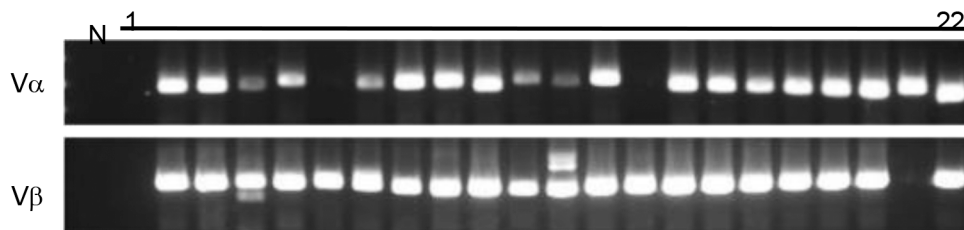


図2 単一細胞 RT-PCR による TCR-cDNA の増幅

4) TCR の T 細胞株への発現および抗原特異性の確認

TCR cDNA をレトロウイルスベクターに組み込み、組換えレトロウイルスを作製し、内因性 TCR が発現していない TG40 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した T 細胞を BRLF-1 ペプチド/HLA-A24 テトラマーおよび CD3 抗体で染色し、TCR の細胞表面への発現およびその抗原特異性をフローサイトメトリーにて確認した。図 3 に示すように、TG40 細胞の細胞表面に CD3 分子が発現し、BRLF1/A24 テトラマーが結合したことから、取得した TCR が細胞表面に発現し、抗原に特異的に結合することがわかった。最終的に、表 1 にまとめたように、42 個の細胞を回収し、29 個の細胞より TCR α 鎖および β 鎖の cDNA ペアを増幅させることができ、そのうち 19 個の TCR が抗原/MHC テトラマーに結合した。

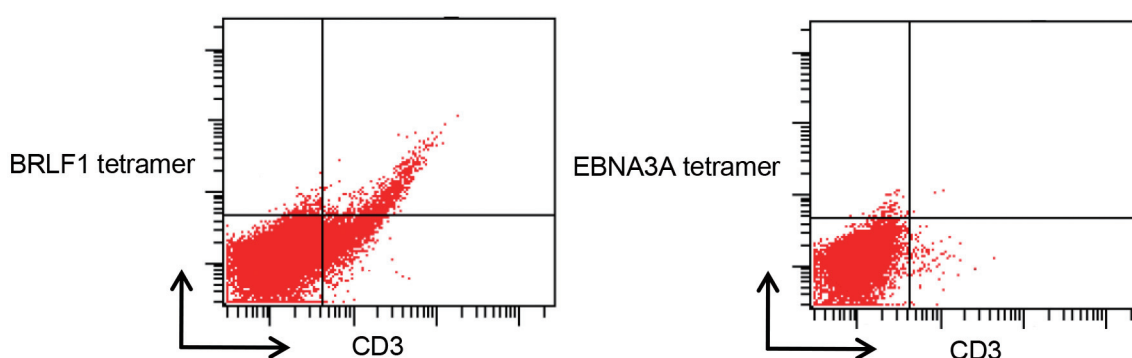


図 3 取得 TCR の抗原特異性の確認

表 1 抗原特異的 T 細胞を取得する際の T-ISAAC の効率

T-ISAAC により回収した細胞数	42細胞
TCR α 鎖および β 鎖 cDNA ペアが増幅した細胞数	29細胞
抗原/MHC テトラマーに結合した TCR の数	19個

5) 抗原未知の細胞に特異的に反応する T 細胞の同定

T 細胞を活性化し、IFN- γ を分泌させるためには、抗原提示細胞と T 細胞を共培養することが必要である。しかし、細胞チップ上で、ウェルに入った 1 個の T 細胞を抗原提示細胞で刺激することは困難である。そこで、あらかじめ T 細胞と抗原提示細胞を混合培養した後、T 細胞をチップに播種し、IFN- γ の分泌をチップ上で検出することで、抗原特異的 T 細胞を検出することを考えた。その予備実験として、T 細胞と抗原提示細胞を混合培養し IFN- γ の分泌を誘導する条件を検討した。図 4 に示すように、T 細胞と抗原提示細胞を一晩培養することで、IFN- γ の分泌を誘導することができた。現在、抗原提示細胞との共培養で刺激した T 細胞をチップに播種することにより、チップ上で IFN- γ の分泌が検出できるか検討中である。

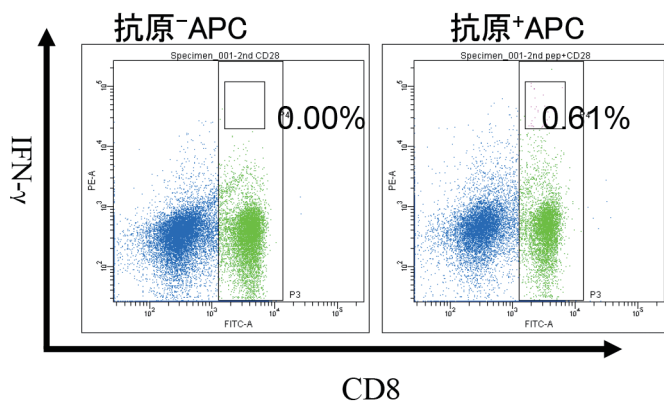


図3 抗原提示細胞刺激によるIFN- γ 分泌誘導

【結論と今後の展望】

本年度は、チップより回収したT細胞からTCR遺伝子を増幅する方法として、これまで使用していた5'-RACE法に替えて、multiplex one-step RT-PCR法を採用することで、取得T細胞からのTCR cDNA取得の効率を大幅に向上させることができた。これにより、T細胞ISAAC法の臨床サンプルへの応用へ向けて前進したと考える。また、抗原提示細胞とT細胞を共培養することで、T細胞に刺激特異的にIFN- γ 分泌を誘導する条件を確立することができた。このようにして刺激したT細胞をチップに播種することで、IFN- γ の分泌をチップ上で検出し、抗原提示細胞に反応するTCRをT細胞ISAAC法で取得できると期待される。実際の臨床の現場では、腫瘍抗原が未知のことが多いため、抗原情報が未知でも腫瘍特異的TCRをT細胞ISAAC法で取得できるようになれば、T細胞ISAAC法を応用した腫瘍の個別化治療へ向けての大きな一歩となると期待される。今後も、T細胞ISAAC法を用いて、腫瘍特異的TCRを迅速に取得する条件を確立していきたい。

I - 2 がん特異的T細胞検出システムの改良

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 助教 浜 名 洋

【目的】

我々が、最近 Nature Medicine に報告した hTEC10法は、既知の抗原ペプチドに反応する T 細胞を同定し、その T 細胞受容体 (TCR) を取得する方法である (Kobayashi E et al, 2013)。T 細胞の抗原ペプチドは、抗原提示細胞上に発現している human leukocyte antigen (HLA) 分子の上に結合して、細胞表面に提示される。現在の研究・臨床試験の主流は、既知の抗原ペプチド特異的 T 細胞を用いたがん免疫療法が主体である。

HLA 分子は多型性に富んだ分子であり、各個人により、そのアミノ酸配列 (ハプロタイプ) が異なる。特に、ペプチドが結合する部分および TCR と相互作用する部分のアミノ酸配列が異なる。その結果、ハプロタイプが異なると、HLA 分子上に結合するペプチドも異なってくる。HLA のハプロタイプは民族によっても偏りがある。その結果、日本なら日本、欧米なら欧米で多いハプロタイプに研究が偏る傾向がみられる。すなわち、日本では、HLA-A24分子に結合するペプチドおよびそれに反応するT細胞の解析が主であり、欧米では、HLA-A2分子に結合するペプチドおよびそれに反応するT細胞の解析が主である。従って、がんの免疫療法においても、HLA-A24あるいはHLA-A2以外のハプロタイプを持つ患者はがん免疫療法の恩恵に与ることができない。

一方で、現在、がん抗原ペプチドが特定されていないがんが多数存在し、そのようながんに反応する TCR を取得し、治療に応用したいという高いニーズがある。本研究では、hTEC10法を改良し、抗原が未知のがんに反応する TCR を取得できるシステムを構築することを目的とする。

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) には、がん細胞を特異的に殺傷する T 細胞が存在することが知られている。従って、TIL からクローニングした TCR 遺伝子の中から、がん細胞に反応する TCR 遺伝子を選択することができれば、がん抗原ペプチドが特定されていなくとも、がんの特異的な TCR 遺伝子を取得することが可能となる。TIL の中でも、T 細胞活性化マーカーである PD-1 あるいは CD137を発現し、かつクローナルに増殖している TIL が、がん特異的 T 細胞の有力な候補である。そこで、本年度は、昨年度に報告した TCR cDNA を迅速・簡便に増幅可能な Multiplex one-step RT-PCR 法を用いて、マウス・メラノーマ腫瘍に浸潤した CD137⁺CD8⁺ T 細胞の TCR レポートリー解析を行い、クローナルに増殖している TIL を同定した。そして、そのクローナルな TIL からクローニングした TCR 遺伝子を用いて TCR のがん細胞に対する反応性を調べ、「TIL の TCR レポートリー解析」により、

がん特異的な TCR 遺伝子を取得可能であることを検討した。

【方法】

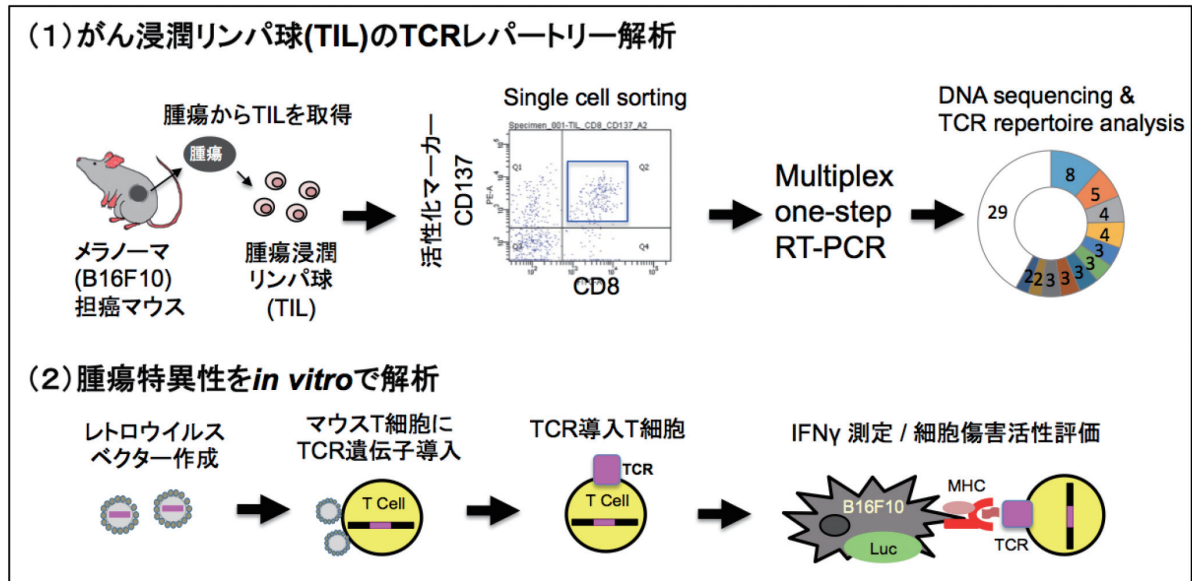


図1 実験の概要

TIL の TCR レパートリー解析 (図1-(1))

マウスのメラノーマ細胞株である B16F10細胞を C57BL/6 マウスの皮下へ移植し、10日後に腫瘍を摘出し TIL を調製した。調整した TIL を抗マウス CD137抗体および抗マウス CD8 抗体で染色し、セルソーターを用いて CD137⁺CD8⁺ TIL を96well PCR プレートに Single cell sorting した。Multiplex one-step RT-PCR 法により TCR α 及び TCR β の cDNA を増幅し、得られた PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行い TCR 遺伝子の DNA 配列を決定した。その DNA 配列情報を IMGT (<http://www.imgt.org>) で解析し、TCR の V-gene および CDR3 の配列を同定し、TILのクローナリティを決定した。

TCR の腫瘍特異性の in vitro 解析 (図1-(2))

クローナルな TIL 由来の TCR 遺伝子を用いてレトロウイルスベクターを作成し、マウス脾臓由来のT細胞に遺伝子導入した。作製した TCR 遺伝子導入 T 細胞と B16F10メラノーマ細胞を共培養し、IFN- γ の産生量を測定し、TCR の活性化を評価した。また、ルシフェラーゼを発現するB16F10細胞 (B16F10-Luc) を用いて、TCR 遺伝子導入 T 細胞のB16F10細胞傷害活性を解析した (ルシフェラーゼ活性と生細胞数との間に相関があることを利用した解析法を用いた)。

【結果】

5匹のメラノーマ担癌マウスより TIL を調整し、CD137⁺CD8⁺ TIL の TCR レパートリーを解析した。図2に TCRβ のレパートリー解析の結果を示す。Mouse-1 では、32個の TIL から TCRβ の cDNA 配列が決定され、その内22個の TIL からは同一 DNA 配列の TCRβ cDNA がクローニングされた。すなわち、この22個の TIL (Gp1) は、腫瘍内でクローナルに増殖した TIL であることが明らかとなった。一方、残りの10個の TIL はユニークな TCRβ 遺伝子を発現しており、クローナルな TIL ではないことが示された。Mouse-2 では、53個

