

平成26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<br>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<br>教授 村 口 篤                                     |    |
| I-2 がん特異的T細胞検出システムの改良 .....   | 6  |
| 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座<br>助教 小 林 栄 治                                   |    |
| I-3 T細胞抗原探索システムの開発 .....  | 9  |
| 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座<br>准教授 岸 裕 幸                                    |    |
| I-4 ウサギISAACを用いた抗体開発 .....  | 11 |
| 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座<br>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<br>ペオニフロリン含有外用薬の開発 .....                    | 14 |
| 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<br>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 ..... | 16 |
| 富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学) 応用薬理学<br>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<br>芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験 .....            | 20 |
| 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 産婦人科学<br>教授 齋 藤 滋                                     |    |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Ⅲ. 「富山県ブランド芍薬」の基盤・臨床研究 .....       | 23 |
| Ⅲ-1 富山県産芍薬の品質評価にかかる臨床研究 .....      | 25 |
| 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 ..... | 29 |
| 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26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26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，① T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（小林栄治氏），③ T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26年度受託研究課題

| 班  | 研究者              | 研 究 課 題  |
|--|------------------|--|
| I<br>T細胞医薬創出のための基盤技術の開発・<br>T細胞医薬創出の医療に資する抗体医薬の開発  | I-1<br>村 口 篤     | T細胞ISAACの開発  |
|  | I-2<br>小 林 栄 治   | がん特異的T細胞検出システムの改良  |
|  | I-3<br>岸 裕 幸     | T細胞抗原探索システムの開発   |
|  | I-4<br>小 澤 龍 彦   | ウサギISAACを用いた抗体開発   |
| II<br>フロリン含有外用薬の開発<br>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 | II-1<br>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<br>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<br>「富山県ブランド芍薬」の基盤・<br>臨床研究                     | III-1<br>柴 原 直 利 | 富山県産芍薬の品質評価にかかる臨床研究  |
|  | III-2<br>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 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）を開発し（図1）（Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012）、また、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）を開発した（図2）（Kobayashi E et al, 2013; Kobayashi E et al, 2014）。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。

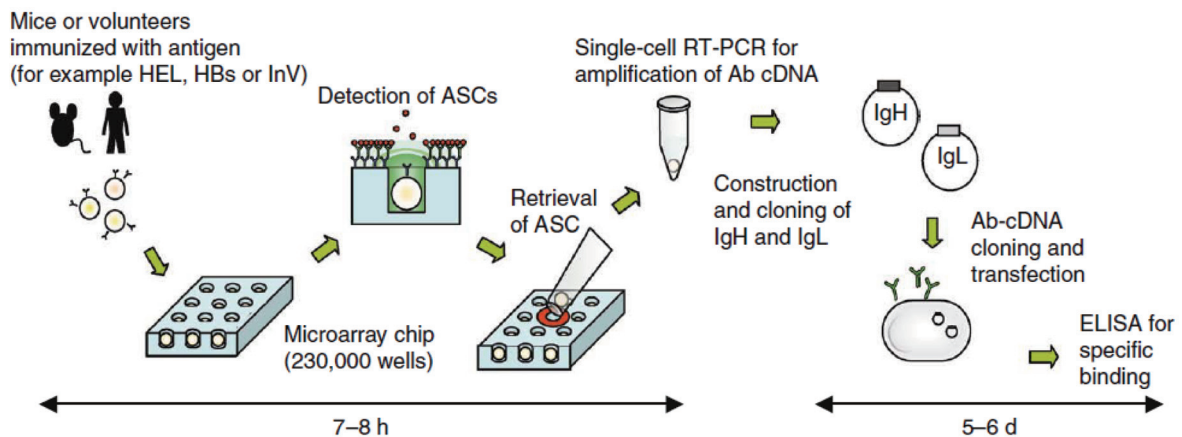


図1 ISAAC法（Jin A et al, Nature Medicine, 2009より転載）

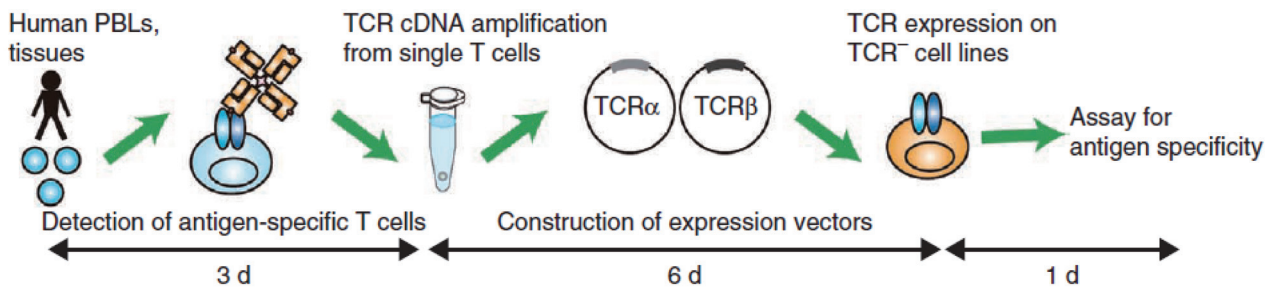


図2 hTEC10法 (Kobayashi E et al, Nature Medicine, 2013より転載)

### 【各班の概要】

村口は、TCR トランスジェニックマウスのT細胞を用いて、細胞チップ上で抗原ペプチドに特異的なT細胞を検出できること、すなわちT細胞ISAAC法が実質的に機能することを示した。

小林、浜名は、hTEC10法では、従来ペプチドを用いて抗原ペプチド特異的TCRを取得していたが、それを応用し、内在的に抗原が発現している抗原提示細胞に反応し、活性化されたT細胞から、抗原特異的TCRを取得できる可能性を示した。

岸は、抗原が未知のTCRの抗原を同定するためのレポータ細胞を構築し、モデルシステムでレポータ細胞が機能することを示した。

小澤は、ウサギISAACシステムを用いて、がんの増殖に關与するErbB2、特にリン酸化されたErbB2分子に対する抗体を作製するために、ウサギを免疫し、リン酸化ErbB2分子に対する抗体がウサギ血清中に産生されていることを確認した。

### 【結論】

以上、各研究班は計画に沿ってほぼ順調に成果を挙げている。本課題を進めていくことで、がん患者のリンパ球より、がん治療のためのTCR遺伝子を迅速・確実に取得・作製することができるようになり、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も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 免疫学講座 教授 村口 篤

## 【研究目的】

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ウ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細胞を検出できることを示唆するデータを得ている。今後、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リンパ球の検出する方法を確立することを目的とする。今年度は、抗原が既知のTCRトランスジェニックマウスのT細胞を用いて、T細胞ISAAC法を確立することを目的に研究を行った。

## 【方法】

### 1) 細胞チップ

図3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4.5万个から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。

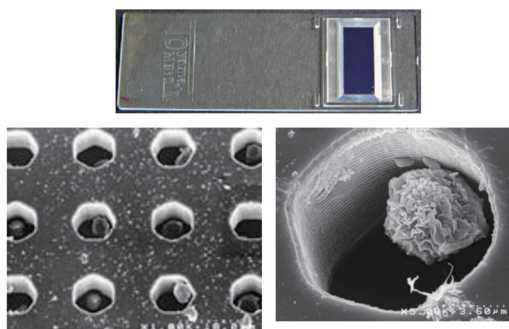


図3 マイクロウェルアレイチップ

(上) マイクロウェルアレイチップの全体像。(下左) マイクロウェルが規則正しく配置されている電子顕微鏡像。(下右) 1個のリンパ球がマイクロウェルに入っている電子顕微鏡像。

## 2) T細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウス

本年度は、T細胞 ISAAC に用いる細胞として、ほとんどの T細胞が、特定の抗原に特異的な 1種類 の TCR を発現している TCR トランスジェニックマウスのリンパ球を用いた。すなわち、雄特異的タンパク質由来ペプチドが H-2D<sup>b</sup> 分子の上に結合している複合体を認識する TCR を発現している H-Y TCR トランスジェニックマウスと、卵白アルブミン由来ペプチドが H-2K<sup>b</sup> 分子の上に結合している複合体を認識する OT-1 TCR トランスジェニックマウスである。

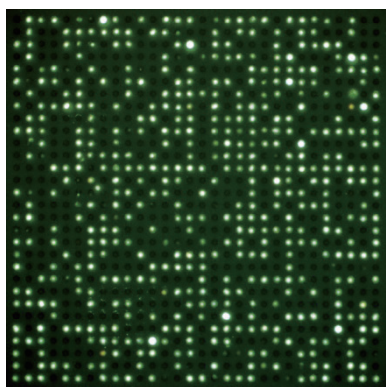
## 3) T細胞-ISAAC

細胞チップの表面に、サイトカイン特異的抗体 (IL-2 特異的抗体, IFN- $\gamma$  特異的抗体等) をコートし、その後、余分なタンパク質が非特異的に結合しないよう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生きた TCR トランスジェニックマウス由来 CD8 陽性 T細胞を播種し、ウェルに入らなかった余分な細胞を洗い去った。これにより、生きた T細胞が各ウェルに 1個ずつ配置される。その後、チップ上に抗原であるペプチドを加え、約 6 時間培養した。この 6 時間の間に T細胞が抗原で刺激され、サイトカインを分泌する。分泌されたサイトカインはウェルからチップの表面へ拡散していき、チップ表面にコートされたサイトカイン特異的抗体にトラップされる。次に、蛍光標識された別のサイトカイン特異的抗体を加え、チップ表面にトラップされているサイトカインに結合させる。その蛍光標識サイトカイン特異的抗体の結合を蛍光顕微鏡で観察する。

