

hydrochloride は 5 μ L

固定相：シリカゲル HPTLC

展開溶媒：酢酸エチル/エタノール/アンモニア水 (40:3:2)

検出方法：ドラーゲンドルフ試液を噴霧し、風乾後、亜硝酸ナトリウム試液を噴霧

備考：第 15 改正局方第二追補収載の真武湯・牛車腎気丸・八味地黄丸エキスにおける附子確認試験を参考にした。

第 15 改正局方第二追補収載の真武湯エキスなどにおける附子確認試験では、アンモニア試液により抽出し、ジエチルエーテルで分配した画分について TLC 分析を行っているが、この条件では夾雑物が多く、benzoylmesaconine hydrochloride を検出することができなかつたため、pH6.0 リン酸緩衝液で抽出した後に陽イオン交換樹脂により試料を精製した。ドラーゲンドルフ試液及び亜硝酸ナトリウム試液を噴霧した TLC において、完全処方及び附子単味の試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、benzoylmesaconine hydrochloride 標準溶液から得た茶褐色のスポットと色調及び R_F 値 (0.38) が等しく、去附子処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が附子確認試験として適用し得ることが分かった (図 4C)。

当帰芍薬散加附子の定量法あるいは成分含量測定法

当帰芍薬散加附子における定量法あるいは成分含量測定法は、HPLC を利用して行うものとし、その指標成分候補として、芍薬含有の paeoniflorin、白朮含有の atractylenolide III 及び沢瀉含有の alisol A を選択した。I)~III) に、当帰芍薬散加附子における上記 3 つ成分の定量法に関する検討結果を記載する。

I) Paeoniflorin 定量法の条件検討

第 15 改正日本薬局方収載の葛根湯エキスにおける paeoniflorin 定量法を参考にして、当帰芍

薬散加附子エキスにおける paeoniflorin の HPLC 分析条件を検討した。葛根湯エキスにおける paeoniflorin 定量法では、カラム温度が 20°C に規定されているため、その条件に合わせて分析したところ、当帰芍薬散加附子完全処方エキス由来の試料は良好な分離を示し、paeoniflorin は保持時間 9.6 分のピークとして観察された (図 5A)。paeoniflorin に相当する保持時間には、去芍薬処方エキス由来の試料においてピークが検出されず (図 5B)、本分析条件が paeoniflorin 定量法として適用し得ることが分かった。また、さらに高温の条件での分離について検討したところ、25°C (図 6) 及び 30°C (図 7) においても良好な分離結果を示した。カラム温度 30°C では paeoniflorin の保持時間は 8.3 分であり、より短時間で分析できる利点もあった。以上より、下に示す分析条件が paeoniflorin 定量法案として設定された。

検出器：UV 検出器 232 nm

カラム：Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 250 mm)

カラム温度：30°C

移動相：水/アセトニトリル/リン酸 (850:150:1)

流速：1.0 mL/min

II) Atractylenolide III 定量法の条件検討

Atractylenolide III の定量法はこれまで示されていないため、独自に考案した。水及びアセトニトリルを基本とした分離を検討することとし、水/アセトニトリル (3:2) による分離を試みたところ (図 8)、attractylenolide III は保持時間 17.7 分のピークとして観察され (図 8A)、これに相当する保持時間には、去白朮処方エキス由来の試料においてピークが検出されず (図 8B)、良好な分離を示した。しかし、保持時間がやや遅いため、アセトニトリルの割合を増やし、水/アセトニトリル (11:9) による分離を試みた

ところ (図 9)、atractylenolide III は保持時間 11.6 分のピークとして観察され (図 9A)、これに相当する保持時間には、去白朮処方エキス由来の試料においてピークが検出されなかった (図 9B)。また、atractylenolide III のピークに近接したピーク (図 9A の保持時間 12.6 分) との分離を改善するため、溶離液にリン酸を加えてみたが、改善効果は期待するほどではなかった (図 10)。さらに、図 8~10 のチャート中に「peak X」と表示した白朮特異的なピークが観察された。以上の結果より、図 9 の分析条件に相当する、下記の本分析条件を atractylenolide III 定量法案として設定した。