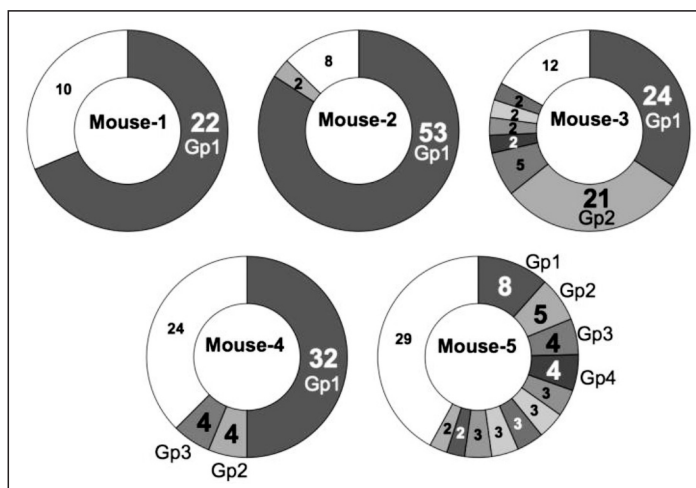


図2 CD137⁺CD8⁺ TIL の TCRβ レパートリー
図中の色の塗られた画分の数字は同一の TCRβ を発現していた TIL の数を示している。色を塗られていない画分の数字はユニークな TCRβ を発現していた TIL の数を示している。

の TIL が高頻度でクローナルに増殖している様子が観察された。同様に Mouse-3, -4, -5 においても頻度の違いはあるが、クローナルに増殖している CD137⁺CD8⁺ TIL が同定された。次に、各マウスの TIL においてクローナリティの高い TIL (Gp~Gp4) から TCRα cDNA をクローニングし、TCRα と TCRβ を発現させるためのレトロウイルスベクターを作製した。Mouse-1 では 1Gp1-TCR, Mouse-2 では 2Gp1-TCR, それぞれ 1 種類を、Mouse-3 では 2 種類 (3Gp1, 3Gp2), Mouse-4 は 3 種類 (4Gp1, 4Gp2, 4Gp3), Mouse-5 は 4 種類 (5Gp1, 5Gp2, 5Gp3, 5Gp4) の TCR 発現用ウイルスベクターを作成し、それらのウイルスベクターを用いて、マウス脾臓由来の T 細胞に TCR 遺伝子を導入した。TCR 遺伝子導入 T 細胞と B16F10細胞を共培養し、活性化 T 細胞が産生する IFN-γ の量を測定した。その結果、ネガティブコントロールである OT-1 TCR 遺伝子導入 T 細胞に比べ、4Gp1, 4Gp2, 4Gp3, 5Gp1, 5Gp2-TCR を遺伝子導入した T 細胞において、顕著な IFN-γ の産生が見られ、これらの TCR が B16F10細胞に反応し、T 細胞が活性化することが明らかとなった。一例として、図 3A に Mouse-4 TIL 由来の TCR を遺伝子導入した T 細胞の IFN-γ の産生を示す。更に、IFN-γ の産生が見られた TCR 遺伝子導入 T 細胞が B16F10-Luc に対して細胞傷害活性を示すかどうかを検討した。図 3B に、その結果を示す。Mouse-4 TIL 由来の TCR を遺伝子導入した T 細胞が B16F10-Luc に対して細胞傷害活性を示すことが確認された。

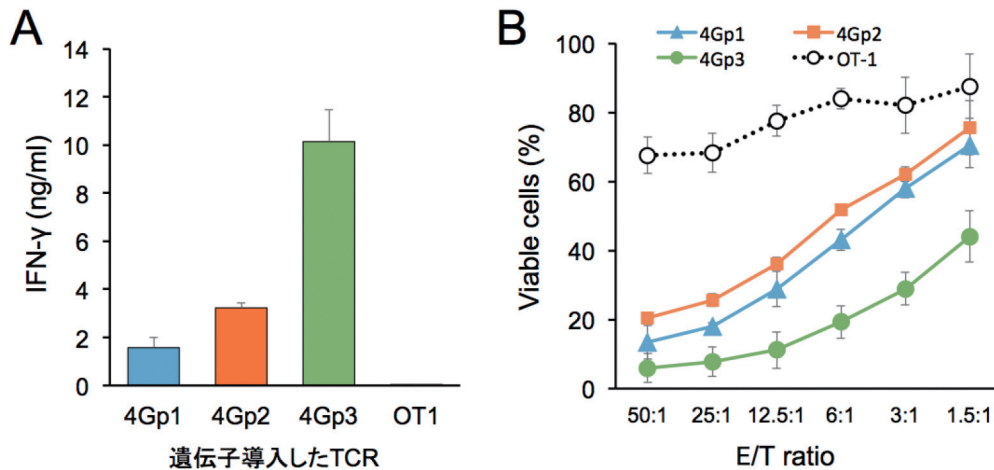


図3 TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた B16F10 細胞に対する TCR の反応性の解析

A: TCR 遺伝子導入 T 細胞と B16F10細胞を共培養し、その培養上清中に分泌される IFN- γ の濃度をELISAによって測定した。B: TCR 遺伝子導入 T 細胞と B16F10-Luc 細胞を共培養した後、B16F10細胞内のルシフェラーゼ活性を測定し、TCR 遺伝子未導入の T 細胞と共培養した B16F10-Luc のルシフェラーゼ活性との比較により生細胞数の割合を算出した。

【考察と今後の展望】

本年度、我々は本研究で改良した Multiplex one-step RT-PCR 法を用いて、マウス・メラノーマ腫瘍の活性化 TIL の TCR レパートリー解析を行い、クローナルに増殖している TIL を迅速・簡便に同定することが可能であることを確認した。そして、そのクローナルな TIL から取得した TCR 遺伝子を用いて、クローニングした TCR のがん特異性やがん細胞に対する細胞傷害活性の誘導能を検討した。その結果、複数のマウス由来の TIL から複数のがん特異的な TCR 遺伝子を取得する事に成功した。すなわち、「活性化 TIL の TCR レパートリー解析」により、MHC や抗原に関係なく、がん特異的 TCR が取得可能であることが実証された。

現在、我々はヒトの TIL から同様の方法で、がん特異的 TCR を取得する研究を進めている。我々の方法は「迅速・簡便」が特徴である。HLA ハプロタイプに関係なく、全てのがん患者を対象に、迅速・簡便な TCR 遺伝子治療を提供することを目標に研究を発展させていきたい。

I - 3 T細胞抗原探索システムの開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸

【目的】

がんの免疫学的治療において、新規がん抗原の同定が喫緊の課題である。いかに良い標的を選択するかが、がんの免疫学的治療の成否を握っているからである。現在、用いられているT細胞の抗原の同定法は非常に複雑な方法で、その時々で、トライアンドエラーで、最適な方法を探しながら行う必要がある。我々は、本研究において、非常にシンプルで確実に機能する「T細胞抗原探索システム」を開発する。この新規システムの開発により、がん抗原をシンプルに再現性良く同定できれば、新たながんワクチンの開発やがんのテーラーメイド医療にも貢献できる。

昨年度は、抗原提示細胞に抗原遺伝子を導入し、抗原特異的 T 細胞が接触すると、抗原提示細胞にシグナルが導入され、蛍光タンパク質の発現を指標に抗原遺伝子が導入された抗原提示細胞を検出する方法を検討した。今年度は、村口教授が開発している T-ISAAC の原理を応用し、抗原特異的 T 細胞に抗原遺伝子を導入して、cis の相互作用により TCR からのシグナルを導入することで、活性化マーカー CD137の発現を検出し、それを指標に抗原遺伝子が導入された T 細胞を検出するシステムを検討する。モデルシステムとしては昨年度と同様に、EBウイルス由来ペプチドに反応する TCR を用い、抗原 cDNA が導入された T 細胞を同定できるかを検証する。

【方法と結果】

図 1 に示すように、TG40細胞にBRLF-1 特異的 TCR および HLA-A24分子を発現させた。その細胞に BRLF-1 ペプチドを発現する遺伝子を導入したところ、図 1 右の図のように、CD137分子の発現が上昇した。この結果より、cis 相互作用のシステムを使い、抗原探索システムが構築できることが示唆された。

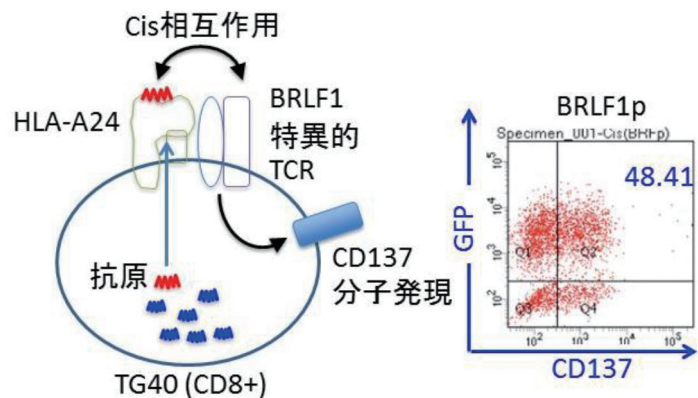


図 1 cis 相互作用を用いた抗原探索用レポーター

次に、BRLF-1 ペプチドを発現するレトロウイルスベクターを作製した。そのベクターを空のウイルスベクターで希釈し、1 倍、10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍、100,000 倍の希釈系列を作り、

レポーター細胞に導入した。遺伝子導入後、一晚培養し、活性化マーカー (CD137) の発現を解析した。

その結果、図 2 に示すように、 10^4 分の 1 の頻度で抗原ペプチド発現ベクターがレポーター細胞に導入された場合にも、CD137 の発現が特異的に増強することが確認された。

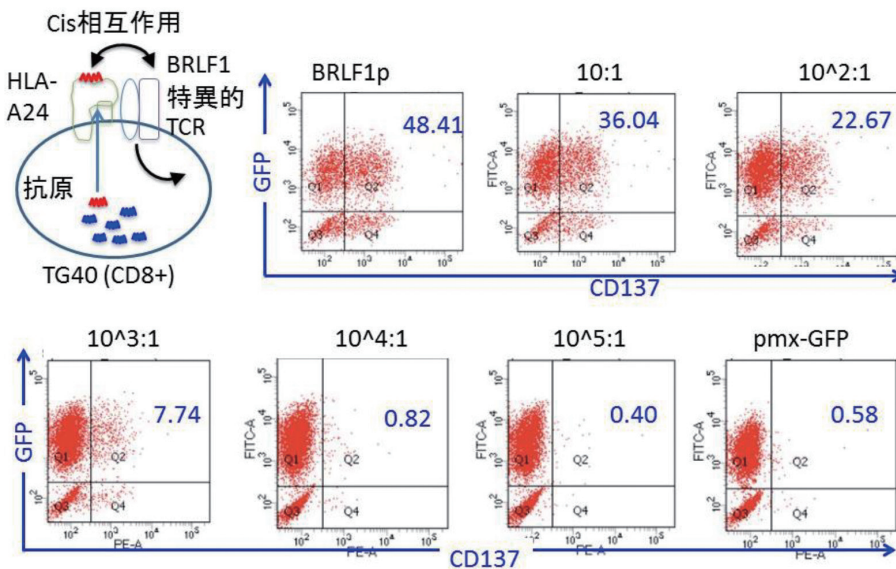


図 2 抗原ペプチドベクターの希釈系列に対するレポーター細胞の反応

【考察と今後の展望】

実際に、cDNA 発現型ライブラリーを作製して抗原のスクリーニングを行う時には、 10^5 程度の独立したクローンを含むライブラリーを作製する必要があることが明らかとなった。今回の結果は、 10^4 個に 1 個の割合で目的のクローンが存在していれば、レポーター細胞を用いて目的の抗原 cDNA を検出できるということを示している。従って、 10^5 個のライブラリーを、 10^4 個を 1 グループとして 10 グループに分け、それらを解析すれば、目的の抗原が同定できる可能性があるということであり、十分実現可能なシステムが構築できたと考えられる。

今回の結果より、作製したレポーター細胞を用いることで、ペプチド発現ライブラリーより、目的の TCR の抗原ペプチドが同定される可能性が示された。今後、実際のライブラリーを作製して、抗原 cDNA が取得できるか、検証していきたい。本研究により、シンプルで信頼性の高い抗原探索システムを作製することができれば、新規がん抗原を同定し、より効果の高いがんワクチンを製造することが可能になる。さらに、個々の患者におけるがん抗原を同定することにより、がんのテーラーメイド医療にも貢献すると期待される。

I - 4 ウサギ ISAAC を用いた抗体開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 助教 小澤 龍彦

【研究目的】

ウサギの抗体はマウスなどの抗体に較べて、抗原に非常に特異的かつ強力に結合することが知られている。がんの治療においても、がんの特異的に、かつ強力に結合する抗体の開発が必要とされている。我々は、最近、細胞チップを用いて、ウサギ由来モノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に取得する「ウサギ ISAAC 法」を開発した (Ozawa T et al, 2012)。本研究では、「ウサギ ISAAC 法」を用いて、がん抗原に対するウサギモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いてがん細胞の傷害や検出法などに応用可能か検証する。

チロシンキナーゼ型受容体である ErbB2 は乳がん細胞などのがん細胞で過剰に発現し、がん細胞の増殖に関与している。そのため、ErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、ErbB2 の活性調節機構の解明は、分子標的薬に対する感受性や耐性獲得などに関する重要な知見となる。中でも677番目のスレオニン残基 (ErbB2-Thr677) のリン酸化は、ErbB2シグナルの下流の ERK 活性に関与している可能性が示唆されており、この ErbB2-Thr677のリン酸化を測定することは、ErbB2 活性評価に繋がる。