### 【結果】

#### 1) 1個のウェルへの単一細胞の導入

図 4 は、T細胞をチップに播種し、ウェルに入らなかった細胞を洗浄により洗い去った後、ウェルに残った細胞を、生細胞内で蛍光を発するオレゴングリーンを用いて蛍光標識し、それを蛍光顕微鏡



を用いて観察したものである。図中の白っぽく光っている丸い点の 1つ1つが 1個の細胞を示している。この図のように、マイクロウェルアレイチップを用いると、生きた T細胞を 1個 1個分離された状態でチップ上に配置できることが示された。

図 4 マイクロウェルアレイチップ上への生きた Tリンパ球の配置

#### 2) T細胞 ISAAC 法による抗原特異的 T細胞の検出

まず、OT-1 TCR トランスジェニックマウスの CD8 陽性 T細胞を図 4 のようにチップ上に播種した。次にチップ上の細胞に OT-1 ペプチドを添加し、約 6 時間培養後、抗原特異的にサイトカインの分泌が誘導されるかどうかを検討した。その結果、図 5 に示されているように、抗原刺激によりサ

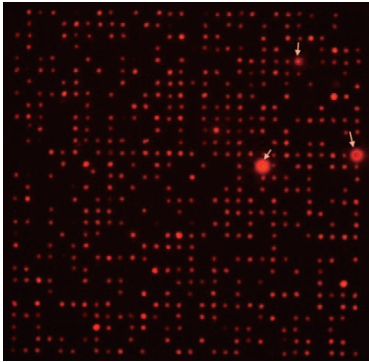
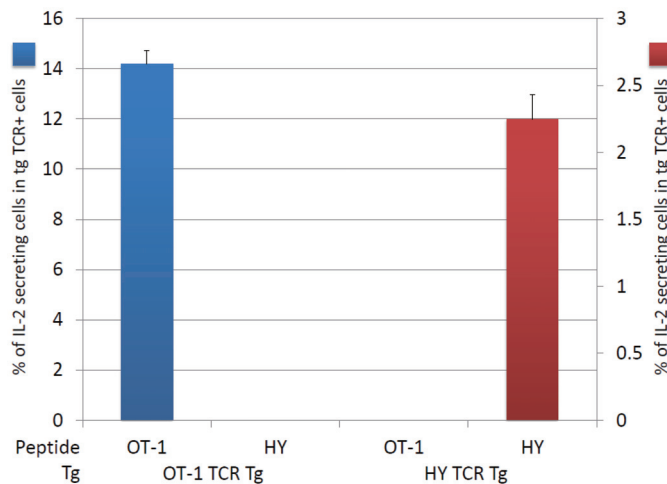


図5 T細胞ISAAC法によるT細胞からの抗原特異的サイトカイン分泌の検出

イトカインの分泌が観察された。図で小さいオレンジ色の点はウェルに配置された細胞を示している。白い矢印で示されている細胞の周囲に広がっているスポットが1個の細胞から分泌されたサイトカインを蛍光標識サイトカイン特異的抗体で検出した像である。抗原ペプチドを加えない場合には、このようなスポットは全く観察されなかった。また、抗原ではないH-Yペプチドを添加した場合もスポットは全く観察されなかった。

次に、H-Y TCR トランスジェニックマウスの CD8 陽性 T 細胞を同様に細胞チップに播種し、H-Y ペプチドと OT-1 ペプチドを用いて刺激し、サイトカインの分泌を細胞チップ上で観察した。その結果、図6に示すように、H-Y TCR トランスジェニックマウスの T 細胞は H-Y ペプチド刺激によりサイトカインを分泌したが、OT-1 ペプチドではサイトカインの分泌が全く観察されなかった。



果、図6に示すように、H-Y TCR トランスジェニックマウスの T 細胞は H-Y ペプチド刺激によりサイトカインを分泌したが、OT-1 ペプチドではサイトカインの分泌が全く観察されなかった。

図6 T細胞ISAAC法による抗原特異的サイトカイン分泌細胞の検出

### 【考察・結論・今後の展望】

TCR トランスジェニックマウスの T 細胞を用いた解析より、抗原に特異的に反応し、サイトカインを分泌する細胞を、T 細胞 ISAAC 法を用いて検出できることがわかった。フローサイトメータを用いたサイトカイン分泌細胞の検出では、バックグラウンドノイズが観察され、抗原ペプチドに反応する細胞の頻度が低い場合、特異的なシグナルがバックグラウンドノイズに埋もれてしまう。そのため、生体から単離したリンパ球を直接用いた解析では、抗原特異的T細胞が検出できず、抗原特異的T細胞を2週間ほど抗原ペプチドで刺激し、増殖させる必要があった。今回の T 細胞 ISAAC 法による解析では、抗原非特異的なスポットは全く観察されなかったことから、フローサイトメータによる解析に比べて、T 細胞 ISAAC のバックグラウンドノイズはほとんど 0 に近く、存在頻度の低い抗原特異的 T 細胞も検出できる可能性がある。今後は、ヒトの T 細胞を用いて、抗原特異的T細胞が検出されるか、検証していく。

## 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 免疫学講座 助教 小林 栄 治 (浜名 洋)

### 【研究目的】

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 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 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。今年度は、EB ウイルス由来タンパク質を内在的に発現している抗原提示細胞を用いて、EB ウイルス特異的 T 細胞が検出でき、その TCR を取得できるかどうかを検証した。

### 【方法】

#### 1) 人工的抗原提示細胞の作製

ヒト赤芽球系細胞株である K562 細胞は細胞表面に HLA 分子を発現していない。この細胞に HLA-A24 分子および共刺激分子のリガンドである CD80 分子、4-1BB リガンド分子を発現させた細胞を人工的抗原提示細胞 (artificial antigen presenting cells, aAPC) として作製した。この aAPC に EB ウイルスの抗原の一つである BRLF1 cDNA を遺伝子導入し、BRLF1 タンパク質を内在的に発現する細胞を作製した。

## 2) 抗原提示細胞に反応する T 細胞の検出

ヒト末梢血リンパ球を分離し、BRLF1 を発現している aAPC, あるいは BRLF1 を発現していない aAPC を用いて刺激し、活性化マーカーである CD137 の発現を指標に、活性化 T 細胞を検出した。検出した活性化 T 細胞は、セルソータにより、96 ウェルの PCR 用プレートに、各ウェルに細胞が 1 個ずつ入るようにソートした。ソートした各細胞より TCR $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の cDNA を RT-PCR 法により増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析し、そのアミノ酸配列を比較した。

### 【結果】

#### 1) aAPC による末梢血リンパ球 (PBL) の短時間刺激

インフォームド・コンセントを受けたボランティアより提供された PBL を、BRLF1 が内在的に発現している aAPC, あるいは、BRLF1 が発現していないコントロール aAPC と一晩共培養した。翌日、CD137 分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。コントロール aAPC と共培養した PBL で CD137 分子を発現している細胞が多数観察された。しかし、BRLF1 が発現している aAPC で刺激した方が CD137 分子の発現が高かったため、CD137 分子を高発現している CD8 陽性 T 細胞を単一細胞ソートした。

ソートした T 細胞より TCR cDNA を増幅し、TCR のアミノ酸配列を解析した。今回解析に用いたボランティアの T 細胞は、これまでの EB ウイルス由来ペプチド/HLA-A24 複合体四量体 (テトラマー) を用いた解析より、BRLF1 特異的な TCR はただ 1 種類の TCR が検出されることを確認している。増幅した TCR のアミノ酸配列を比較したところ、BRLF1 ペプチド/HLA-A24 複合体テトラマーにより得られた TCR のアミノ酸配列と同一の TCR も一部得られたが、ほとんどは異なる TCR であった。一晩という短時間の刺激では、抗原特異的 T 細胞は検出されるものの非常に効率が悪く、実用には耐えられないレベルであることが明らかになった。

#### 2) aAPC による PBL の長期間刺激

そこで、BRLF1 を発現した aAPC と PBL とを 2 週間共培養し、さらに一晩 BRLF1 を発現した aAPC, 及びコントロール aAPC で再刺激を行った。CD137 分子の発現をセルソータにて解析し、それを指標に細胞を単一細胞ソートした。今回も、コントロール aAPC で刺激した細胞群においても CD137 分子の発現が多数観察され、バックグラウンドノイズが高かった。しかし、BRLF1 が発現した aAPC で刺激した細胞において、CD137 が高発現している T 細胞が観察されたため、CD137 高発現細胞を単一細胞ソートし、TCR cDNA を RT-PCR 法により増幅した。増幅した TCR cDNA の塩基配列を解析し、取得した TCR のアミノ酸配列を比較した。今回は、取得した TCR の 85% (図 7 青く塗りつぶさ

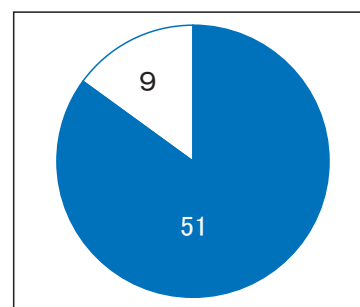


図 7 TCR レパートリー

れた部分)が、BRLF1 ペプチド/HLA-A24 複合体テトラマーを用いて解析した時に得られた TCR と同じアミノ酸配列を有する TCR であった。

### 【考察・結論・今後の展望】

内在的に抗原を発現している抗原提示細胞とヒト末梢血リンパ球を、2 週間共培養することで、内在性抗原に反応する T 細胞の TCR を取得することができた。今回、コントロール aAPC の刺激でも CD137 を発現する細胞が多数確認された。これは、目的の抗原ではなく、aAPC に元から発現している抗原により活性化された T 細胞によるものと思われる。このことは、BRLF1 発現 aAPC で刺激して取得した TCR の中に、コントロール aAPC で刺激してソートしてきた T 細胞の TCR と同じアミノ酸配列のものが存在したという結果からも裏付けられる。