検出器 : UV 検出器 220 nm

カラム : Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 水/アセトニトリル (11:9)

流速 : 1.0 mL/min

III) Alisol A 定量法の条件検討

第 15 改正日本薬局方収載の柴苓湯エキスの TLC による沢瀉確認試験では、alisol A が指標成分となっているため、これを HPLC による成分定量法に応用すべく検討を行った。当帰芍薬散加附子完全処方エキス由来の試料は、ODS カラム C-18 を用いた以下の HPLC 分析条件において良好な分離を示し、alisol A は保持時間 17.2 分のピークとして観察された (図 11A)。ただし、これに相当する保持時間には、去沢瀉処方エキス由来の試料においてもピークが検出された (図 11B)。

検出器 : UV 検出器 200 nm

カラム : Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 水/アセトニトリル (1:1)

流速 : 1.0 mL/min

D. 考察

当帰芍薬散加附子は 7 種類の生薬から構成され、シリカゲル TLC プレート上で多くのスポットを与えるが、4 種類の生薬について確認試験法となり得る分析条件を見出すことができた。当帰及び川芎は、同じセリ科に属する基原植物に由来し、含有成分も非常に類似しているため、この両者を識別し、なおかつ処方中の他の成分とも区別されるような特異的成分を見出すことはできなかった。また、茯苓については目立ったスポットが検出されず、特定成分の濃縮や呈色試薬の工夫等により含有成分を TLC 上で検出することがまず優先事項であると思われる。

今回の確認試験の条件検討では、日本薬局方に確認試験法の記載がある生薬については、その分析法を積極的に参考にするスタンスで臨み、多くの場合において、これらの情報は非常に有用であった。芍薬、白朮及び沢瀉については、局方収載の葛根湯エキス、補中益気湯エキス及び柴苓湯エキスにおける確認試験法をそれぞれ準用することができた。加工ブシについては、第 15 改正局方第二追補収載の真武湯エキス、八味地黄丸エキス及び牛車腎気丸エキスにおける附子確認試験を参考としたが、これらの処方では、アンモニア試液により抽出し、ジエチルエーテルで分配した画分について TLC 分析を行っているが、この条件では夾雑物が多かったため、pH6.0 リン酸緩衝液で抽出した後に陽イオン交換樹脂により試料を精製する方法を考案し、benzoylmesaconine hydrochloride の特異的な検出に成功した。

ところで、一般用漢方製剤の製造方法、規格及び試験方法等は医療用漢方製剤の取扱いに準じることとされており、これは、昭和 55 年 6 月 25 日付薬審第 804 号別添「医療用漢方製剤の取扱いについて」及び昭和 60 年 5 月 31 日付薬審二第 120 号通知の別紙 1「標準湯剤との比較試

験に関する資料について」に規定されている。ここでは、2 指標成分以上の定量を実施することが義務付けられている。ただし、この規定が適用されてから 20 年以上が経過した現在、現代の科学水準に基づく品質評価法という観点からすれば指標成分の数は物足りない。また、第 15 改正日本薬局方において、初めて漢方処方エキスが記載され、ここでは 3 つの成分を指標とした定量法が規定されている。そこで、本研究においても 3 つの成分の定量法設定を目標とした。指標成分として paeoniflorin、atractylenolide III 及び alisol A の設定を計画したが、paeoniflorin については、局方記載の葛根湯エキス等における定量法をほぼそのまま準用することができた。ただし、葛根湯エキスにおいて規定されているカラム温度の 20℃は、たいてい室温よりも低いいため冷却機能を有するカラムオープンしか対応できない。そこで、25℃（図 6）及び 30℃（図 7）において測定したところ、同様に良好な分離結果を示したため、本研究では 30℃における分離を提案した。また、atractylenolide III 及び alisol A については、これまでに定量法について示されていないため、独自に分析法を検討し、atractylenolide III については目的の定量法案を示すことができた。また、atractylenolide III については、図 8～10 において peak X と表示したピークも指標成分候補として見出した。peak X の方が atractylenolide III よりも保持時間は短く、また妨害ピークも少なかった。従って、このピークが単一の成分から構成され、しかも、容易に試薬として供給可能な化学構造を有する場合には、atractylenolide III に代わる指標成分となる可能性が示された。ただし、現時点で本ピークの本質は明らかになっていない。一方、alisol A については、去沢瀉処方エキス由来の試料においても同じ保持時間に何らかのピークが検出され、このピークの同定が課題として残された。このピークが alisol A と同一化合物で