そこで今回我々は、ErbB2-Thr677のリン酸化を特異的に認識できるウサギモノクローナル抗体を作製し、本抗体を用いた乳がん患者の組織染色などからがん細胞分子標的薬に対する感受性や悪性化の予測プロトコルの確立を目指す。

【方法】

ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体のスクリーニング

平成27年度までに、取得した抗体遺伝子の H 鎖と L 鎖の両方の可変部領域をウサギ抗体の H 鎖及び L 鎖の定常部領域を持つプラスミドにそれぞれ組み込み、抗体発現プラスミドを作製した。得られたプラスミドを Expi293F 細胞（サーモフィッシャー）に導入し、5日間培養を行い、培養液中に抗体を産生させた。プラスミドの構築と抗体の発現は、Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている方法に従った。

得られた培養液を用いて ELISA を行い ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体を発現するプラスミドの選別を行った。具体的には、ELISA 用 maxi sorp プレート（サーモフィッシャー）に 1 μ g/ml の

ErbB2 由来リン酸化ペプチド (p-ErbB2pep, オペロンバイオテクノロジーズ, 配列: EPLpTPSGAMP, pT はリン酸化スレオニン) 及び ErbB2 由来非リン酸化ペプチド (ErbB2pep, オペロンバイオテクノロジーズ, 配列: EPLTPSGAMP) を加え, 4°Cで一晩インキュベーションすることで固相化させた。翌日ペプチドを固相化した各ウェルを0.05% Tween-20を含んだリン酸緩衝液 (PBST) で洗浄し, 3% (w/v) BSA を含んだ PBST (PBST/BSA) で室温にて1時間ブロッキングした。その後各ウェルをPBSTで洗浄し, 得られた培養液を加え, 室温にて1時間インキュベーションした。PBSTで洗浄後, アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギFc抗体 (シグマ-アルドリッチ) を加え, 室温にて1時間インキュベーションした。PBSTで洗浄後に1mg/ml アルカリフォスファターゼ基質 (パラニトロフェニルリン酸, シグマ-アルドリッチ) を加えて反応させ, 405nmの吸光度を測定した。

ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体の解析

抗体遺伝子の塩基配列は, genetic analyzer 3130 (サーモフィッシャー) と BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (サーモフィッシャー) を用いて解析した。

塩基配列を解析したプラスミドを Expi293F 細胞に導入し, 7日間培養を行い, 培養液中に抗体を大量に産生させた。得られた培養液からプロテインGカラム (GEヘルスケア) を用いて精製した。

HEK293細胞に野生型 ErbB2 及び T677A ErbB2 を発現させ, 24時間後に12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート (TPA) を10分間作用させ ErbB2 のリン酸化を誘導した。これら細胞より細胞抽出液を調整し, SDS-PAGE による分離を行い, 膜に転写後, 精製した抗体を用いて, ウェスタンによる解析を行った。

【結果及び考察】

得られていた20個のH鎖, L鎖の可変部領域を定常部領域に繋ぎ, 抗体の産生を行い, p-ErbB2pepとの結合特異性を解析した結果, ELISAにより8種類の抗体がp-ErbB2pepと特異的に結合することが示された (図1)。これら抗体の塩基配列を決定し, 抗体の大量調整を行った。これら抗体が細胞レベルで結合するかを検討した結果, #18-1 及び #18-4 は TPA によってリン酸化が誘導された ErbB2 と特異的に

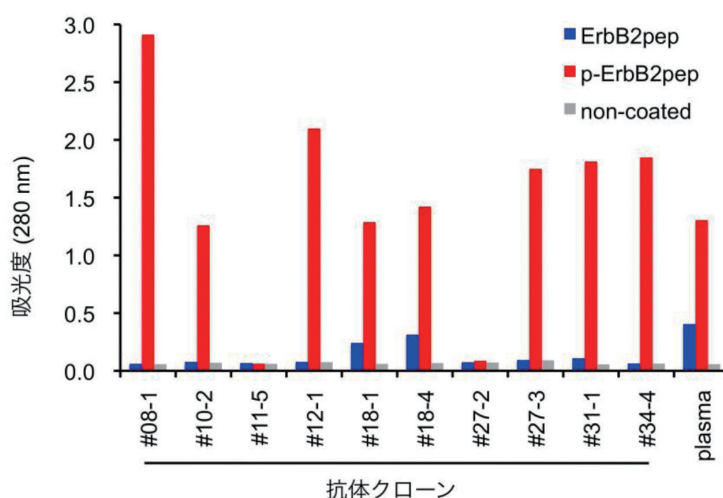


図1 抗体クローンのスクリーニング。作製した抗体クローンを用いELISAにてp-ErbB2pepとの結合性をELISAにて検証した。Plasmaは、p-ErbB2pepを免疫したウサギより分離した血漿で行った。

結合し、該当するリン酸化部分をアラニンに変異させた T677A とは結合しないことがウエスタン解析によって示された (図 2)。残りの 7 種類の抗体は、ウエスタン解析では結合しなかった。これらの結果より、今回作製した #18-1 及び #18-4 は細胞内における ErbB2-Thr677 のリン酸化部位を特異的に検出できる事が示された (Kawasaki et al, 2016)。

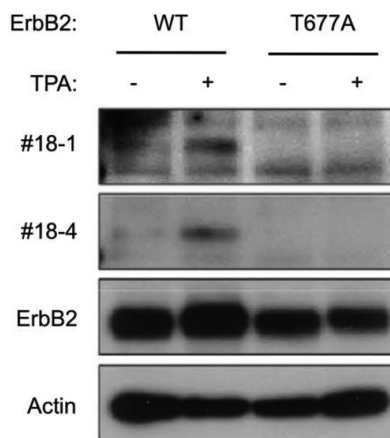


図2 作成した#18-1及び#18-4抗体を用いたウエスタン解析。野生型ErbB2及びT677A ErbB2を発現させたHEK293細胞に、TPAを10分間作用させた細胞抽出液をSDS-PAGEにより分離し、膜に転写後、図に示した抗体を用いてウエスタンによる解析を行った。

【結論・今後の展望】

ErbB2 はシグナル伝達の重要な受容体であり、その伝達にはリン酸化が関与していることが知られている。一方で全てのリン酸化部位は特定されておらず、今回対象とした ErbB2-Thr677 のリン酸化は、ErbB2 シグナルの下流のERK活性に関与している可能性が示唆されているものの、ErbB2-Thr677 にリン酸化が起こっていることが証明されていなかった。今回の研究で、ErbB2-Thr677 のリン酸化部位を特異的に検出できる抗体、#18-1 及び #18-4 を作製することができたことから、ErbB2-Thr677 にリン酸化が起こっていることが証明され、さらには、下流シグナルである ERK の活性評価を通して ErbB2 活性評価に繋がることが期待される。

タンパク質全体の中で、リン酸化される場所は170,000箇所以上あると推計されている。しかしながら実際に出回っている抗体はその0.1-5%程度に過ぎず、特にシグナル伝達の研究者から、リン酸化特異的抗体の供給が望まれている。本方法を用いる事で、改めてリン酸化特異的抗体を容易に得ることが示された。本方法は今後、このような研究者が望んでいるリン酸化特異的抗体の供給の一助になることも期待される。また、チロシンキナーゼ型受容体であるErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、本抗体は ErbB2 に対する分子標的薬の効果を解析するためにも有用であると考えられる。

【参考文献】

- 1 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., *Kishi H. and Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nature Medicine*, 15:1088-1092, 2009.
- 2 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kishi H., Muraguchi A. Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nature Protocol* 6:668-676, 2011.

- 3 Kishi H., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Muraguchi A. Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. *Methods Mol Biol.* 853:141-150, 2012.
- 4 Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nature Medicine*, 19:1542-1546, 2013.
- 5 Kobayashi E., Kishi H., Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology*. 3:e27258, 2014.
- 6 Hamana H, Shitaoka K, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. A novel, rapid and efficient method of cloning functional antigen-specific T-cell receptors from single human and mouse T-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 474:709-714, 2016.
- 7 Ozawa T., Piao X., Kobayashi E., Zhou Y., Sakurai H., Andoh T., Jin A., Kishi H., Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. *PLoS One.* 7:e52383, 2012.
- 8 Kawasaki Y, Sakimura A, Park CM, Tomaru R, Tanaka T, Ozawa T, Zhou Y, Narita K, Kishi H, Muraguchi A, Sakurai H. Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain. *Sci Rep.* 6:31502, 2016.

II. 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果と ペオニフロリン含有外用薬の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）

応用薬理学 安東 嗣 修

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）

産婦人科学 齋藤 滋

がん患者にとって抗がん薬によるがん化学療法は、その治療にとって重要である。しかしながら、抗がん薬の副作用の一つである末梢神経障害は、「手袋一靴下型」の形成分布つまり四肢末端で認められることを特徴とする痛みやしびれなど耐え難い異常感覚を主症状とし、患者のQOL（生活の質）の低下に加え、抗がん薬の投薬中止へと繋がる。したがって、このような末梢神経障害のコントロールは患者にとって重要である。

我々は、これまでにヒトやマウスにおいて漢方方剤 芍薬甘草湯が抗がん薬による末梢神経障害性疼痛に有用であることを見出してきた。そこで、末梢神経障害が、四肢末端で起こることに着目し、芍薬成分のペオニフロリンの外用がマウスにおいて、抗がん薬パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛の憎悪を抑制することを明らかにしてきた。また、ヒトにおいては、抗がん剤タキソール投与ががん患者に対して芍薬甘草湯投与による臨床評価を運動神経の伝導速度ならびに末梢温度を指標に調べた結果、特にタキソール投与による末梢温度低下に対して芍薬甘草湯が改善効果を示すことが明らかとなった。

本研究では、ペオニフロリンの外用剤開発に向け、前臨床試験として、マウスにおけるパクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛に対するペオニフロリン外用による疼痛憎悪抑制作用機序ならびに、臨床適用外用剤の試作品の効果を検討した。また、臨床では、抗がん薬投与患者への芍薬甘草湯投与による末梢神経伝導速としびれへの影響を検討した。

【各班のまとめ】

1. 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討と ペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験（応用薬理学：安東嗣修）

マウスへの抗がん薬パクリタキセル単回投与により機械的アロディニア（健常状態において非侵害性である刺激に対して、過敏に反応する状態）が誘発された。そこで、ペオニフロリンのエタノール

溶液を1日2回後肢足蹠に塗布した。その結果、パクリタキセル誘発の機械的アロディニアの憎悪をペオニフロリンの外用は抑制した。このペオニフロリン外用における機械的アロディニアの憎悪抑制作用の機序として、本研究では末梢神経の髄鞘を形成しているシュワン細胞に着目し、パクリタキセル誘発小胞体ストレスをペオニフロリンがアデノシン A1 受容体の活性化を介して抑制することが一部関与することを明らかにした。

更に、本研究では、実際に臨床適用を考えるべく、ペオニフロリン外用剤の試作品を用い、パクリタキセル投与後に繰り返し塗布すると、パクリタキセル誘発の機械的アロディニアの憎悪が抑制された。したがって、ペオニフロリン外用剤において、その有用性が見出されたことから、今後本剤の安定性や安全性の確認の後、臨床研究に進める目途がたった。

2. 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験（産婦人科学：齋藤 滋）

婦人科において、パクリタキセル・カルボプラチン投与がん患者でしびれの自覚症状、筋電計用いた運動神経および知覚神経の伝達速度評価、さらに体表温度についてサーモメーターを用いて体表温度を測定した。本年は、がん患者18症例において検討した。パクリタキセルの累積投与量に応じて、運動神経伝達速度は変化なかったが、知覚神経伝達速度は有意に減少した。この減少はしびれの強さの自覚症状と相関傾向にあった。また、皮膚表面温度も減少傾向を示した。

今回、7例の患者に対して、芍薬甘草湯内服を行うことで、2例にしびれに対する自覚症状が改善した。これら2症例に関して、知覚神経伝達速度および足背の表面温度は明らかな改善効果を認めなかった。芍薬甘草湯におけるしびれの自覚症状改善効果に神経伝導速度ならびに皮膚の表面温度の以外の抑制作用機序の存在が示唆される。今後、ペオニフロリン外用剤の臨床評価を行う上で症例数の累積に加え、評価法の安定性を確立することが必要であると思われた。

3. その他（応用薬理学：安東嗣修）

本剤開発に向け、

- ①富山県内製薬関連企業に、製剤見本の作製を依頼し、作製して頂いた。
- ②臨床への応用を目指し、臨床試験で使用可能な製剤作製に関して、「薬都とやまヘルスケア創造プロジェクト 薬事戦略個別相談会」（富山県くすり政策課主催）に参加し、製剤開発ならびに臨床研究等に関して相談を行った。（2016年12月16日）

Ⅱ－１ 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学） 応用薬理学

准教授 安 東 嗣 修

【研究目的】

抗がん薬の主要な副作用に嘔吐と末梢神経障害がある。嘔吐に関しては、セロトニン 5-HT₃ 受容体拮抗薬やニューロキニン1 (NK1) 受容体の拮抗薬が用いられ、その有用性が認められている。一方、末梢神経障害【異常感覚（痛みや痺れなど）】は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬ではそのコントロールが難しく、抗がん薬投与中止後も1年以上その症状が続く。従って、新規治療薬および予防薬の開発が必要となっている。