バックグランドノイズが高いと、存在頻度の低い抗原特異的 T 細胞の検出が難しくなるため、バックグランドノイズをいかに軽減するかが課題の一つである。

今回は、1 人のボランティアの末梢血リンパ球を用いて実験を行ったが、今後は、他のボランティアの末梢血リンパ球でも同じ結果が得られるか、再現性をチェックしていく。

# 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 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸

## 【研究目的】

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、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。

今年度は、モデルシステムとして、EB ウイルス由来ペプチドに反応する T 細胞受容体を用い、抗原ペプチドにより活性化された細胞を同定できるリポーター細胞を作製する。

## 【方法と結果】

図 8 に示すように、HLA-A24 cDNA の細胞質部分を CD3ζ 鎖の細胞質部分と置換した、HLA-A24/ζ キメラ遺伝子を作製し、TG40 細胞に遺伝子移入した。

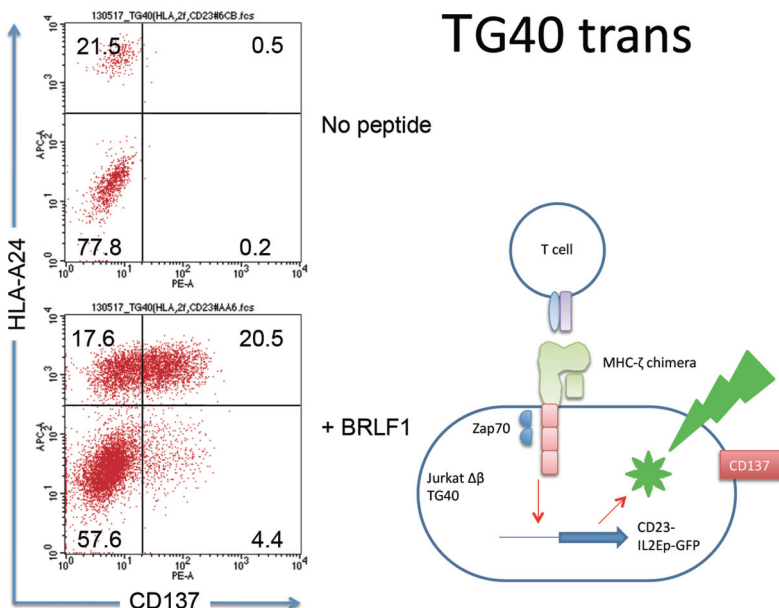


図 8 抗原特異的 T 細胞によるリポーター細胞の活性化

次に、作製したリポーター細胞と EB ウイルス由来 BRLF1 ペプチド/HLA-A24 分子複合体に特異的な TCR を発現させた TG40 細胞を、BRLF1 ペプチドの非存在下・存在下で一晩培養し、活性化マーカー CD137 の発現を解析した。

その結果、図 8 に示すように、抗原ペプチドの存在下において、CD137 の発現が特異的に増強することが確認された。

## 【考察】

TCR を発現した TG40 細胞, リポーター細胞, 抗原ペプチドの共存下で CD137 の発現が増強したことから, リポーター細胞の HLA-A24 分子に抗原ペプチドが結合し, それに TG40 細胞表面の TCR が結合して HLA-A24/ζ キメラ分子を架橋することで, ζ の細胞質部分より細胞内にシグナルが伝達され, CD137 分子の発現が増強されたものと考えられる。

また, 図 8 において, HLA-A24 陰性の TCR を発現した TG40 細胞においても CD137 の発現増強が観察された。これは, リポーター細胞の HLA-A24 分子に抗原ペプチドが結合したものを, TCR を発現した TG40 が認識し, 活性化されたものと考えられる。

## 【結論・今後の展望】

今後, ペプチド発現ライブラリーを構築し, 作製したリポーター細胞と抗原特異的 TCR 発現細胞とを用いることにより, TCR の抗原ペプチドが同定されると期待される。

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 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】

#### 1) ウサギの免疫

ウサギ (ニュージーランドホワイト種) への免疫及びリンパ球の回収は、承認された動物実験計画に従って行った。ErbB2 由来リン酸化ペプチド (p-ErbB2pep) を免疫したウサギよりリンパ球を回収した。初回は完全フロイントアジュバンドと混合した 500 $\mu$ g のペプチドを免疫した。その後、2週間間隔で3回、不完全フロイントアジュバンドと混合した 500 $\mu$ g のペプチドを免疫し、経時的に採血を行い、血漿を回収した。4回目の免疫の1週後に末梢血リンパ球、脾臓細胞、骨髓細胞を採取し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

## 2) 抗体価の測定

抗体価の測定するために、10 $\mu$ g/ml の p-ErbB2pep もしくは10 $\mu$ g/ml のリン酸化されていないErbB2-pep を96ウェルプレートに4 $^{\circ}$ Cで一晩静置し、固相化を行った。固相化後、3%ウシ血清アルブミンを含むPBSで1時間ブロッキングした後、免疫前、免疫開始後3週目、5週目の血漿を希釈して1時間インキュベートした。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ヒトIgG-Fc 特異的抗体を1時間インキュベートし、再度洗浄した後にアルカリホスファターゼの基質を反応させ、発色後にプレートリーダーを用いて405 nmの吸光度を測定した。

### 【結果及び考察】

3週目及び5週目の血清を用いた場合、発色が認められたことから、血漿中に抗 p-ErbB2-pep 抗体が誘導されていることが示唆された(図9)。

また3週目よりも5週目の血漿の抗体価が高いことから、ペプチドで免疫することで特異的に抗体が誘導されたと考えられる。

リン酸化されていないErbB2-pep に対する抗体価も上昇しているが、

ErbB2-pep に対する抗体価よりも、p-ErbB2-pep に対する抗体価の方が高いことから、リン酸化部位特異的な p-ErbB2-pep に対する抗体が誘導されていることが示唆された。

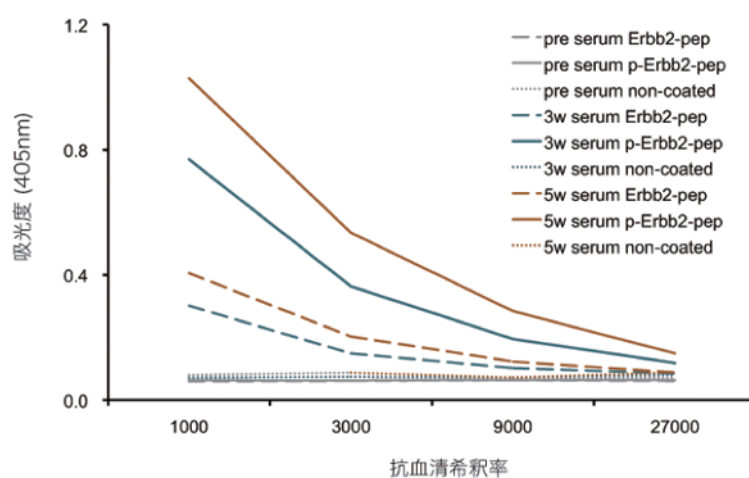


図9 血漿中の p-ErbB2-pep 抗体価

### 【結論・今後の展望】

p-ErbB2-pep を免疫することで、目的とするリン酸化部位特異的 p-ErbB2 抗体を誘導できた。今後ウサギ ISAAC 法を用いて、抗 p-ErbB2-pep モノクローナル抗体の取得を行い、得られた後にその抗体の評価を行う。

### 【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 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.
- 5 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.
- 6 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.

## 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

日本人の死亡原因の第一位は、「悪性新生物」いわゆる「がん（癌）」である。そのがん治療にとって重要なのが抗がん剤による治療である。しかし、嘔吐や末梢神経障害など副作用が問題となっている。現在では、嘔吐に関しては、5-HT<sub>3</sub>セロトニン受容体拮抗薬やNK1タキキニン受容体拮抗薬が制吐目的で使用され有効性を示している。一方、末梢神経障害に関しては、有用な予防・治療薬が無いのが現状である。抗がん剤による末梢神経障害は、痛みや痺れなど異常感覚が指先やつま先から発生し、手袋一靴下型の分布を示す。この末梢神経障害の発生は、抗がん薬の休薬の1つの指標ともなっており、抗がん剤治療をうけている患者にとってマイナスの要因となっている。また、抗がん剤治療終了後も数か月～1年ちかく、末梢神経障害が持続する場合が多く、その予防と治療は重要な課題となっている。

漢方方剤 芍薬甘草湯は、芍薬と甘草から構成されており、筋肉のけいれん、腹痛、腰痛などに使用されている。臨床において、芍薬甘草湯の服用が抗がん薬投与患者の筋肉痛などの異常感覚を改善することが報告されている。さらに、動物実験では、甘草エキスの経口投与では抗がん薬による異常感覚をコントロールできないが、芍薬エキスの経口投与でコントロールできる可能性を示す報告がなされている。

そこで、本研究では、抗がん薬による末梢神経障害が手袋一靴下型の分布を示すことから、外用による予防および治療薬の開発を目指し、本年度（1年目）は、マウスを用いて芍薬のエタノール抽出エキス並びに芍薬の主要成分ペオニフロリンの抗がん薬パクリタキセル誘発異常感覚外用効果と抑制機序の一端の解明を試み、また、臨床治験に向けた準備を行った。

### 【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）

マウスに抗がん薬パクリタキセルを腹腔内注射すると、注射後13～14日をピークとする機械的アロディニア（通常感じない非侵害刺激に対して過敏状態になる）を生じる。本機械的アロディニアは、マウス後肢足蹠に von Frey フィラメント（0.69mN の強度）を接触させ、その後の後肢の応答（逃避、足振りなど）をスコア化し評価した。本マウスモデルの後肢足蹠を中心に芍薬エタノール抽出エキス並びにペオニフロリンをパクリタキセル注射翌日より1日1回外用するとパクリタキセル誘発の機械的アロディニアの発生を抑制した。また、抗がん薬による末梢神経障害に神経の脱髄の関与が指摘されている。そこで、末梢神経を用いた電子顕微鏡を用いた評価により、パクリタキセル注射マウスでは、脱髄が認められ、ペオニフロリン投与マウスでは脱髄を抑制する傾向が観察された。芍薬エタノール抽出エキスによるパクリタキセル誘発の機械的アロディニアの抑制効果機序は今後解析予定であるが、以上の結果から、少なくともペオニフロリンによる機械的アロディニアの抑制効果には、脱髄抑制が一部関与している可能性が考えられる。

## 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）

臨床試験は、倫理委員会への申請等で承認を得るために非常に時間を要する。そこで、本年度は、臨床評価に関する準備に重点を置いた。新規に倫理委員会への申請であった為、研究計画書、同意説明書、同意書を作成し、当大学倫理委員会へ提出、2月中に承認を得る運びとなった。評価項目中で、機器をつかった神経伝導速度やサーモグラフィーを用いた皮膚表面温度の評価があり、ボランティアを用いて評価系として適切か確認を行い検査時の痛みは極めて軽微なものであり、外来診療時にも使用可能であることが確認された。このことにより、予定している評価すべて行えることとなった。

## 3. その他（応用薬理学：安東嗣修）

本製剤開発に向け、富山県くすり政策課職員（担当：藤岡）、本学リエゾンオフィス職員（担当：金田）と共に富山県内製薬関連企業と面談を行った。

## 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】

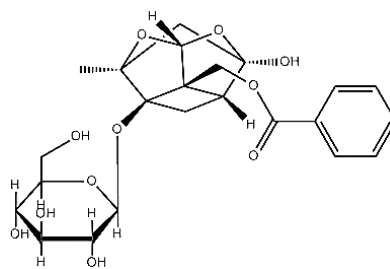
抗がん薬の副作用の一つに末梢神経障害による異常感覚（痛みや痺れなど）が認められる。しかし、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬では、抗がん薬による末梢神経障害をコントロールすることは難しい。そこで、新規治療薬および予防薬の開発が必要となってくる。

漢方方剤芍薬甘草湯は、芍薬と甘草から構成されており、「体力に関わらず使用でき、筋肉の急激なけいれんを伴う痛みのあるものの次の諸症：こむらがえり、筋肉のけいれん、腹痛、腰痛」（ツムラ添付文書）に一般的に処方される。臨床において、芍薬甘草湯が抗がん薬投与患者の筋肉痛などの異常感覚を改善することが報告されている。動物実験においても、我々は抗がん薬投与マウスの疼痛様行動を芍薬甘草湯が抑制することを見出している。芍薬甘草湯の疼痛様行動抑制作用の作用点に関して、電気生理学的に解析したところ、芍薬甘草湯は一部末梢レベルで効果を発揮していることを見出した。抗がん薬の末梢神経障害は、手袋一靴下型と言われており、指先やつま先から異常感覚が発生する。そのため、末梢神経障害が進行するとボタンをかけられなくなったり、物をつかんで持ち挙げられなくなったり、つまずいたりなど日常生活に支障をきたすようになる。そこで、芍薬甘草湯の作用が末梢であること、甘草エキスより芍薬エキスの経口投与により抗がん薬による疼痛様行動が抑制されるという報告があることから、外用による治療・予防効果の可能性を期待し、本研究では、芍薬エタノール抽出エキスならびに芍薬の主要成分のペオニフロリンの外用による抗がん薬パクリタキセル誘発疼痛様行動（機械的アロディニア：健常状態では感じない刺激に対して、過敏状態となっている状態）に対する影響を検討し、疼痛様行動抑制作用機序の解析を行った。



芍 薬

(和漢医薬学総合研究所 民族薬物資料館)



ペオニフロリン

(和漢医薬学総合研究所 伝統医薬データベース)

## 【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。

### (芍薬エキス及びペオニフロリン)

芍薬刻み生薬 (栃本天海堂, 大阪) を用いエタノール抽出を行い、抽出エキスをエタノールに溶解し塗布した。また、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。

### (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)

### (電気生理学的評価)

麻酔下マウス後肢伏在神経を露出、剥離し双極電極で吊り自発発火並びに von Frey フィラメント (0.69mN) 刺激による発火を記録した。

### (電子顕微鏡による評価)

マウス後肢足蹠より末梢神経を摘出し、電子顕微鏡による観察を行った。

## 【結果】

(1) パクリタキセル誘発機械的アロディニアに対する芍薬エタノール抽出エキス及びペオニフロリンの外用による効果

パクリタキセルを単回腹腔内注射することにより、注射後13-14日をピークとする機械的アロディニアが認められた。芍薬エタノール抽出エキス及びペオニフロリンをエタノールに溶解し、パクリタ

キセル投与翌日より繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。芍薬エタノール抽出エキス及びペオニフロリン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発生は抑制された。本繰り返し塗布による塗布局所の腫脹等の障害性所見は認めらなかった。

### (2) パクリタキセル投与マウスの末梢神経活動の増加に対するペオニフロリンの外用による効果

パクリタキセル投与マウスでは，パクリタキセルの溶媒投与コントロールマウスとくらべ，伏在神経の自発的発火ならびに von Frey フィラメント（0.69mN）によって誘発される発火の増加が認められた。ペオニフロリンの繰り返し塗布処置を行ったパクリタキセル投与マウスでは，伏在神経の自発的発火ならびに von Frey フィラメントによって誘発される発火の増大は，抑制された。

### (3) パクリタキセル投与マウスの末梢神経の電子顕微鏡による解析

パクリタキセル投与マウスにおいて末梢神経における脱髄神経の増加が認められた。ペオニフロリンの繰り返し塗布処置により，パクリタキセル誘発の脱髄神経の増加は抑制された。

## 【考察と今後の展望】

本研究では，婦人科系のがんに用いられる主要な抗がん薬であるパクリタキセル投与マウスへの芍薬エタノール抽出エキス並びに芍薬の主要な活性成分であるペオニフロリンの繰り返し塗布による機械的アロディニアへの効果を検討した。芍薬エタノール抽出エキス及びペオニフロリンの繰り返し塗布は，パクリタキセル誘発機械的アロディニアの発生を抑制した。このことにより，これら薬物の繰り返し塗布（外用）は，抗がん薬誘発機械的アロディニアの発生の予防に有効であることが示唆される。一方，パクリタキセル誘発機械的アロディニアに対して，ペオニフロリンの単回塗布は，抑制効果を示さなかった（データ未掲載）。したがって，これら塗布の急性効果を期待することは難しいと考えられる。

ペオニフロリンの繰り返し塗布は，パクリタキセル誘発末梢神経活動の増加を抑制した。また，ペオニフロリンを塗布していない反対足ではペオニフロリンの繰り返し塗布によるパクリタキセル誘発機械的アロディニアに対する抑制効果は認められなかった。このことは，ペオニフロリンが塗布局所で効果を発揮していることを示唆する。

パクリタキセルの投与により末梢神経の脱髄が認められることが報告されている。脱髄は，神経の異常発火に関与し，神経障害性疼痛の発生機序の1つとして考えられている。パクリタキセル投与マウスにおいて，後肢足蹠神経の電子顕微鏡解析により脱髄神経数の増加が認められた。この増加は，ペオニフロリンの繰り返し塗布により抑制された。したがって，ペオニフロリンの繰り返し塗布による機械的アロディニアの抑制作用に一部末梢神経の脱髄抑制が関与していることが示唆される。



パクリタキセルなど抗がん薬は、投与開始のタイミングが明確であることから、予防的に芍薬エタノール抽出エキス或いはペオニフロリンの外用をすることで末梢神経障害の発生を抑制することが期待される。今後、繰り返し外用による治療効果に加え、他の抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛や糖尿病性末梢神経障害性疼痛への効果や、安全性に関する病理組織学的検討を行い、臨床試験を行う準備を行う予定である。

### 【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、富山県くすり政策課職員（担当：藤岡）と共に富山県内製薬関連企業と面談を行った。

### 【特許出願】

- [1] （発明の名称）末梢神経障害誘発感覚異常を改善する外用剤  
（発明者）安東嗣修，小林奈央，倉石 泰  
（出願人）国立大学法人 富山大学  
（出願番号）特願2014-107362（2014.5.23）
- [2] （発明の名称）末梢神経の脱髄抑制剤  
（発明者）安東嗣修，小林奈央，倉石 泰  
（出願人）国立大学法人 富山大学  
（出願番号）特願2014-141841（2014.7.10）

### 【学会発表】

**Andoh T**, Kobayashi N, Kitamura R, Kuraishi Y. Repetitive topical paeoniflorin inhibits the increase in saphenous nerve activity after paclitaxel administration and prevents paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience; 2014 Nov 15-19; Washington D.C., USA.