漢方方剤の芍薬甘草湯は、筋肉痛等に用いられ、最近では抗がん薬による末梢神経障害にその有用性が認められてきている。我々は、これまでに、芍薬甘草湯がマウスの抗がん薬誘発末梢神経性異常感覚（機械的アロディニア）を抑制すること並びにその作用が末梢レベルで効いていることを明らかにしてきた。そこで、末梢神経障害が四肢末端で起こることから、芍薬エタノール抽出エキス並びに芍薬の主要成分のペオニフロリンを機械的アロディニア評価部位のマウス後肢足蹠に繰り返し塗布すると、抗がん薬誘発の機械的アロディニアが抑制されることを見出した。本年は、ペオニフロリンによる機械的アロディニアの抑制作用機序に関して検討し、更に臨床で用いることが可能なペオニフロリン外用剤の試作品を用いてその有効性を検討した。

【研究方法】

（実験動物）

実験には、雄性 C57BL/6 マウスを使用した。

（抗がん薬）

抗がん薬パクリタキセル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、Cremophor EL, 100 % エタノール及び生理食塩水を 1:1:8 の割合で調製した溶媒にて溶解し、5 mg/kg の用量で単回腹腔内注射した。

（ペオニフロリン）

ペオニフロリン（和光純薬工業，大阪）は、エタノールに溶解し塗布した。これらエタノール溶

液は、1日2回マウスの後肢の足首より指先側（足掌、足背、指）に塗布した。また、ペオニフロリン外用剤（試作品）は、富山県内の企業Aにより作製して頂いた。

（アデノシン A1 受容体作動薬及び拮抗薬）

アデノシン A1 受容体作動薬 N⁶-cyclopentyladenosine (CPA) は、エタノールに溶解し、1日2回パクリタキセル投与翌日より後肢足蹠に塗布した。アデノシン A1 受容体拮抗薬 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) は、1日2回ペオニフロリン塗布30分前に腹腔内注射した。

（行動評価：機械的アロディニア）

マウス後肢足蹠に von Frey フィラメント (0.69mN) を適用し、この機械的刺激に対する後肢の反応を3段階のスコア化しアロディニアを評価した。

0：反応なしまたは後肢を横にずらす行動

1：後肢の引き上げ行動 (lifting)

2：後肢の振り動作 (flinching) または刺激部位へのなめ行動 (licking)

（ウエスタンブロッティング：小胞体ストレスマーカー CHOP の発現）

パクリタキセルで刺激したシュワン細胞株 LY-PPB6 細胞から常法に従いタンパクを抽出し、ウエスタンブロッティングを行った。1次抗体として抗 CHOP モノクローナル抗体を用い、2次抗体として HRP-結合抗マウス IgG を用い、発光基質と反応させることで X 線フィルムを感光させ、得られたバンドの濃さを評価した。

【結果】

（1）パクリタキセル誘発機械的アロディニアにおけるペオニフロリン外用による抑制効果に対するアデノシン A1 受容体拮抗薬の効果

ペオニフロリンの作用機序の一つにアデノシン受容体活性化作用が報告されている。そこで、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニア憎悪抑制作用にアデノシン A1 受容体が関与しているか検討した。その結果、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニア憎悪抑制作用をアデノシン A1 受容体拮抗薬 (DPCPX) は抑制した。更に、アデノシン A1 受容体作動薬 (CPA) の繰り返し投与は、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した。

（2）シュワン細胞におけるパクリタキセル誘発小胞体ストレスへのペオニフロリンの効果

パクリタキセルによる末梢神経障害の機序に末梢神経の脱髄が報告されている。髄鞘を形成している細胞にシュワン細胞がある。また、パクリタキセルは小胞体ストレスを誘発することが知られている。シュワン細胞株へパクリタキセルを適用すると小胞体ストレスマーカーの CHOP の発現が増大

した。この増大は、ペオニフロリンの前処置により抑制された。更に、このペオニフロリンによる抑制効果にアデノシン A1 受容体が関与しているか検討したところ、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発の CHOP の発現抑制をアデノシン A1 受容体拮抗薬 DPCPX により抑制された。

(3) ペオニフロリン外用製剤によるパクリタキセル誘発機械的アロディニアへの効果

これまで、ペオニフロリンはエタノールに溶解し、外用してきた。今後、臨床への応用を進めるべくペオニフロリン含有製剤の試作並びに薬効評価を試みた。

ペオニフロリン外用製剤の繰り返し塗布により、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した。

【考察と今後の展望】

これまでにペオニフロリンの外用によりパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪が抑制されること、また、その効果が塗布部局所で起こっていることを示してきた。今回の実験では、ペオニフロリンのパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用の機序に関して検討した。過去の文献においてペオニフロリンの作用の一つにアデノシン A1 受容体の活性化が報告されている。そこで、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制へのアデノシン A1 受容体拮抗薬の効果を検討したところ、アデノシン A1 受容体拮抗薬はペオニフロリンの効果をほぼ完全に消失した。さらに、アデノシン A1 受容体作動薬自身の塗布においても、ペオニフロリンと同様にパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した。これらのことから、ペオニフロリンの作用にアデノシン A1 受容体が関与していることが示唆される。また、アデノシン A1 受容体の活性化もまた機械的アロディニアを抑制したことから、ペオニフロリンだけでなくアデノシン受容体作動薬自身もまたパクリタキセル誘発末梢神経障害抑制薬となりうることが期待される。

パクリタキセル誘発の末梢神経障害の作用機序に、末梢神経の脱髄が指摘されている。事実、一昨年の報告にあるようにパクリタキセル投与により後肢足蹠の神経に脱髄が認められ、ペオニフロリンの塗布によりパクリタキセルによる脱髄が抑制された。本年は、更に細胞レベルでの検討を行った。髄鞘の構成細胞はシュワン細胞であることから、シュワン細胞を用いて検討した。パクリタキセルは細胞に小胞体ストレスを起こすことが知られている。そこで、小胞体ストレスマーカー CHOP の発現を指標にパクリタキセルによる細胞障害を評価した。シュワン細胞へのパクリタキセルの投与により CHOP の発現が増加し、ペオニフロリンによりアデノシン A1 受容体を介した経路で抑制された。したがって、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニアの抑制作用には、シュワン細胞の小胞体ストレス抑制作用が関与していることが示唆される。

本年の研究で、ペオニフロリンの抗がん薬誘発末梢神経障害抑制作用機序が明らかとなり、さらにペオニフロリン外用製剤の効果も確認できたことから、今後、臨床試験へのステップアップを試みる

予定である。

【その他活動】

臨床への応用を目指し、臨床試験で使用可能な製剤作製に関して、

- ①「薬都とやまヘルスケア創造プロジェクト 薬事戦略個別相談会」（富山県くすり政策課主催）に参加し、製剤開発ならびに臨床研究等に関して相談を行った。（2016年12月16日）

【論文】

Andoh T., Kobayashi N., Kuraishi Y. Prophylactic repetitive administration of shakuyakukanzoto inhibits paclitaxel-induced mechanical allodynia in mice via peripheral effects. *Trad. Kamp. Med.* 3: 71-74 (2016)

Andoh T., Mizoguchi S., Kuraishi Y. Shakuyakukanzoto attenuates oxaliplatin-induced cold dysesthesia by inhibiting the expression of transient receptor potential melastatin 8 in mice. *J. Trad. Complement. Med.* 7: 30-33 (2017)

Andoh T., Kobayashi N., Uta D., Kuraishi Y. Prophylactic topical paeoniflorin prevents mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice through adenosine A1 receptors. *Phytomedicine* 25: 1-7 (2017)

【学会発表】

安東嗣修, 小林奈央, 倉石 泰. Inhibitory effect of prophylactic repetitive topical application of paeoniflorin on the exacerbation of paclitaxel-induced mechanical allodynia through the adenosine receptor in mice. 第89回日本薬理学会年会；2016 Mar 9-11；横浜.

【その他発表】

安東嗣修. 抗がん薬によって誘発される末梢神経障害と漢方薬—その効果と作用機序—. 富山大学和漢医薬学総合研究所 第21回夏季セミナー；2016 Aug 9-10；富山.

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学

小林奈央, 加藤 充, 倉石 泰

Ⅱ－２ 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯 並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 産婦人科学

教授 齋藤 滋

【研究目的】

高齢化社会への突入により癌罹患率が一貫して増加傾向にあり、現在の日本では2人に1人は、一生のうちに何らかの癌に罹ると言われている。そこで、抗がん剤を含めた化学療法の重要性が増していることに論を俟たない。Evidence Based Medicine の概念に則り有効な抗がん剤が選定され、パクリタキセルがほぼすべての婦人科癌・肺癌・乳癌・胃癌・膵癌など多くの癌種に有効であることが証明され、最も使用頻度の高い抗がん剤となっている。同薬剤は、その投与時間の短さにより、外来での化学療法を可能にした一方で、末梢神経障害の頻度が高いことが知られており、末梢神経障害は同薬剤の減量や中止の指標となっている。しかしながら、末梢神経障害の発生の詳細な機序は未だ明らかとなっておらず、有用な治療薬や治療法がないのが現状である。我々は芍薬甘草湯の芍薬がパクリタキセル誘導の末梢性の痛みに対して有用であることを報告し（Eur. J Pain ; 13 : 22-27, 2009）、臨床例においても芍薬甘草湯がパクリタキセルによる筋肉痛に有用であることを報告している（産婦人科漢方のあゆみ ; 28 : 40-45, 2011）。しかし、これまでの報告は患者による主観的評価法に頼っており、客観的な評価法が求められている。申請代表者である安東らは、電気生理学的手法を用いた検討から、抗がん剤投与マウスの末梢神経において痺れた相当する自家発火が増加していること、ならびに抗がん剤使用後に末梢循環障害が生じ、このことが痛み、痺れにつながることを、世界で初めて見出した。そこで、今回、婦人科がん患者でパクリタキセル製剤を使用する症例に筋電計（T&Tメディカル社ニューロスタディー）を用いて、運動神経および知覚神経の伝達速度評価をおこなった。また体表温度についてサーモメーターを用いて測定した。これらの方法を通して、芍薬甘草湯による末梢神経障害を客観的に評価する方法の確立を目的とした。特に今年度は、患者本人のしびれの自覚的所見と神経伝達速度を中心とした他覚的所見との関係についての検討を行った。

【研究方法】

対象を2016年1月～2016年9月の間に当科で新たにパクリタキセル・カルボプラチンによる化学療法を行った婦人科癌症例を対象とした。化学療法は3週間ごとの外来での投与が基本であるため、化学療法当日（day1）に前腕の運動神経伝達速度と知覚神経伝達速度を測定した。また測定時に自覚

症状についてのアンケートを実施，し手足のしびれ，疼痛に対して0-10段階の評価を依頼した。尚，数字の大きいほど自覚症状が強いことを示す。今年度は以下の項目について検討を行った。

①パクリタキセルの累積投与量と神経伝達速度との関係，また自覚症状との関連について検討を行った。

②芍薬甘草湯（内服）の使用前後の各種項目の変化について

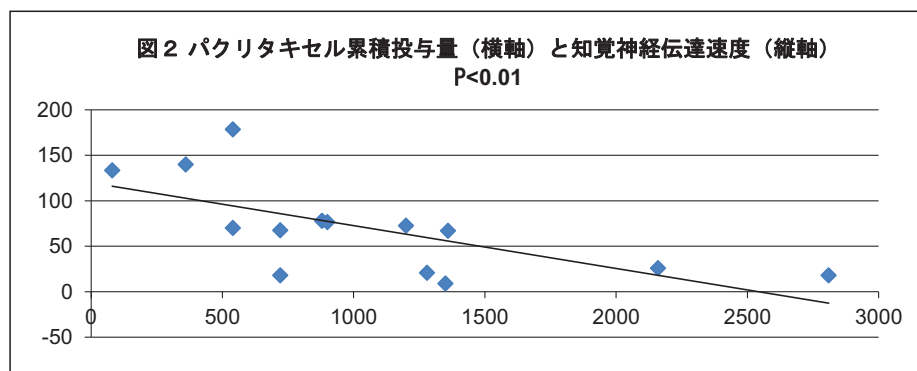
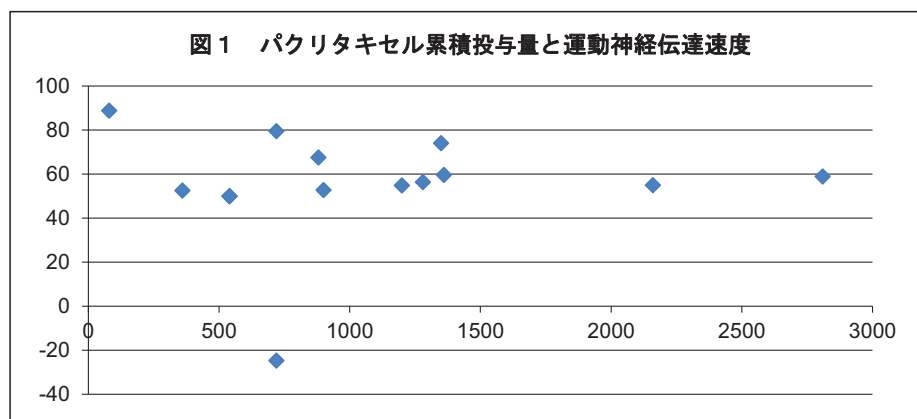
芍薬甘草湯のしびれに対する効果を検討するために，化学療法の1コース目は芍薬甘草湯を使用せず，2コース目以降，服用の希望および同意の得られた患者に対し，芍薬甘草湯を次回化学療法の1日前から7日間，1日7.5gを投薬し，服用前後のしびれ等の自覚症状および神経伝達速度の変化について評価を行った。