### 【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，倉石 泰

富山大学和漢医学総合研究所和漢薬の科学基盤形成拠点 拠点推進室

李峰

## 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  
准教授 吉野 修  
助教 島 友子

### 【研究目的】

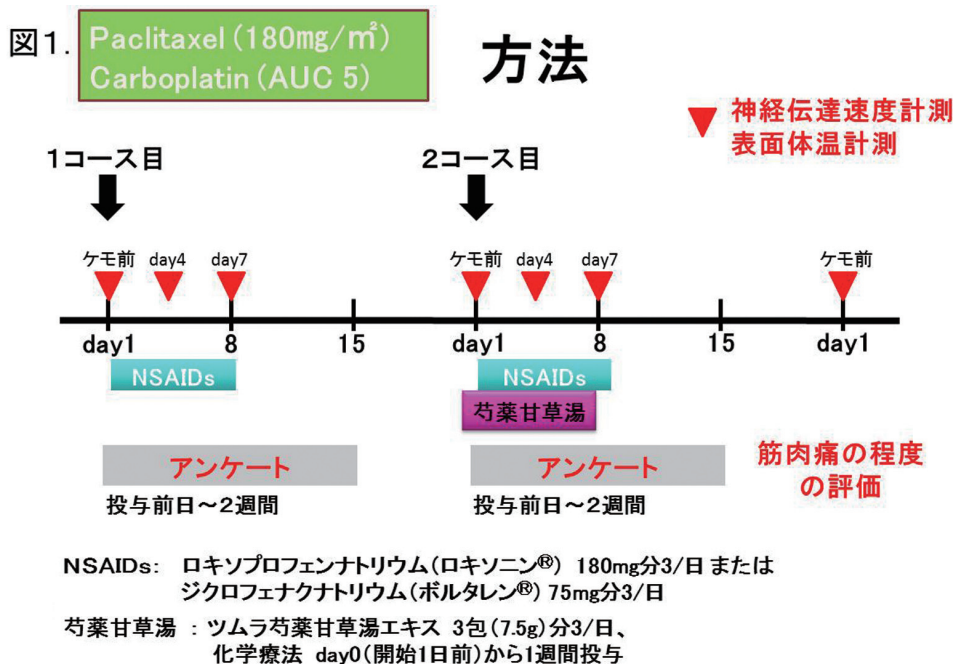
抗がん剤使用によりがんの治療成績が向上しており、がんサバイバーも増加している。その一方で、抗がん剤による嘔吐、血液毒性、易感染性、脱毛、肝機能障害などの副作用があるため、種々の対策がなされてきた。一方、抗がん剤による末梢神経障害（痛みや痺れなど）は、生命予後を悪化させないが、治療終了後の患者のQOLを著しく低下させる。これまで抗がん剤による末梢神経障害の発症の詳細な機序が判っておらず、臨床的に大きな問題点となっている。我々は芍薬甘草湯の芍薬がパクリタキセル誘導の末梢性の痛みに対して有用であることを報告し（Eur. J Pain ; 13 : 22-27, 2009）、臨床例においても芍薬甘草湯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 嗣修は、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で、世界で初めて見出した。そこで、今回、婦人科がん患者でタキソー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）および末梢温度を評価するサーモグラフィー（Fluku社Ti-32）を用いて、末梢神経障害を評価し、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。

### 【研究方法】

富山大学臨床研究倫理審査に研究承認を依頼しており、現在審査中である。対象は富山大学附属病院産婦人科で外来、入院管理し、タキソールを含む抗がん剤投与症例100例を目標症例とする。

同意を得られた患者に投与前、投与4日、7日後に筋電計による電気生理学的方法で、電極を2カ所に装着し軽微な電流を流すことで電極間の神経伝達速度を計測する。また手掌をサーモグラフィーにかざすことで、非侵襲的に表面体温評価を行なう（図1）。

これらを芍薬甘草湯非投与時（初回）と芍薬甘草湯投与時（2回目以降）とで比較し、あわせて自覚症状の改善度とあわせて評価する（図2、図3）。



**図2. Paclitaxel 投与に伴う筋肉痛の程度の評価**

| Pain scale | CTCAE ver4.0 | 痛み(自覚症状)   | 痛み(他覚症状)  |
|------------|--------------|--|---|
| 4          | 3            | 耐えられない<br>痛くてじっとしてられない<br>全く眠れない                                 | 耐えられない痛み<br>ペンタゾシンのような強い鎮痛剤を要す                                    |
| 3          | 3            | テレビ、ラジオも嫌だ<br>トイレに行くのもおっくうだ<br>ほとんど眠れない                          | 臥床を要し、睡眠も妨げられ、<br>内服の鎮痛剤を頻回に要する<br>ような強い痛み                        |
| 2          | 2            | トイレに行ったりして動くと痛い<br>病院であれば売店までいける<br>自宅であれば家の中は動ける<br>夜中ときどき目が覚める | 臥床を要するほどではないが、<br>トイレにいたりして動くと痛い<br>夜中ときどき目がさめる<br>内服の鎮痛剤を1～2回要する |
| 1          | 1            | 痛みはあるが、普段と同じように生活できる<br>散歩できる<br>気になるが眠れないほどではない                 | 気にはなるが、普段と同じように<br>生活でき、鎮痛剤を要しない<br>程度の軽度の痛み                      |
| 0          |              | 痛くない<br>ぐっすり眠れた  | 無痛  |

TOYAMA v2015

**図3 Paclitaxel 投与に伴う筋肉痛の程度の評価**

NRS: Numerical Rating Scale

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

痛みが全くないものを0点  
考えうる最悪の痛みを10点とし痛みを評価

## 【結果】

研究計画書，同意説明書，同意書を作成し，当大学倫理委員会の承認が未だのため，基礎データのみの取得を行なった。まずは筋電図による神経伝達速度を，ボランティアを用いて行った。検査時の痛みは極めて軽微なものであり，外来診療時にも使用できることが判明した。

サーモグラフィーの装着も極めて安易であり，データ集積も可能であった。倫理審査で承認され次第，研究を開始できる状態にある。なお，倫理委員会は2月中に承認される見込みである。

## 【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。しかも，本法は手技が容易であることから，本評価法を確立すれば早めの医療介入も可能となる。また，芍薬甘草湯や牛車腎気丸による抗がん剤の副作用軽減が臨床的に証明されれば，多くの癌症例にとって有益となる。

## 【学会発表】

- 1) 齋藤 滋：女性医学のために漢方にできること。第29回日本女性医学学会，2014,11,1, 東京.
- 2) 齋藤 滋: 明日から実践できる漢方治療。第66回日本産科婦人科学会学術講演会 ランチョンセミナー ; 2014.4.18-20, 東京.

島友子 産婦人科漢方研究会（2015年9月13日）シンポジウム発表が決定

## 【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，島 友子

### 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

漢方方剤に配合される生薬は約83%を中国に依存しており、中国の自然環境の変化や国家政策によっては生薬の供給が滞る事態も危惧されており、漢方医学の永続性を担保する意味からも、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を図る必要がある。「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り、漢方方剤を構成する生薬として頻用されているが、その多くは中国から輸入されている。そのような状況下で、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に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

芍薬に付加価値を与えるためには、薬用及び園芸用の双方に用いることができること、薬用途に特徴があること、安定した品質であることなどが考えられる。特にブランド芍薬を富山県で生産するためには、シャクヤク品種の栽培拡充とともに、収穫した根の加工調製法の開発が不可欠である。そこで、今回、富山県薬用植物指導センターで栽培されている薬用品種「梵天」の根を用いて、貯蔵法、加工法及び乾燥法の異なる計15通りの加工調製法を行い、その加工品について主要な8成分の含量を測定し、加工調製法の違いによる成分含量の変動を調べた。また、芍薬（白芍）は内部が粉状で充実し、白く仕上がった製品が上品とされることから、加工調製した根の色合いについて評価した。

栽培4年目の薬用品種「梵天」の根（直径1.5~2.0 cm）を用いて加工調製法の違いによる8成分の含量を測定したところ、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よい成分含量を示した。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- $\beta$ -D-glucose (PGG), Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が顕著に増加することが明らかとなり、品質の良い芍薬を生産する加工調製法が設定できた。この方法は、湿度が高く、シャクヤクの根の乾燥には不向きとされる富山県においても実施可能である。優良品種の確定、栽培

普及、収穫時の機械化とともに、今回設定した方法で芍薬を製品化することにより、付加価値を有する富山県産ブランド芍薬の生産が実現できることが期待される。

## 2. 富山県産芍薬の品質評価に係る臨床研究

生薬である芍薬は非常に多くの漢方方剤の構成生薬である。芍薬の臨床効果を評価するには、漢方方剤を構成する生薬数が出来るだけ少ないものとする必要があり、本研究では芍薬と甘草のみから構成される芍薬甘草湯を用いることとした。芍薬甘草湯は、古来、筋痙攣や痙攣性疼痛に対して用いられ、近年では、腓返りを中心とした有痛性筋痙攣や痙攣性腹痛、急性腰痛症、月経困難症などに頻用されている。そこで本研究では、有痛性筋痙攣、および月経困難症を対象疾患とし、各々の疾患における「富山県ブランド芍薬」、あるいは「梵天芍薬」を含有する芍薬甘草湯を作製し、比較検討することとした。

有痛性筋痙攣（腓返り）に対する効果に関する臨床研究では、有痛性筋痙攣を有するボランティアを対象とし、作製した富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯（以下、富芍甘湯）、あるいは市場流通梵天芍薬含有芍薬甘草湯（以下、梵芍甘湯）を封筒法で割付けし、クロスオーバー方式で各々を28日間服用し、臨床症状日誌に記載された有痛性筋痙攣縮発生回数・発生時間・持続時間を比較検討し、有痛性筋痙攣に対する予防効果を比較する。他方、月経困難症に対する効果に関する臨床研究では、月経困難症を有するボランティアを対象とし、作製した富芍甘湯、あるいは梵芍甘湯を封筒法で割付けし、クロスオーバー方式で月経開始時より7日間服用し、疼痛程度を Visual Analog Score で評価し、有痛性筋痙攣に対する治療効果を比較検討する。

平成26年に富山県内で栽培されたシャクヤクの根を収穫し、修治・乾燥して生薬「富山県ブランド芍薬」を作製し、確認試験、純度試験、ペオニフロリン含有量測定、重金属測定、残存農薬測定を実施し、国内流通可能な生薬であることを確認している。富山県ブランド芍薬の対照となる市場流通梵天芍薬、および甘草については、同一ロットでその必要量を確保した。本研究について倫理委員会の承認を得る必要があり、準備として、本研究についての研究計画書や同意説明書、同意書、臨床症状日誌を作成した。

## Ⅲ－１ 富山県産芍薬の品質評価に係る臨床研究

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

### 1. 緒言

漢方方剤に配合される生薬は約83%を中国に依存しており、中国の自然環境の変化や国家政策によっては生薬の供給が滞る事態も危惧されており、漢方医学の永続性を担保する意味からも、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を図る必要がある。「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り、漢方方剤を構成する生薬として頻用されているが、その多くは中国から輸入されている。そのような状況下で、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てきた。そこで本研究では、「富山県ブランド芍薬」として確立するための科学基盤を与える目的で、富山県ブランド芍薬を配合した漢方方剤について臨床研究を実施する。

生薬である芍薬は非常に多くの漢方方剤の構成生薬である。その中で、芍薬として日本薬局方に適合する「富山県ブランド芍薬」と「梵天芍薬」について、その効果を臨床的に評価するには、漢方方剤の構成する生薬数が出来るだけ少ないものとする必要がある。そこで、芍薬と甘草のみから構成される芍薬甘草湯を臨床研究に使用する漢方方剤とした。

芍薬甘草湯は傷寒論に収載される漢方方剤であり、「傷寒脈浮、自汗出で、小便数、心煩し、微悪寒し、脚攣急するに…若し厥癒えて足温なる者は、更に芍薬甘草湯を作り之を與うれば、其の脚即ち伸ぶ」とあり、古来、筋痙攣や痙攣性疼痛に対して用いられてきた。近年では、腓返りを中心とした有痛性筋痙攣や痙攣性腹痛、急性腰痛症、月経困難症などに頻用されている。そこで本研究では、有痛性筋痙攣、および月経困難症を対象疾患とし、各々の疾患における「富山県ブランド芍薬」、あるいは「梵天芍薬」を構成生薬とする芍薬甘草湯の臨床効果について、比較検討することとした。

### 2. 有痛性筋痙攣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

(1) 目的：有痛性筋痙攣（腓返り）とは「単一筋または複数の筋群にみられる有痛性の不随意的筋収縮」であり、電気生理学的には300Hzの高頻度運動単位放電として表される。その明確な発生機序は不明であるが、脊髄前角細胞の自発放電による運動単位の収縮、あるいは運動ニューロンの筋へ至る神経末梢の過剰興奮性などが関連するとされており、腓返りの発症機序は単一のものではなく、複数の病態が混在すると考えられている。

腓返りに対する西洋医学的治療としては、キニジンやプロカインアミド、フェニトイン、カルバマゼピンといった抗痙攣薬や、塩酸工ペリゾンや塩酸トルペリゾンなどの中枢性筋弛緩剤、ダントロレンなどの末梢性筋弛緩剤などが用いられている。

一方、古来、筋痙攣や痙攣性疼痛に対して用いられる漢方方剤として、芍薬甘草湯がある。近年では、肝硬変や血液透析、整形外科疾患に伴う腓返りに芍薬甘草湯が有効であったと報告されている。その鎮痙作用を裏づける基礎的研究は少なく、骨格筋に対するものはほとんどみられないが、モルモットの回腸に対する実験では、芍薬の副交感神経末端におけるアセチルコリン遊離抑制作用や甘草の抗アセチルコリン作用が報告されている。作用機序は不明であるが、芍薬甘草湯は臨床的には腓返りに対して第1選択薬として用いられている漢方方剤である。そこで本研究では、有痛性筋痙攣に対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯（以下、富芍甘湯）、あるいは市場流通梵天芍薬含有芍薬甘草湯（以下、梵芍甘湯）の効果を比較・検討することとした。

(2) 研究デザイン：本研究は介入のある臨床研究であり、有痛性筋痙攣を有するボランティアを対象とした探索的試験である。作製した富芍甘湯・梵芍甘湯をクロスオーバー方式（富芍甘湯→梵芍甘湯、あるいは梵芍甘湯→富芍甘湯）で各々28日間服用し、有痛性筋痙攣に対する予防効果を比較する。尚、富芍甘湯→梵芍甘湯、あるいは梵芍甘湯→富芍甘湯の割付は封筒法により行う。（図1）

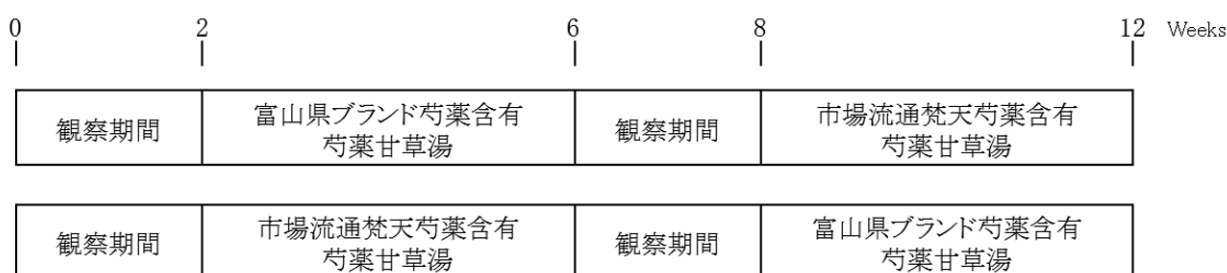


図1 腓返りに対する芍薬甘草湯の臨床効果の検討

(3) 研究対象者：有痛性筋痙攣を有し、本研究への参加に同意が得られた20歳以上の者。目標症例数は20名とする。

(4) 研究方法

1) 薬剤：富芍甘湯（1日量：富山県ブランド芍薬5g、甘草5g）、あるいは梵芍甘湯（1日量：市場流通芍薬5g、甘草5g）を水300mLに入れて煎出し、ろ過して煎液を取り、半量ずつアルミパック包装する。

2) 服用方法：無投薬で2週間、腓返りの状態を観察した後、作製した富芍甘湯、あるいは梵芍甘湯を28日間、1日2回（午前10時、および就寝前）に服用する。その後、2週間の無投薬期間の後、中止前に服用したのとは別の芍薬甘草湯（富芍甘湯、あるいは梵芍甘湯）を28日間、1日2回（午前10時、および就寝前）に服用する。



3) 臨床効果の評価：1日における有痛性筋攣縮発生回数・発生時間・持続時間を検討項目とし、研究期間中、臨床症状日誌に記載する。記載された臨床症状日誌を回収し、富芍甘湯および梵芍甘湯の有痛性筋攣縮に対する臨床効果を比較検討する。尚、臨床症状日誌および個人情報番号化により連結可能匿名化し、外部とは切り離された環境にあるコンピュータで管理することとする。

### 3. 月経困難症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

(1) 目的：月経困難症とは月経時疼痛を主とする疾患群であるが、その病態は一樣ではなく、その疼痛には子宮筋の攣縮による痙痛と炎症によると思われる持続性の鈍痛がある。月経時痛の原因には、子宮内膜が分泌するプロスタグランジンが関与するとされており、プロスタグランジンは疼痛だけではなく、嘔気や嘔吐、腰痛、下痢、頭痛などの多彩な症状を誘発するとされている。月経時痛は、日本人女性の3分の1にみられるとされ、鎮痛剤無効例やベッドレストを要する重症例もあり、50%以上において日常生活に影響するほどの疼痛がみられるとの報告もある。

月経困難症の治療には鎮痛剤やルナベルなどの低用量ピルが用いられており、子宮内膜症に対してはホルモン療法が選択されている。また不妊症や卵巣チョコレート嚢胞を認める症例では手術適応となることもある。しかし、鎮痛剤の長期投与による胃腸障害や腎機能障害、低用量ピルにおける血栓症、ホルモン療法による不正性器出血など、様々な副作用がみられる。

一方、月経困難症は、古来、漢方治療の適応となってきた病態である。月経時痛は、漢方医学的には瘀血と捉えられ、多くは桂枝茯苓丸や当帰芍薬散、加味逍遙散といった駆瘀血剤が使用される。しかし、近年、月経時にのみ芍薬甘草湯を服用する周期的投与療法が有効との報告がみられている。そこで本研究では、月経困難症に対する富山県ブランド芍薬含有芍薬甘草湯（以下、富芍甘湯）、あるいは市場流通梵天芍薬含有芍薬甘草湯（以下、梵芍甘湯）の効果を比較・検討することとした。

(2) 研究デザイン：本研究は介入のある臨床研究であり、月経困難症を有するボランティアを対象とした探索的試験である。作製した富芍甘湯・梵芍甘湯をクロスオーバー方式（富芍甘湯→梵芍甘湯、あるいは梵芍甘湯→富芍甘湯）で各々を月経開始時より7日間服用し、月経困難症に対する治療効果を比較する。尚、富芍甘湯→梵芍甘湯、あるいは梵芍甘湯→富芍甘湯の割付は封筒法により行う。（図2）