【成績】

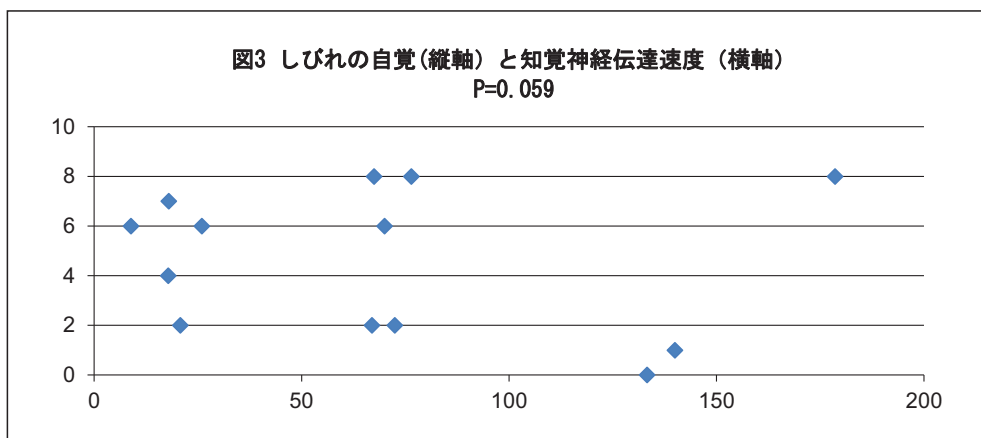
対象は18例，平均年齢は63.0歳，子宮体癌患者が8名，卵巣癌患者が9名，腹膜原発癌患者が1名であった。投与方法としては通常のパクリタキセル・カルボプラチン療法が9名，dose dense パクリタキセル・カルボプラチン療法が9名であった。

①パクリタキセルの累積投与量と神経障害について

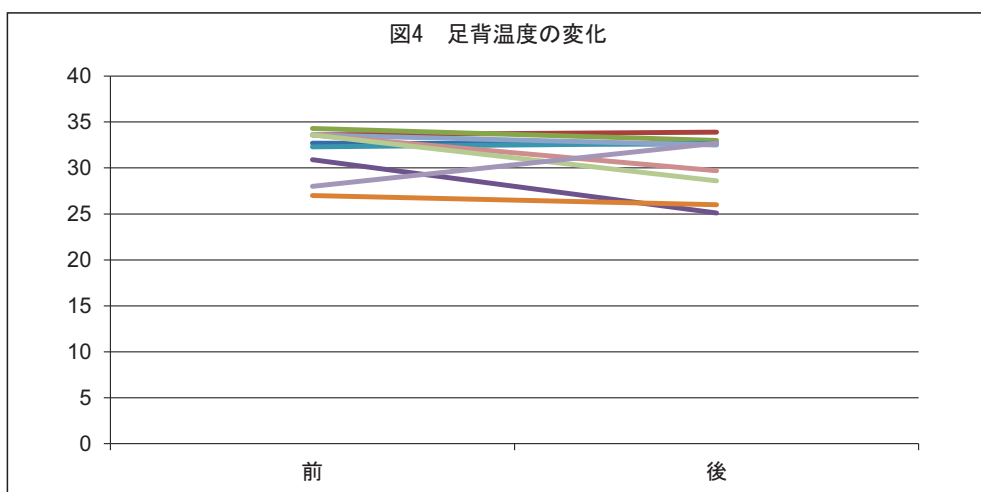
神経伝達速度との関係については運動神経伝達速度については相関関係を認めなかった（図1）が知覚神経伝達速度については負の相関関係を認めた（図2 p 値=0.0037 Spearman の順位相関係数 = -0.7203）。



また、しびれの強さと神経伝達速度については運動神経伝達速度については相関関係を認めなかったが知覚神経伝達速度についてはしびれが強いほど伝達速度が低下する傾向を認めた（図3 p値=0.0595 Spearman の順位相関係数 = -0.3217）。

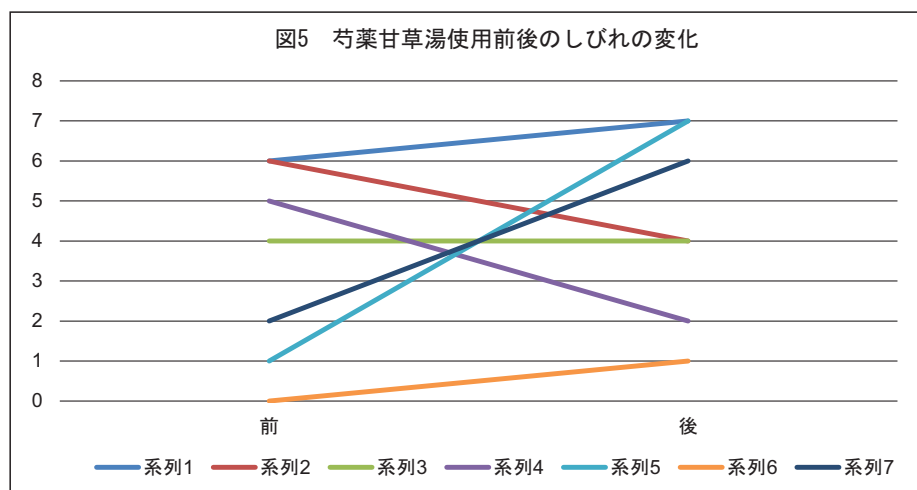


また、パクリタキセル投与の前後で足背温度の低下を認めた症例は10例中6例に認めた（図4 P=0.1）

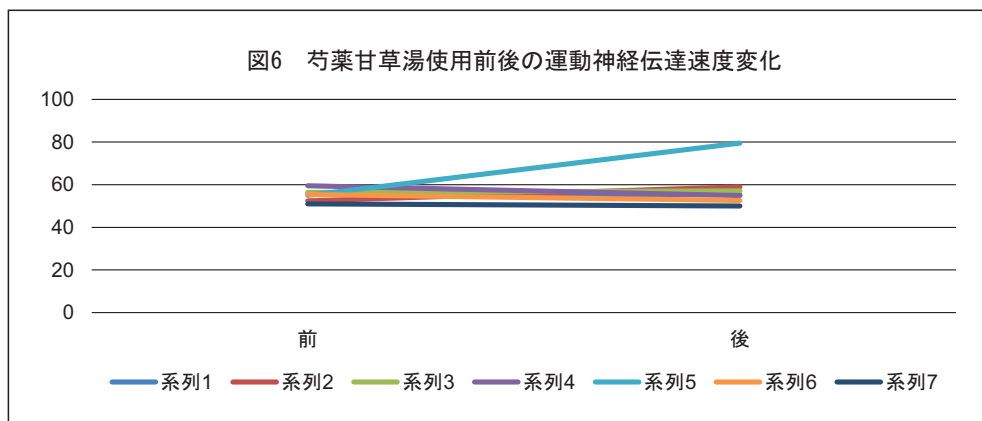


②芍薬甘草湯（内服）の使用前後の変化について

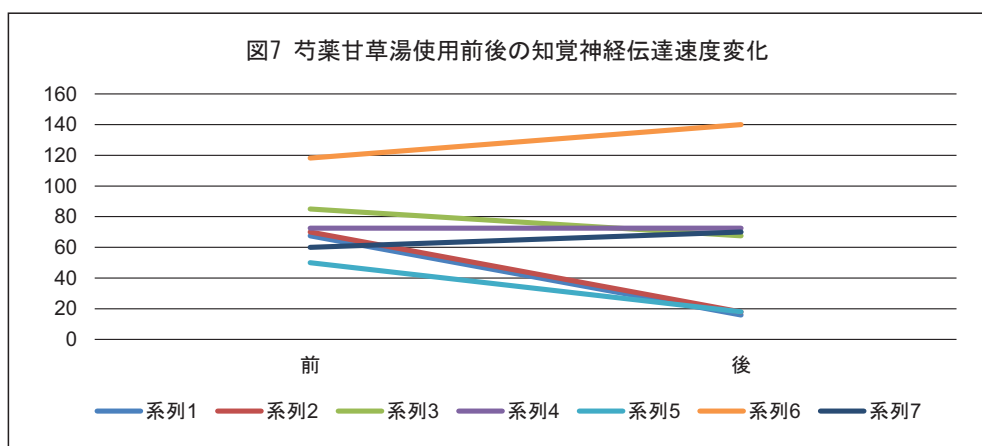
7名の患者における芍薬甘草湯の使用前後での神経伝達速度および自覚症状の変化について検討を行った。



7例のうち、2名は自覚症状の改善、4例は増悪、1例は不変であった。(図5) 服薬前後により、運動神経伝達速度に関して、7例中6例では大きな変化を認めなかった(図6)



一方、知覚神経伝達速度は投与前後で比較して、低下する症例を7例中4例認めた。(図7)



芍薬甘草湯内服の有無でこの知覚神経伝達速度が変化するかを検討するため、同一患者内において、芍薬甘草湯の非服用期間および服用期間の知覚神経伝達時間の変化について、パクリタキセル投与量(mg)あたりで検討した。具体的にはそれぞれの期間に生じた知覚神経伝達時間の差(m/s)を、その期間中に投与したパクリタキセル投与量(mg)で除して算出した。芍薬甘草湯非服用期間では知覚神経伝達時間の変化率が平均で 0.06 ± 0.28 m/s/mgであったのに対し、内服あり群では -0.07 ± 0.15 m/s/mgであり、両群間で差を認めなかった($P=0.2$)また、サーモメーターを用いた足背表面温度について服薬の有無での変化を検討したが、両群間で差を認めなかった(芍薬甘草湯内服なし群 -0.5 ± 0.6 度、内服あり群 -1.4 ± 2.6 度、 $P=0.7$)

また、特に図5で芍薬甘草湯内服により、しびれの自覚症状が改善した2症例において、知覚神経伝達速度および足背温度の変化について明らかな改善傾向を認めなかった。

【考察と今後の展望】

これまで、抗がん剤による痛みや末梢神経障害の評価法は主観的であったが、客観的な評価法を確立し、また芍薬甘草湯による効果が客観的な評価でも証明されれば、臨床的に極めて大きな意義がある。現在、婦人科患者を対象に抗がん剤投与中にしびれの自覚症状のスコアリングおよび神経伝達速度および末梢温度の測定を行っており、症例を蓄積中である。

今回、パクリタキセルの累積投与量の増加につれ、前腕の運動神経伝達速度は変化を認めなかった(図1)が、知覚神経伝達速度が低下する(図2)ことを認めた。また、知覚神経伝達速度としびれの自覚には負の相関傾向を認めた(図3)が、化学療法が交絡因子になっていることも考えられ、症例の蓄積による今後の検討が必要と思われる。

今回、芍薬甘草湯内服による知覚神経伝達速度や足背表面温度の改善は非内服群と比べて差を認めなかった。また、しびれに対する自覚症状の改善は7例中2例と一部の症例にのみ認められた(図5)。これら2症例に関して、知覚神経伝達速度および足背の表面温度は明らかな改善効果を認めなかった。症例数の累積が必要であるが、芍薬甘草湯内服のしびれに対する改善効果は知覚神経や手足表面温度の改善とは異なる機序も想定する必要があるかと思われた。今回は、芍薬甘草湯内服の効果の検討を行ったが、今後、申請代表者の安東らとともに、芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の有効性を検討していきたい。

【学会発表】

なし

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)産婦人科学

吉野 修, 中島 彰俊, 島 友子, 鮫島 梓, 津田 桂

Ⅲ. 「富山県ブランド芍薬」の基盤・臨床研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所

漢方診断学分野 教授 柴原直利

生薬資源科学分野 教授 小松かつ子

高齢化や健康意識の高まりの影響もあり、漢方薬は医療用あるいは一般用医薬品として非常に幅広く用いられている。一方、漢方薬に配合される生薬の約90%は国外からの輸入に依存しており、自然環境の変化などによって生薬の供給が滞る事態も危惧されていることから、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を図る必要があると考えられてきている。頻用生薬の一つである「芍薬」はボタン科のシャクヤク *Paeonia lactiflora* の根を修治したものであるが、その自給率は3.52%程度とされている。富山県は付加価値の高い「富山県ブランド芍薬」を開発する目的で優良品種を選抜し、栽培化を進めてきた。そこで本研究では、富山において栽培可能な薬用植物の有用性を、基礎及び臨床研究の視点から明らかとすることを目的とした。

研究担当者の本年度研究成果の概要を以下にまとめる。

1. シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究

富山県産シャクヤクの根の加工調製法を開発する目的で、富山県薬用植物指導センターで収穫された Paeonol を含有することを特徴とする品種の新鮮根を水洗せずにビニール袋に入れ、冷蔵室(4℃)に保管した35日後に直径1.5~2.0 cm の根を選別し、(1)水洗した後に室内乾燥して保存、(2)水洗した後に除皮し、室内乾燥して保存、(3)水洗・湯通しの後に除皮し、室内乾燥して保存、(4)水洗・湯通し後に室内乾燥して保存、(5)水洗した後に乾燥機で乾燥して保存、(6)水洗した後に除皮し、乾燥機で乾燥して保存、(7)水洗・湯通しの後に除皮し、乾燥機で乾燥して保存、(8)水洗・湯通し後に乾燥機で乾燥して保存、の8通りの加工調製法を行ない、成分含量の変動をHPLCにより検討した。すべての加工調製法において Paeoniflorin 含量は3.23~3.94%と安定して高値を示したが、Albiflorin 含量は0.97~1.26%であり、除皮したものでは低い傾向を示した。湯通し処理については、1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG) 及び Gallic acid 含量については処理群は非処理群に比較して増加し、特に湯通し後に乾燥機により乾燥した群において非常に高い値を示した。一方、Paeonol については、処理群では室内乾燥、乾燥機乾燥のいずれにおいても Paeonol を検出しなかった。