(3) 研究対象者：月経困難症を有し、本研究への参加に同意が得られた20歳以上の者。目標症例数は20名とする。

(4) 研究方法

1) 薬剤：富芍甘湯（1日量：富山県ブランド芍薬5g、甘草5g）、あるいは梵芍甘湯（1日量：市場流通芍薬5g、甘草5g）を水300mLに入れて煎出し、ろ過して煎液を取り、半量ずつアルミパック包装する。

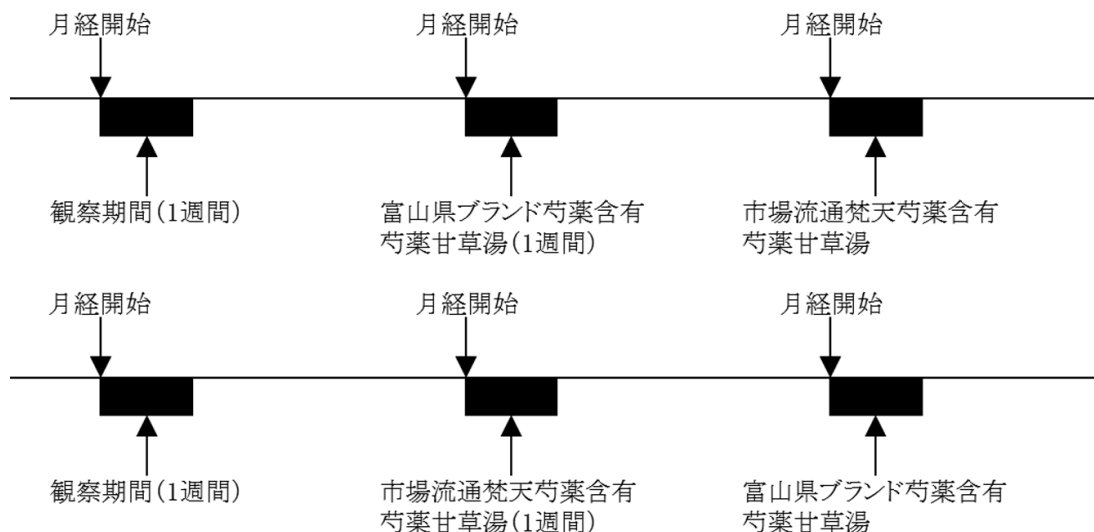


図2 月経困難症に対する芍薬甘草湯の臨床効果の検討

- 2) 服用方法：無投薬で月経困難症の状態を観察し，次の月経開始時より，作製した富芍甘湯，あるいは梵芍甘湯を7日間，1日2回（午前10時，および就寝前）服用する。さらに次の月経時より前回の月経時に服用したものと別の芍薬甘草湯（富芍甘湯，あるいは梵芍甘湯）を同様に7日間服用する。
- 3) 臨床効果の評価：月経開始後の疼痛程度を Visual Analog Score (VAS) として臨床症状日誌に記載する。記載された臨床症状日誌を回収し，月経困難症に対する富芍甘湯および梵芍甘湯の臨床効果を比較検討する。尚，臨床症状日誌および個人情報番号化により連結可能匿名化し，外部とは切り離された環境にあるコンピュータで管理することとする。

平成26年に富山県内で栽培されたシャクヤクの根を収穫し，修治・乾燥して生薬「富山県ブランド芍薬」を作製した。日本薬局方における確認試験，純度試験，ペオニフロリン含有量測定，重金属測定，残存農薬測定を実施し，国内流通可能な生薬であることを確認した。富山県ブランド芍薬の対照となる市場流通梵天芍薬，および甘草については，同一ロットでその必要量を確保した。

本研究について倫理委員会の承認を得る必要があり，準備として，本研究についての研究計画書や同意説明書，同意書，臨床症状日誌を作成した。

## 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, 朱 姝

### 【緒言】

漢方方剤に配合される生薬は約81%を中国に依存しており、中国の自然環境の変化や国家政策によっては生薬の供給が滞る事態も危惧されている。したがって、漢方医学の永続性を担保する意味から、日本国内で栽培可能な生薬は栽培化を図り、それを拡充する必要がある。

「芍薬」はボタン科のシャクヤク *Paeonia lactiflora* Pallas の根に由来し<sup>1)</sup>、鎮痛、鎮痙、収斂薬として、一般用漢方処方約 1/3 に配合される重要な生薬である。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によると、国内の芍薬の使用量は平成22年度1,226,311 kgで2番目に多く、その内訳は日本産が38,017 kg、中国産が1,188,294 kgであった<sup>2)</sup>。日本産芍薬は、古来我が国で開発された薬用品種の「梵天」に由来するものが主体で、奈良県を中心に栽培・加工されて「大和芍薬」と称されるが、現在は長野県や富山県でも栽培されている。さらに近年、園芸品種も薬用に供されるようになった。一方、中国産芍薬は、『中華人民共和国薬典』<sup>3)</sup>で記載している「白芍」である。中国では、芍薬は、「白芍」と「赤芍」に区別され、白芍は養血、斂陰、柔肝、止痛薬として筋肉の攣急の緩和、腹痛、下痢などに、また赤芍は活血化癥薬として婦人科疾患などに用いられる。白芍は *P. lactiflora* の根を湯通しした後に外皮を除去したもの、あるいは外皮を取り除いて湯通ししたものであり、赤芍は *P. lactiflora* または *P. veitchii* Lynch の根であると規定されている<sup>2)</sup>。赤芍の基原種には *P. veitchii* も含まれるが、多くは *P. lactiflora* であることから、これまで同じ種を基原とする白芍との区別が難しかった。

そこで我々は、日本産芍薬及び中国産の白芍と赤芍について、遺伝子解析及び成分研究を行い、白芍（日本産芍薬も同様）と赤芍を区別する遺伝子マーカーを明らかにするとともに、両者に特徴的な成分組成を見出した<sup>4)</sup>。また、この遺伝子マーカーを指標にして、富山県薬用植物指導センターで栽培されている園芸用シャクヤク約70品種を白芍系と赤芍系に分類した。さらにそれらの根の成分研究を行い、Paeoniflorin 含量が『日本薬局方』<sup>1)</sup>の規定（2.0%以上）を満たし、かつ生薬の赤芍または白芍と類似の成分組成を有するものを数品種見出した。これらの実績を踏まえ、園芸用シャクヤクの中から薬用にも供することができる優良品種を選抜し、付加価値の高い「富山県ブランド芍薬」として開発していくことを計画した。

## 【目的】

芍薬に付加価値を与えるためには、薬用及び園芸用の双方に用いることができること、薬用途に特徴があること、安定した品質であることなどが考えられる。特にブランド芍薬を富山県で生産するためには、シャクヤク品種の栽培拡充とともに、収穫した根の加工調製法の開発が不可欠である。これまで富山県でのシャクヤクの根の加工は難しいとされ、県内で栽培された「梵天」は新鮮なまま奈良県に出荷され、奈良県で自然乾燥され加工されて「大和芍薬」となってきた経緯がある。そこで、今回、富山県薬用植物指導センターで栽培されている薬用品種「梵天」の根を用いて、貯蔵法、加工法及び乾燥法の異なる計15通りの加工調製法を行い、その加工品について主要な8成分（図1）の含量を測定し、加工調製法の違いによる成分含量の変動を調べた。また、芍薬（白芍）は内部が粉状で充実し、白く仕上がった製品が上品とされることから、加工調製した根の色合いについて評価した。

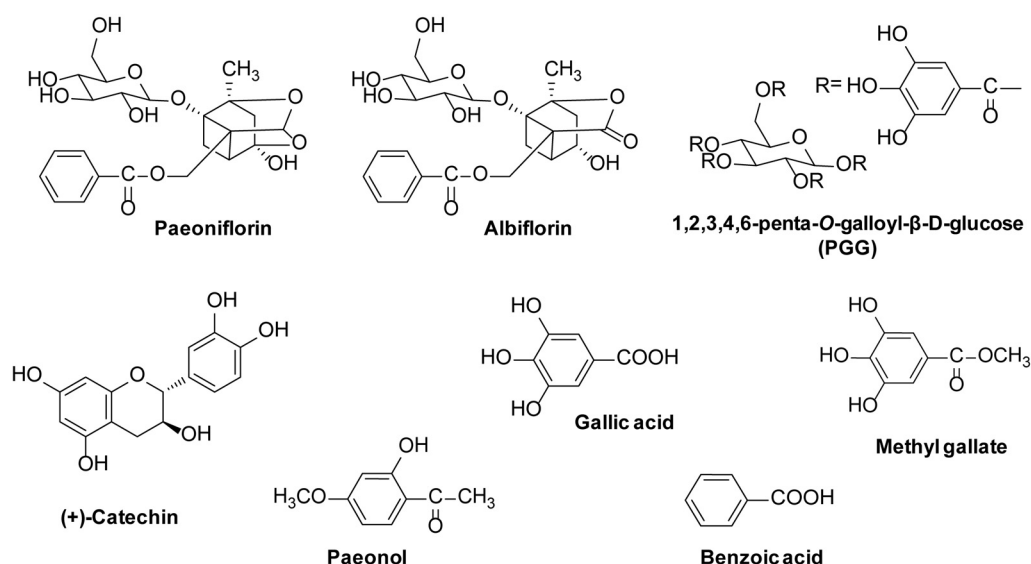


図1 定量分析に用いた成分の構造式

## 【実験材料と加工・調製法】

富山県薬用植物指導センターで収穫された栽培4年目の薬用品種「梵天」の根から、直径2.0 cm

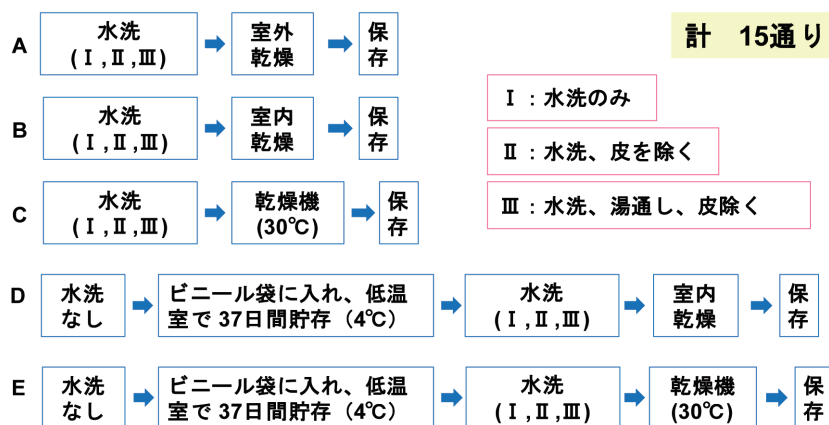


図2 収穫した新鮮な根について行った加工・乾燥法

前後の根を選別し（平成25年10月8日入手）、材料とした。それらを均等に15グループに分けた（8個体／グループ、その内7個体が直径1.5~2.0 cm、1個体のみ直径2.0~2.7 cm）。15グループの根に対してそれぞれ、図2に示した15通りの加工・乾燥法を行っ

た。終了後、各グループ中5個体の根（4個体が直径1.5~2.0 cm, 1個体が直径2.0~2.7 cm）についてそれぞれ8成分の含量を測定した。

## 【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- $\beta$ -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, 250×4.6 mm, i.d., s-5  $\mu$ 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  $\mu$ L ; 流速: 1 ml/min ; カラム温度: 27°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- $\beta$ -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  $\mu$ 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  $\mu$ m (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。

## 【根の横断面の色の評価】

乾燥した根をノコギリなどで切断し, その断面を日本電色工業 (株) 携帯型分光色差計 NF-333 を用いて明度などを測定した。色の表示方法については日本工業規格 (JISZ8729) が規定する L\*a\*b\* の表色系を用いた。林ら<sup>5)</sup> は, シャクヤクの根の横断面の変色程度を評価するには, 分光色差計を用

いたL\* 値（明度）による評価が妥当であると提唱しており，本研究はそれに従った。なお，L\* 値は，見た目の変色程度が小さいほど数値が高い傾向にあり，a\* 値（彩度），b\* 値（色相）については，変色程度が小さいほど，絶対値が小さい。各グループにおいて，成分分析に用いた5個体をそれぞれ測定し，それらの平均値を算出した。

## 【結果】

乾燥した根について，各グループ5個体ずつ8成分の定量分析を行った。個体ごとの成分含量を比較すると，個体間である程度のばらつきがあったものの，太さを揃えたことにより，そのばらつきが補正されており，同じ調製法で乾燥・加工した同一グループの5個体においては，成分含量が同じ傾向を示した。同一グループの5個体の成分含量の平均値を求め，比較した。約1ヶ月間の低温貯蔵を経たD-I, II, III及びE-I, II, IIIの6グループでは，低温貯蔵をしていない各グループに比べて，Paeoniflorin含量が安定しており，高い値を示した。一方，低温貯蔵をしていないA-I～A-III, B-I～B-III, C-I～C-IIIの9グループの内，A-II, B-II, C-II及びC-Iの4グループでは，Benzoic acid含量が著しく高く，それとは対照的にPaeoniflorin含量が低くなっていた。特に，B-II及びC-IIの2グループでは，Paeoniflorin含量が局方規定の2.0%を下回った。また，湯通ししたA-III, B-III, C-III, D-III, E-IIIの5グループでは，それら以外の各グループに比べて，PGG, Gallic acid及びMethyl gallateの含量が顕著に増加していた。

加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化を明確に見るため，加工・乾燥法A-Iを行った時の平均含量を1として，それぞれの加工・乾燥法を行った時の各成分の平均含量をそれらと比較した。A-II, B-II, C-II及びC-Iの4グループでは，Benzoic acidの含量が5倍から18倍まで著しく高くなっていた。湯通ししたA-III～E-IIIの5グループでは，PGG, Gallic acid及びMethyl gallateの3成分の含量が顕著に増加していた。また，皮取り加工によりAlbiflorin及び(+)-Catechinの含量の減少が見られた。

低温貯蔵を行った場合，室内での自然乾燥か，乾燥機による30℃での熱風乾燥かの違いは現れなかったが，低温貯蔵を行わず，かつ湯通しを行わなかった場合，熱風乾燥によりPaeoniflorin含量の低下とBenzoic acid含量の増加をもたらした。特に周皮を除いたもので顕著であった（C-II）。

乾燥した根の横断面の色について，分光色差計によりL\*，a\*及びb\*値を測定した。約1ヶ月間の低温貯蔵を経たD-I, D-II及びE-I, E-IIの4グループは，最も高いL\*値（79.8～90.0）を示した。一方，低温貯蔵をしていない各グループでは，程度の異なる変色が認められた。特に，皮取り加工をしたA-II, B-II, C-II及び乾燥機で熱風乾燥したC-Iの4グループは，顕著な変色が認められ，L\*値が50.7～86.6と低く，変動幅も大きかった。また，湯通し加工したA-III～E-IIIの5グループは，貯蔵法や乾燥方法の違いにも関わらず，安定したL\*値（62.8～74.9）を示した。これらでは，湯通し加工により，シャクヤクに含まれる澱粉が糊化され，内部が淡黄色になったため，b\*値が比較的高い

傾向にあった。

### 【考察】

富山県では薬用品種の「梵天」が広く栽培されているが、富山県の気候風土がシャクヤクの根の調製に向かないため、掘り起こされた根はすべて新鮮な状態で奈良県に出荷される。富山県で栽培可能な品種から、薬用の赤芍または白芍として新たなブランド生薬を作り出していくためには、収穫した新鮮な根を富山県で加工・調製する最適な方法を見出すことが不可欠である。

林ら<sup>5)</sup>は、乾燥を防いで20℃以下で22日間以上根を貯蔵してから周皮を除去し、その後速やかに乾燥すれば内部が白く仕上がり、また Paconiflorin や Gallotannin の向上にも繋がると報告している。本研究でも加工・乾燥法 D と E の各グループにおいて、収穫した根をビニール袋に入れ、低温室(4℃)で約1ヶ月間貯蔵した後に、BとCの各グループと同様な方法で加工・乾燥した。低温貯蔵していないA～Cの各グループに比べて、低温貯蔵したDとEの各グループでは、Paconiflorin 含量が非常に安定しており、結果として顕著ではないものの、高含量を示した。

さらに、湯通し加工を行うことにより、特に PGG 含量が増加した。その後の乾燥の便を図るため、今回は湯通しした後、周皮を除いて乾燥したが、低温貯蔵を行っていれば Paconiflorin 含量に影響は無かった。また、根を低温貯蔵し、湯通し加工を行い、周皮を除いて乾燥した場合、乾燥機による30℃での熱風乾燥でも自然乾燥とほぼ同様の成分含量が得られた。ただし、周皮を去ることにより、Albiflorin 含量と (+)-Catechin 含量が減少していたことから、今後、低温貯蔵し、湯通し加工をした根をそのまま熱風乾燥した場合の成分含量を検討する必要がある。

根の色調については、低温貯蔵し、湯通ししていないグループの D-I, D-II 及び E-I, E-II が変色も少なく、最も白く仕上がった。湯通しをした D-III と E-III は低温貯蔵していない湯通し品と同様に断面が淡黄色になった。この時の L\* 値は日本市場の芍薬と同等であり、外見上問題にはならないと考える。一方、低温貯蔵も湯通しもしておらず、根の周皮を除いて乾燥した A-II, B-II, C-II 及び周皮をつけたまま熱風乾燥した C-I では顕著な変色を示しており、それらは Paconiflorin 含量の低下と Benzoic acid 含量の増加に連動していた。外見から品質を類推するための指標となり得ると考える。

新鮮なシャクヤクの根にはポリフェノールオキシダーゼが存在し、根を傷つけることにより酵素が働き、褐変することが知られている<sup>5)</sup>。低温貯蔵及び湯通し処理はこの酵素の失活と関連があるものと思われる。

### 【結論】

栽培4年目の薬用品種「梵天」の根(直径1.5~2.0 cm)を用いて、加工調製法の違いによる成分含量の変化を検討した。太さの揃った根を8個体ずつ均等にグループ分けしてから、15通りの加工・

乾燥法を行い、各グループ内5個体について8成分の含量を測定し、比較した。その結果、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（E-III）が最もよい成分含量を示した。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、PGG, Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が顕著に増加することが明らかになった。

以上のように、品質の良い芍薬を生産する加工調製法が設定できた。この方法は、湿度が高く、シャクヤクの根の乾燥には不向きとされる富山県においても実行できる。優良品種の確定、栽培普及、収穫時の機械化とともに、今回設定した方法で芍薬を製品化することにより、付加価値を有する富山県産ブランド芍薬の生産が実現できることが期待される。

## 引用文献

1. 厚生労働省編、『第十六改正日本薬局方』，東京，2011，p.1514.
2. 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（2）—平成21年度および22年度の使用量，2013，pp.4, 8.
3. 国家薬典委員会編、『中華人民共和国薬典』，2010年版，第一部，中国医薬科技出版社，北京，2010，pp.96-97（白芍），147-148（赤芍）.
4. 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(1), 35-45 (2015).
5. 林茂樹，姉帯正樹，佐藤正幸，柴田敏郎：北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が生薬の品質に及ぼす影響，*生薬学雑誌*，64(2)，68-75（2010）.