これまでの研究と合わせ、加工調製法の最適化を目的とした成分研究では、Paeoniflorin, Albiflorin, PGG, Gallic acid, 及び Methyl gallate に着目すれば、新鮮根を1ヶ月以上低温貯蔵し、水洗後に湯通し

して、周皮を除かずに30℃で乾燥する方法が適していることが示された。本法は富山県においても実施可能であり、この結果は富山県産芍薬のブランド化に寄与するものと考えられる。

2. 富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の臨床効果に関する研究

富山県ブランド芍薬の腓返り及び月経痛に対する効果を一般市場品芍薬と比較検討した。腓返りに対する効果を20名の被験者（M/F=8/12，平均年齢73.5±4.6歳）を対象に検討したところ、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯（以下、富山芍甘）は服薬期間における腓返り平均発生回数を有意に減少させ、腓返り累計時間・腓返り1回当たりの平均持続時間を有意に短縮させたが、一般市場品芍薬含有芍薬甘草湯（以下、市場芍甘）との比較では両薬剤間に有意な差は認めなかった。しかし、自覚的有用度による評価では、8人が富山芍甘の方が有用と回答したのに対し、市場芍甘の方が有用と回答したのは5人であった。

月経痛に対する効果を20名（平均年齢28.6±5.5歳）の被験者を対象に、富山芍甘と市場芍甘を比較したところ、富山芍甘により月経痛自覚日数は有意に減少し、Visual Analog Scale (VAS) を用いた月経痛の程度の評価においても月経痛 VAS 値累計、疼痛日平均 VAS 値、月経期間平均 VAS 値のすべてが富山芍甘により有意に減少した。しかし、市場芍甘との比較では、これらの指標において両薬剤間に有意差は得られなかった。自覚的有用度による評価では、富山芍甘の方が有用と回答したのは6人であり、市場芍甘の方が有用とした3人であった。

腓返りおよび月経痛に対する効果の検討では富山芍甘と市場芍甘との間に明確な差は得られなかったが、自覚的有用度では富山芍甘が有用であるとする被験者が多くみられた。このことは、富山県産ブランド芍薬が臨床において有用である可能性を示唆するものと考えられる。

Ⅲ－１ 富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の 臨床効果に関する研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所 漢方診断学分野 教授 柴原直利

1. 緒言

超高齢化社会を迎えた今日において、漢方方剤は多種多様な愁訴に対して幅広く用いられている。漢方方剤は一定比率の複数生薬により構成されるが、本邦で使用される生薬の90%強は輸入されたものであり、生薬の供給が滞る事態も危惧されている。

漢方医学の永続性を担保するためには、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を促進する必要がある。本邦で使用される生薬の中でも非常に使用頻度が高い生薬としてボタン科のシャクヤク *Paeonia lactiflora* の根を修治した「芍薬」があるが、そのほとんどは中国から輸入されている。そのような状況の下で、富山県は付加価値の高い「富山県ブランド芍薬」を開発する目的で、園芸用シャクヤクの中から抗炎症、抗酸化作用が優れている優良品種を選抜し、栽培化している。

芍薬甘草湯は、有痛性筋痙攣（＝腓返り）や月経困難症（＝月経痛）などに頻用されており、「富山県ブランド芍薬」の効果を経験的に評価することを目的として、甘草の一般市場品と富山県ブランド芍薬、あるいは芍薬の一般市場品との2生薬により構成される富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯（以下、富山芍甘）と一般市場品芍薬含有芍薬甘草湯（以下、市場芍甘）を用い、腓返り及び月経痛を対象として臨床効果を比較検討した。

2. 腓返りに対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の効果に関する臨床研究

2-1. 対象と方法

(1) 対象

頻回に腓返りが生じることで生活に支障がみられており、少なくとも本研究参加前の3ヶ月間に西洋医学的治療の変更がなく、かつ漢方薬服用歴がない者の中で、本研究への参加について同意の得られた被験者を対象とした。

(2) 薬剤

富山芍甘には富山県ブランド芍薬、及び一般市場品甘草（1日量：富山県ブランド芍薬 2.5g、一般市場品甘草 2.5g）を、市場芍甘には一般市場品芍薬、及び一般市場品甘草（1日量：一般市場品芍薬 2.5g、一般市場品甘草 2.5g）を用いた。水100mLに1日量の生薬を入れて加熱し、75mLにな

るまで煎出したものを濾して煎液を作製し、1日分としてアルミパックに包装したものを作製した。

(3) 服用方法

作製した富山芍甘，あるいは市場芍甘を7日間，1日1回就寝前に服用することとした。投与については封筒法を用いたクロスオーバー方式とし，富山芍甘と市場芍甘服用には4週間の間隔を開けた。

(4) 臨床効果の評価

研究期間中，被検者は臨床症状日誌に1日における腓返り発生回数・持続時間を記載することとした。芍薬甘草湯服用前，服用期間，服用中止後の各7日間について各被験者の平均値を算出して代表値とし，腓返りに対する富山芍甘，及び市場芍甘の効果を比較検討した。また，7日間の服用後に，各被験者は腓返りに対する有用度を「有用」，「やや有用」，「有用ではない」のいずれかで評価した。さらに，全日程後に先に服用した芍薬甘草湯と後に服用した芍薬甘草湯の有用度の相違について，「明らかに先に服用した方が有用」，「どちらかと言えば先に服用した方が有用」，「どちらとも言えない」，「どちらかと言えば後に服用した方が有用」，「明らかに後に服用した方が有用」のいずれかで評価した。

2-2. 結果

(1) 対象者背景

対象者の性差はM/F=8/12であり，平均年齢は73.5±4.6歳であった。基礎疾患に対して西洋医学的薬剤を服用している被験者は18人であった。

(2) 芍薬甘草湯服薬状況

対象とした20人は規定通りに富山芍甘，市場芍甘を各7日間服薬したことが確認された。

(3) 腓返りに対する臨床効果

1) 腓返り発生回数

富山芍甘と市場芍甘はともに服薬期間における腓返り平均発生回数を有意に減少させた。富山芍甘と市場芍甘と比較では，発生回数は富山芍甘が市場芍甘よりも減少していたが，両薬剤間に有意な差は認めなかった（表1・図1-A）。

2) 腓返り持続時間

腓返り累計時間は，富山芍甘と市場芍甘により有意に短縮したが，両薬剤間に有意差は得られなかった。腓返り1回当たりの平均腓返り持続時間も両薬剤により有意な短縮を示したが，両薬剤間に有意な差を認めなかった（表1・図1-B,C）。

3) 自覚的有用度

富山芍甘，あるいは市場芍甘が腓返りに対して有用であったか否かについては，富山芍甘では

表1 富山県ブランド芍薬及び一般市場芍薬含有芍薬甘草湯の腓返りに対する臨床効果

腓返り平均発生回数 (回/日)		服用前	服用中	服用後
	富山芍甘	0.52±0.17	0.31±0.11	0.39±0.13
	市場芍甘	0.49±0.11	0.32±0.10	0.36±0.12

腓返り累計時間 (分/7日)		服用前	服用中	服用後
	富山芍甘	74.0±19.3	35.0±15.4	47.8±16.3
	市場芍甘	66.8±19.5	40.5±16.1	42.5±16.3

腓返り平均持続時間 (分/回)		服用前	服用中	服用後
	富山芍甘	22.83±4.78	16.92±5.26	17.96±2.96
	市場芍甘	19.51±2.70	17.42±3.49	16.90±2.48

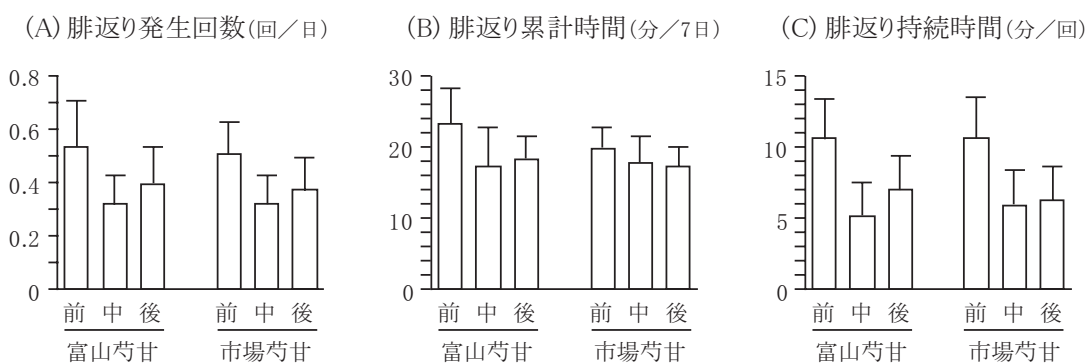


図1 富山県ブランド芍薬及び一般市場芍薬含有芍薬甘草湯の腓返りに対する臨床効果

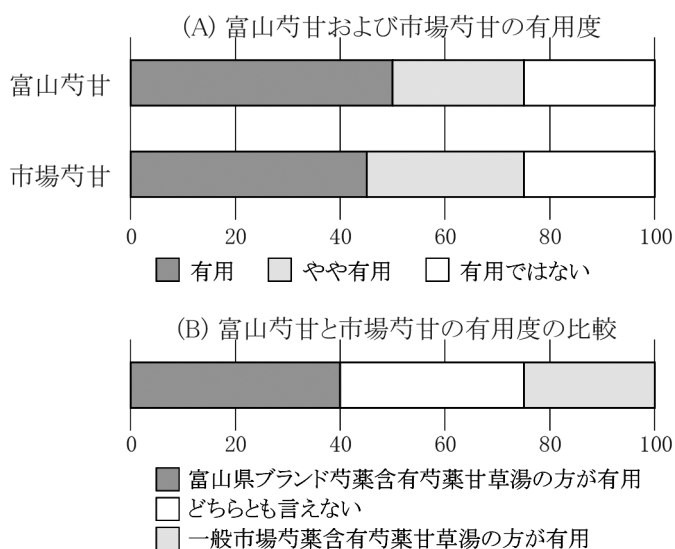


図2 腓返りに対する富山県ブランド芍薬及び一般市場芍薬含有芍薬甘草湯の有用度

20人中10人が「有用」、5人が「やや有用」と回答し、市場芍甘では20人中9人が「有用」、6人が「やや有用」と回答した。また、富山芍甘と市場芍甘との比較では、「明らかに富山芍甘の方が有用」、「明らかに市場芍甘の方が有用」はなく、「富山芍甘の方が有用」は8人、「両薬剤は変わらない」は7人、「市場芍甘の方が有用」が5人であった（図3-A,B）。

3. 月経痛に対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の効果に関する臨床研究

3-1. 対象と方法

(1) 対象

月経周期は順調であるが月経痛が強く、生活に支障がみられている者で、本研究参加前の6ヶ月間に経口避妊薬の使用歴がなく、3ヶ月間に漢方薬服用歴がない者の中で、本研究への参加について同意の得られた被験者を対象とした。

(2) 薬剤作製

富山芍甘には富山県ブランド芍薬、及び一般市場品甘草（1日量：富山県ブランド芍薬 5.0g、一般市場品甘草 5.0g）を、市場芍甘には一般市場品芍薬、及び一般市場品甘草（1日量：一般市場品芍薬 5.0g、一般市場品甘草 5.0g）を用いた。水200mLに1日量の生薬を入れて加熱し、100mLになるまで煎出したものを濾して煎液を作製し、1日分としてアルミパックに包装したものを作製した。

作製した富山芍甘、あるいは市場芍甘を月経開始日から終了日まで、1日2回服用することとした（基本的には朝食前・夕食前に服用）。試験薬剤の服用順は封筒法を用いたクロスオーバー方式で決定した。

(3) プロトコール・薬剤服用方法

研究開始後の最初の月経時を無服薬の観察期とし、次の月経時より作製した富山芍甘、あるいは市場芍甘を月経開始日から終了日まで、1日2回服用とした（基本的には朝食前・夕食前に服用）。試験薬剤の服用順は封筒法を用いたクロスオーバー方式で決定した。尚、疼痛程度が非常に強い際にはサリチル酸系鎮痛剤（カロナール 200mg/日）を1日に1回のみ服用可とし、服用の有無を臨床症状日誌に記載することとした。

(4) 臨床効果の評価

研究期間中、被験者は1日における月経痛の程度を就寝前に評価し、臨床症状日誌の評価表にある Visual Analog Scale (VAS) を用い、最大疼痛程度を100として記載することとし、月経痛に対する富山芍甘、及び市場芍甘の効果と比較検討した。また、薬剤服用後に、月経痛に対する有用度を「有用」、「やや有用」、「有用ではない」のいずれかで評価した。さらに、全日程後、先に服用した芍薬甘草湯と後に服用した芍薬甘草湯の有用度の相違について、「明らかに先に服用した方が有用」、「どちらかと言えば先に服用した方が有用」、「どちらとも言えない」、「どちらかと言えば後に服用

した方が有用」, 「明らかに後に服用した方が有用」のいずれかで評価した。

3-2. 結果

(1) 対象

対象は20人の女性（平均年齢は 28.6 ± 5.5 歳）であり，観察期において鎮痛薬の服用を要した被験者は5名であった。富山芍甘，あるいは市場芍甘の服用は規定通りに実施され，芍薬甘草湯服用期間に鎮痛剤の服用を要した被験者はいなかった。

(2) 月経痛に対する臨床効果

1) 月経痛自覚日数

月経日数は観察期・富山芍甘服用期・市場芍甘服用期において有意な差はみられなかったが，月経痛自覚日数は両薬剤とも服用により有意に減少していた。しかし，富山芍甘と市場芍甘の間に有意な差はみられなかった。（表2・図3-A）

2) 月経痛の程度

富山芍甘，あるいは市場芍甘により月経痛VAS値累計，疼痛日平均VAS値，月経期間平均VAS値のすべてが有意に減少した。しかし，富山芍甘と市場芍甘の比較では，これらの指標において両薬剤間に有意差は得られなかった（表2・図3-B,C,D）。

3) 自覚的有用度

富山芍甘，あるいは市場芍甘が月経痛に対して有用であったか否かについては，富山芍甘では20人中8人が「有用」，4人が「やや有用」と回答し，市場芍甘では20人中7人が「有用」，5人が「やや有用」と回答した。また，富山芍甘と市場芍甘との比較では，「明らかに富山芍甘の方が有用」，「明らかに市場芍甘の方が有用」はなく，「富山芍甘の方が有用」は6人，「両薬剤は変わらない」は11人，「市場芍甘の方が有用」が3人であった（図4-A,B）。

表2 富山県ブランド芍薬及び一般市場芍薬含有芍薬甘草湯の月経痛に対する臨床効果

	観察期	富山芍甘	市場芍甘
月経日数（日）	6.00 ± 0.70	5.90 ± 0.79	6.00 ± 0.643
月経痛自覚日数（日）	5.30 ± 0.86	4.60 ± 0.50	4.75 ± 0.91

	服用前	服用中	服用後
月経痛VAS値累計	255.4 ± 49.9	153.9 ± 51.0	166.3 ± 34.6
疼痛日平均VAS値	48.5 ± 7.9	33.3 ± 10.0	35.1 ± 5.9
月経期間平均VAS値	42.5 ± 6.2	26.52 ± 9.8	28.0 ± 6.3

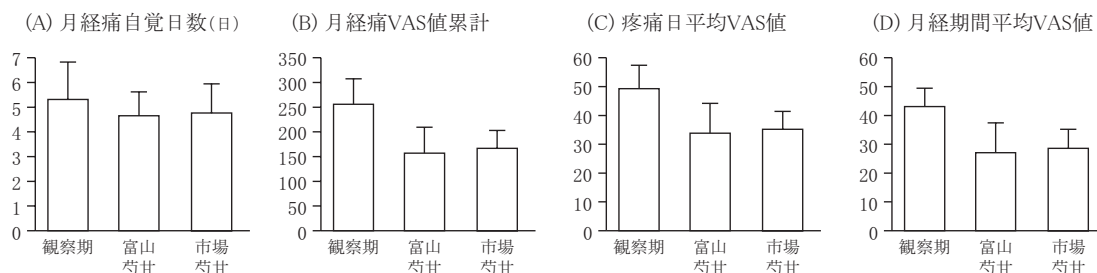


図3 富山県ブランド芍薬及び一般市場芍薬含有芍薬甘草湯の月経痛に対する臨床効果

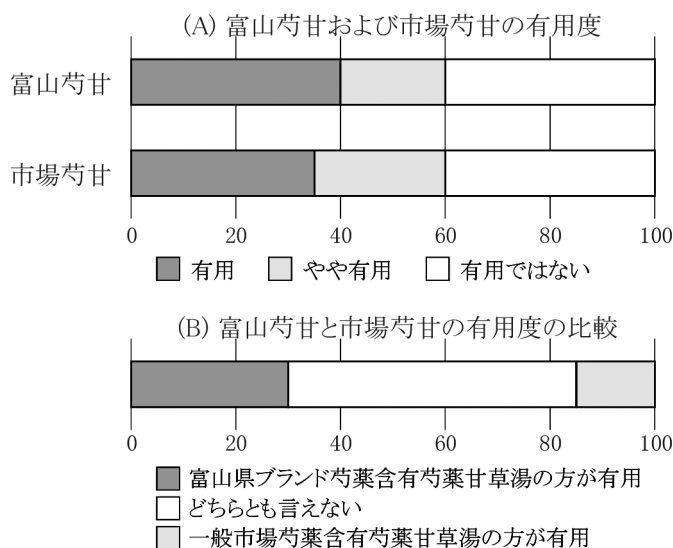


図4 月経痛に対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の有用度

4. 考察・結論

富山県ブランド芍薬の薬効について、芍薬と甘草のみを構成生薬とする芍薬甘草湯を用いて評価した。腓返りに対する効果では、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯により腓返り発生回数・持続時間が有意な減少を示し、腓返りに対して富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯は有効と判断された。一般市場芍薬との比較では、発生回数・持続時間ともに平均値は富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯の方がより減少していたが、有意差は認めなかった。しかし、自覚的な有用度では、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯が有用とした被験者は8人であり、一般市場芍薬含有芍薬甘草湯が有用とした5人よりも多かった。

月経痛に対する効果については、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯により月経痛自覚日数と月経痛VAS値に有意な改善が得られ、月経痛に対しても富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯は有効と判断された。しかし、月経痛においても、一般市場芍薬との間に有意差は得られなかった。自覚的な有用度では、富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯が有用とした被験者は6人で、一般市場芍薬含有芍薬甘草湯が有用とした3人よりも多かった。

以上のことから、腓返りおよび月経痛に対する富山県産ブランド芍薬の効果を検討したところ、明確な差は得られなかったが、自覚的な有用度では富山県産ブランド芍薬の方が一般市場芍薬よりも有用であるとする被験者が多くみられた。

Ⅲ－２ シャクヤク品種の選品と加工法の最適化に関する研究

富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野 教授 小松かつ子, 助教 朱 妹

【緒言】

漢方方剤に配合される生薬は79%を中国に、11%をその他の外国に依存しており、日本産生薬は10%に過ぎない¹⁾。しかし近年、薬用人参など一部の生薬で価格が高騰し、生薬全体でも8年前に比べ約3倍の価格上昇が見られたことなどから、国内栽培の気運が高まり、厚生労働省、農林水産省の支援のもとに各地で薬用植物の栽培が行われるようになった。しかし、種苗の確保、栽培の機械化を含めた栽培方法の確立、品質面での有効性・安全性・安定性の確保など、解決すべき課題も多い。

富山県では、富山県薬用植物指導センターが中心になって、古来奈良県で開発され、栽培されてきた薬用シャクヤクの品種「梵天」が導入され、増殖に努められてきた。農家に対する栽培指導も行われ、現在多くの農家でこの品種が栽培され、4年後に掘り起こされて、それらの根が奈良県へ出荷されている。奈良県ではこれらの根を屋外で乾燥、調製した後、「大和芍薬」の名称で日本全国に出荷しており、この時点で富山産シャクヤクの名称は失われてしまう。

日本漢方生薬製剤協会による原料生薬使用量等調査報告書¹⁾によると、生薬「芍薬」の平成24、25、26年度の国内使用量は1,489,161 kg、1,544,568 kg、1,463,883 kgであり、そのほとんどにあたる1,407,825 kg、1489,674 kg、1,447,016 kgが中国からの輸入品で、日本産芍薬は81,336 kg、54,894 kg、16,867 kgと6%未満であり、平成26年度は1.2%に過ぎない。

芍薬はボタン科のシャクヤク *Paeonia lactiflora* Pallas の根を基原とし、鎮痛、鎮痙、収斂薬として使用される生薬で、漢方方剤の約1/3に配合されており、今後も需要が見込まれる。シャクヤクの国内生産が進めば中国産の芍薬に取って変わることも可能であろうが、現在価格面で劣位に立っており、中国産芍薬にない付加価値が望まれるところである。

中国から輸入される芍薬は『中華人民共和国薬典』²⁾で規定されている「白芍」に相当するものであり、*P. lactiflora* の根を湯通しした後外皮を除去するかあるいは外皮を取り除いて湯通しした後に乾燥されたものである。中国ではさらに根を白く見せるため、古来の調製法である硫黄による薫製が行われることがある。この証拠は Paeoniflorin タイプのモノテルペノイドの減少と、それらの Sulfonate 体の生成として現れることが知られており、我々の研究において中国で購入した白芍にこの現象が認められた^{3,4)}。一方、日本に流通する中国産芍薬には認められなかったことから、日本の生薬関連企業は中国南部の諸省に赴いてその地で栽培されている *P. lactiflora* に対して根の加工法を

指示して芍薬を仕上げ、それらを輸入しているものと推察される。

日本における医薬品のレギュレーションを担っている『日本薬局方』⁵⁾では芍薬の基原が *P. lactiflora* の根であることが規定されているとともに、Paeoniflorin 含量が2.0%以上とされている。これにより硫黄薫製品をある程度除外できるが、一部、硫黄薫製品であっても Paeoniflorin 含量2.0%以上を満足するものが存在する³⁾。硫黄薫製品の有害作用については報告がないが、安全性の面からはこれらの使用を避けたいところである。

一方、中国では白芍とは別に、駆瘀血薬（血液循環改善、抗炎症薬等）とされる赤芍がある。『中華人民共和国薬典』では「赤芍」は *P. lactiflora* または *P. veitchii* Lynch の根を乾燥したものであると規定されているが、近年は多くの赤芍が内蒙古自治区から産出される野生の *P. lactiflora* 由来である。日本では医師からの要望がない限り、赤芍を輸入することはほとんどないが、日本薬局方の基準を満たせば医薬品として使用できるものであり、白芍にない薬効を有するものであれば、芍薬の可能性を広げる意味で興味深い生薬である。

当研究室では *P. lactiflora* に由来する日本産芍薬、中国産白芍及び中国産赤芍について、遺伝子多型、成分組成及び薬理活性の面から同等性または相違性を明らかにする研究を行ってきた。これまでに、日本産芍薬と中国産白芍は同様の ITS 塩基配列タイプを示すグループに所属するが、中国産赤芍はこれらとは別のグループであることを明らかにした。また、主要な8成分の定量結果から、両者は成分的にも異なることを見出した³⁾。さらに、抗アレルギー作用（RBL-2H3 細胞における抗原刺激脱顆粒抑制作用）の検討から、中国産赤芍のみに活性を見出している⁶⁾。

以上で述べた芍薬に関する日本及び中国市場の状況と研究の結果を受けて、次に、富山県において、現在栽培されている薬用品種「梵天」のほかに、付加価値の高いブランド芍薬を開発する目的で、富山県薬用植物指導センターと共同で、同センターが保有する園芸用シャクヤク約70品種の根を材料にして、生薬と同様の検討を行った。遺伝子解析により各品種を白芍系と赤芍系に分類したのち、LC-MS によるモノテルペノイドのプロファイル解析と15成分の定量分析及び多変量解析⁴⁾を行い、その結果に基づいて日本産芍薬及び中国産赤芍に類似した成分組成を持つものをそれぞれ3品種選抜した。さらに17品種について抗アレルギー作用を検討したところ、赤芍系として選抜した3品種のうち2品種（A, B）に活性が見出された⁷⁾。

これら2品種を、「梵天」とともに富山県で栽培し、これらの根を「富山芍薬」としてブランド化するためには、富山県内で実施可能な加工調製法を開発することが不可欠である。そこで、本研究ではこれら3品種を材料にして、優れた品質を担保し、安定化させるための加工調製法の最適化を行う。

【目的】

富山県で栽培されるシャクヤクの品種の根について、高品質を保つための加工調製法を開発する目的で、様々な貯蔵・加工・乾燥法を行った根の成分分析を行う。平成26年度は、栽培4年目の薬用品種「梵天」の根を用いて15通りの貯蔵・加工・乾燥法を行い、加工調製法の違いによる主要8成分(図1)の含量の変化を検討した結果、新鮮な根を約1ヶ月間低温貯蔵し、水洗後、湯通しして、周皮を竹べらで除き、乾燥機(30℃)で乾燥する方法が最も良い成分含量を示した。すなわち、新鮮な根を低温貯蔵することにより、Paeoniflorin含量が安定し、結果として高含量に繋がった。また、湯通し加工により、1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG), Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が顕著に増加した。この結果を受けて平成27年度は、「富山芍薬」の候補品種として選抜した品種Aの栽培5年目の新鮮根について、約1ヶ月間低温貯蔵した後に8通りの加工調製法(図2:新たに、湯通しした後、周皮を付けたまま室内または乾燥機で乾燥する2通りの方法を増やした)を検討した。その結果、新たに加えた方法でPGG含量が増加する傾向が見られた。今年度は、Paeonolが含有されることに特徴のある品種Bの新鮮根を用いて、昨年度と同様に8通りの加工調製法を行い、成分含量の変動を調べた。

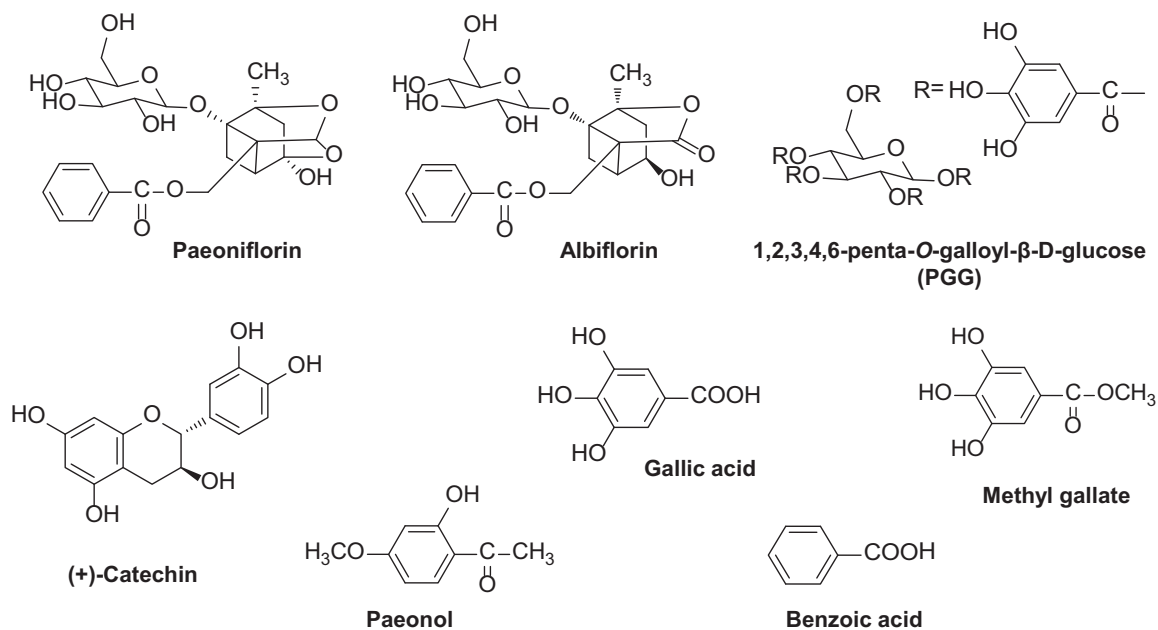


図1 定量分析に用いた成分の構造式

【実験材料及び加工調製法】

富山県薬用植物指導センターで収穫された栽培8年目の品種Bの根を材料とした(平成26年11月12日入手)。収穫後の根をビニール袋に入れ、冷蔵室(4℃)に保管した。35日後、冷蔵室から取り出し、直径1.5~2.0 cmの根を選別し、それらを均等に8グループに分けた(5個体/グループ)。8グ

ループの根に対してそれぞれ 8 通りの加工・乾燥法 (図 2) を行った。加工終了後、各グループ 5 個体の根についてそれぞれ 8 成分の含量を測定した。

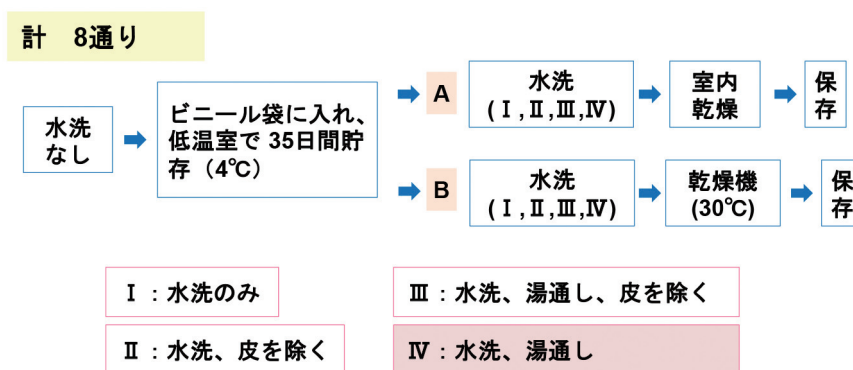


図 2 収穫した新鮮な根について行った加工・乾燥法

【定量分析】

標準品 : Paeoniflorin (Wako Pure Chem. Inc.), Albiflorin (Wako Pure Chem. Inc.), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG) (Toronto Research Chem. Inc.), (+)-Catechin (Cayman Chem. Inc.), Paeonol (Wako Pure Chem. Inc.), Gallic acid (Nacalai Tesque Inc.), Methyl gallate (ChromaDex.), Benzoic acid (Nacalai Tesque Inc.) を用いた。

試薬 : HPLC 用移動相は、LC/MS グレードのアセトニトリル及び超純水 (Wako Pure Chem. Inc.), LC グレードのリン酸 (Wako Pure Chem. Inc.) を用いた。

測定装置 : Jasco HPLC システム (Pump: PU-1580, Gradient unit: LC1580-02 ternary gradient unit, Auto sampler: AS-2057 Plus, Dectector: MD-1510 Multiwavelength Detector) ; カラム: YMC-Pack ODS-AQ, 250 \times 4.6 mm, i.d., s-5 μ m ; 移動相: A : アセトニトリル, B : 0.1%リン酸水溶液。

HPLC 条件 : 0-5 min, 10-15% A, 5-40 min, 15-30% A, 40-45 min, 30-70% A, 45-46 min, 70-80% A, 46-50 min, 80% A; for wash, 50-55 min, 80-10% A , 55-65 min, 10% A; for initial stabilization。注入量: 20 μ L ; 流速: 1 ml/min ; カラム温度: 27 $^{\circ}$ C ; 検出波長: 232 nm。データ処理プログラム: ChromNAV。

検量線の作成 : 8 化合物の標準品 [Paeoniflorin, Albiflorin, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG), (+)-Catechin, Paeonol, Gallic acid, Methyl gallate, Benzoic acid] を各々正確に量り取り、分析用メタノールに溶解して 1.0 mg/ml の標準溶液を調製した。この溶液を 5, 10, 50, 100, 500 倍と段階的に希釈して調製した 1.0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.002 mg/ml の溶液を HPLC で分析し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

試料溶液の調製 : 乾燥した根を粉碎し、300 μ m の篩を通した。得られた粉末 300 mg を正確に量り取り、遠心チューブに入れ、75% エタノール 9 ml を加えて、30 分間超音波抽出を行った。遠心分離した (10 min, 4000 rpm) 後、上澄み液を分取した。以上の抽出操作をさらに 2 回 (8 ml, 8 ml) 繰り返した

後、全上澄み液を合せて25 mL にメスアップした。そのうち約 2 ml を DISMIC-13HP disposable syringe filter 0.2 μm (東洋濾紙) でろ過して HPLC 用バイアルに入れ、分析用の試料とした。これらについて、前述した HPLC 条件で 8 成分の定量を行った。

【結果】

各グループ 5 個体のそれぞれについて 8 成分の定量分析を行った。個体間である程度の成分含量のばらつきがあったものの、太さを揃えたことによりばらつきが補正されており、同じ調製法を行った同一グループの 5 個体においては同じ傾向を示した。Paeoniflorin の含量は 3.23~3.94% で、異なる加工調製法を行った全てのグループが安定して高い値を示した。Albiflorin 含量は 0.97~1.26% で、周皮を去ったグループでわずかに低い傾向が見られた。湯通し処理を行った A-IV, -III 及び B-IV, -III では、処理を行わなかった A-I, -II 及び B-I, -II に比べて、PGG 及び Gallic acid の含量がそれぞれ約 2.5 倍及び約 4 倍増加しており、皮付き品の IV はともに皮去り品の III よりわずかに高い値を示した。特に乾燥機において 30°C で乾燥を行った B-IV で 2 成分の含量が高く、0.35% と 0.08% であった。一方、微量存在した Paeonol は湯通し処理を行った III, IV では A, B のいずれの乾燥法においても検出できなかった。以上、Paeonol 以外の結果は、品種 A を用いて行った昨年度の結果と同様であった。

【考察】

平成 26 年度から 3 年間にわたり、材料として「梵天」、品種 A 及び品種 B の根を用いて、15 通りまたは 8 通りの加工調製法を行い、薬効に関与する成分を含む 8 成分の含量の変動を調べた。その結果、新鮮な根を 1 ヶ月以上低温貯蔵することにより Paeoniflorin 含量が安定すること、加えて湯通し処理を行うことにより PGG 及び Gallic acid (Methyl gallate が存在する「梵天」ではこれを含めて) の含量が顕著に増加することを明らかにした。さらに PGG の含量は、低温貯蔵した根を湯通し処理したものでは、周皮を付けたまま乾燥した方が周皮を除いてから乾燥したものより、また室温での自然乾燥より 30°C で乾燥した方がやや高い傾向を示した。一方、品種 B に存在した Paeonol は湯通し処理により消失した。Albiflorin 含量は周皮を除くことによりわずかに減少する傾向があった。(+) -Catechin については低温貯蔵したものでは加工調製法による含量の変化がほとんど認められなかった。以上の結果から、Paeoniflorin, Albiflorin, PGG, Gallic acid 及び Methyl gallate に着目するのであれば、新鮮な根を 1 ヶ月以上低温貯蔵し、水洗後湯通しして、周皮を除かずにそのまま 30°C で乾燥する方法が適している。ただし、PGG ではなく精油成分の Paeonol に着目するのであれば、湯通し処理は避けた方がよい。中国産赤芍は、加工の過程で湯通し処理をする白芍とは異なり根をそのまま乾燥するが、その理由として駆瘀血薬としての薬効発現にはこの加工法が適しており、それは赤芍 (中国北方産 *P. lactiflora*) に含有される Paeonol と関連する可能性が考えられる。なお、Paeonol は牡丹皮に多く、

婦人科疾患に応用される漢方方剤ではしばしば芍薬と同時に配合される。

次に、新鮮な根を1ヶ月以上低温貯蔵し、水洗後湯通しして、周皮を除くまたはそのまま30℃で乾燥する方法で調製した「梵天」、品種 A、品種 B を比較した。その結果、Paeoniflorin 及び Albiflorin 含量については、品種 B > 品種 A > 梵天の順であり、(+)-Catechin 含量については品種 A > 品種 B > 梵天の順であった。PGG 含量についてはほぼ同様であったが、梵天には Methyl gallate も存在する。また、品種 B には Paeonol が存在する。

我々は RBL-2H3 細胞を用いた実験で中国産赤芍、品種 A 及び品種 B の熱水抽出エキスに抗原刺激脱顆粒抑制作用を見出しており、中国産赤芍及び品種 B については活性成分の探索研究を行った^{6,7)}。その結果、Paeoniflorol, Paeoniflorin タイプのモノテルペノイドの salicylpaeoniflorin と galloylpaeoniflorin 及び mudanpioside E, フラボノイドの quercetin, 及びフェノール類の Methyl gallate と PGG に中程度の脱顆粒抑制作用を見出している。この抗アレルギー作用が「富山芍薬」の特徴となる可能性を想定して、今後、PGG, Methyl gallate 以外の成分について、加工調製法による変動を LC/MS 分析により調べ、今回最適とした方法がこれらの成分に与える影響を検討する予定である。

「梵天」は薬用に特化した品種であり、栽培のし易さ、根の収穫量と乾燥歩留まりなどの点で優れているとされる。一方、品種 A と品種 B は切り花用の園芸品種であり、今後切り花用と薬用の両方に使用できる可能性がある。本研究において、加工調製法による 8 成分の含量変化が明らかになり、最適化に示唆を与え、さらに個々の成分特性が明らかになったことから、今後は品種 A のほか品種 B についても日本薬局方の試験を行い、芍薬としての規格を満足することを証明した後、臨床試験に供して、品種 A 及び品種 B 由来の芍薬について、梵天由来の芍薬と比較しながら臨床知見が蓄積されることが望まれる。

【正誤】 平成27年度の報告書で、臨床研究に用いられた品種 A を基原とする「富山芍薬」の定量分析結果を報告したが、誤りがあったのでここで訂正する。結果は次のとおり；Paeoniflorin: 3.08%, Albiflorin: 1.15%, PGG: 0.31%, (+)-Catechin: 0.35%, Gallic acid: 0.07%, Benzoic acid: 0.01% (平均値)。

【結論】

富山県で広く栽培されている薬用品種の「梵天」、及び富山ブランド芍薬の候補として選抜した園芸品種 A と園芸品種 B の根を用いて、加工調製法の最適化を目的とした成分研究を行った。その結果、新鮮な根を1ヶ月以上低温貯蔵し、水洗後湯通しして、周皮を除かずにそのまま30℃で乾燥する方法が、Paeoniflorin, Albiflorin, PGG, Gallic acid 及び Methyl gallate 含量において最適であった。また、(+)-Catechin 含量についてもこの方法で問題がなかった。ただし、品種 B に存在する Paeonol は湯通し処理で消失した。以上から、Paeonol に着目しない限りは、今回設定した加工調製法が、芍薬とし

て有効で安定的な品質を得るために最適な方法である。本法は富山県においても実行できることから、今後はスケールを拡大した研究を産官学で協力して行い、「富山芍薬」の実現を図りたいと考えている。

引用文献

1. 日本漢方生薬製剤協会生薬委員会編, 原料生薬使用量等調査報告書(4) —平成25年度および26年度の使用量, 2017, p.6.
2. 国家薬典委員会編, 『中華人民共和国薬典』, 2015年版, 第一部, 中国医薬科技出版社, 北京, 2015, p.105 (白芍), 158-159 (赤芍).
3. Zhu S., Yu X. L., Wu Y. Q., Shiraishi F., Kawahara N., Komatsu K.: Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from *Paeonia lactiflora*, J. Nat. Med., 69: 35-45, 2015.
4. Shi Y. H., Zhu S., Toume K., Wang Z., Batkhui J., Komatsu K.: Characterization and quantification of monoterpenoids in different types of peony root and the related *Paeonia* species by liquid chromatography coupled with ion trap and time-of-flight mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal., 129 : 581-592, 2016.
5. 厚生労働省編, 『第十七改正日本薬局方』, 東京, 2016, p.1817-1818.
6. Shi Y. H., Zhu S., Ge Y. W., He Y. M., Kazuma K., Wang Z. T., Yoshimatsu K., Komatsu K.: Monoterpene derivatives with anti-allergic activity from red peony root, the root of *Paeonia lactiflora*. Fitoterapia, 108: 55-61, 2016.
7. Shi Y. H., Zhu S., Tamura T., Kadowaki M., Wang Z. T., Yoshimatsu K., Komatsu K.: Chemical constituents with anti-allergic activity from the root of *Edulis Superba*, a horticultural cultivar of *Paeonia lactiflora*. J. Nat. Med., 70: 234-240, 2016.