ないならば、alisol A と分離させる分析条件の開発により、alisol A の定量法の設定が可能と思われた。

漢方処方の成分組成は構成生薬が一つ増えただけでも大きく変化する場合があるため、基本的に新規収載候補処方の品質評価法は個別に検討せざるを得ないが、本研究で局方等に既収載の処方あるいは生薬の確認試験法や成分定量法を取り入れたように、当帰芍薬散加附子において見出した分析条件が、当帰芍薬散加附子以外の新規処方の確認試験検討の参考情報として貢献することを期待している。

E. 結論

- ・当帰芍薬散加附子エキス中の生薬確認試験として、芍薬、白朮、沢瀉及び加工ブシについて、シリカゲル TLC を用いた条件設定案を提示することができた。特に、加工ブシにおいては、陽イオン交換樹脂により夾雑物を除去する新しいサンプル前処理方法を開発した。
- ・当帰芍薬散加附子エキス中の定量法あるいは成分含量測定法として、paeoniflorin 及び atractylenolide III を指標成分とする HPLC による分析条件案を提示することができた。

F. 研究発表

1. 学会発表
該当無し
2. 誌上発表
該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

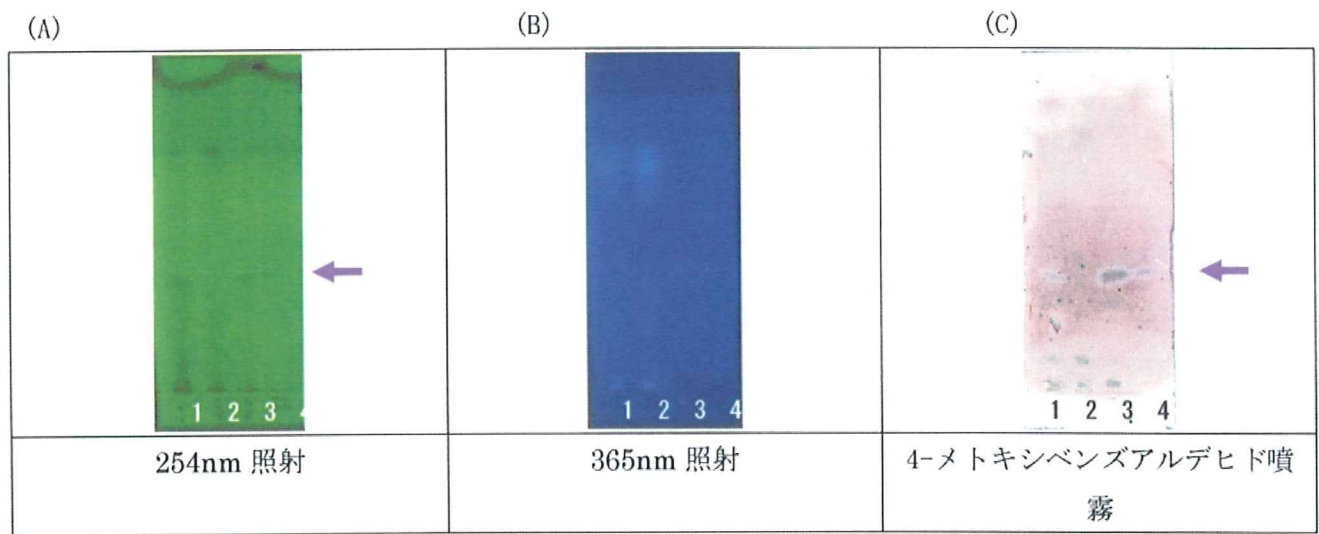


図1 当帰芍薬散加附子エキスにおけるシリカゲルTLCによる芍薬確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去芍薬処方 3…芍薬単味 4…paeoniflorin
 展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (20:3:2)

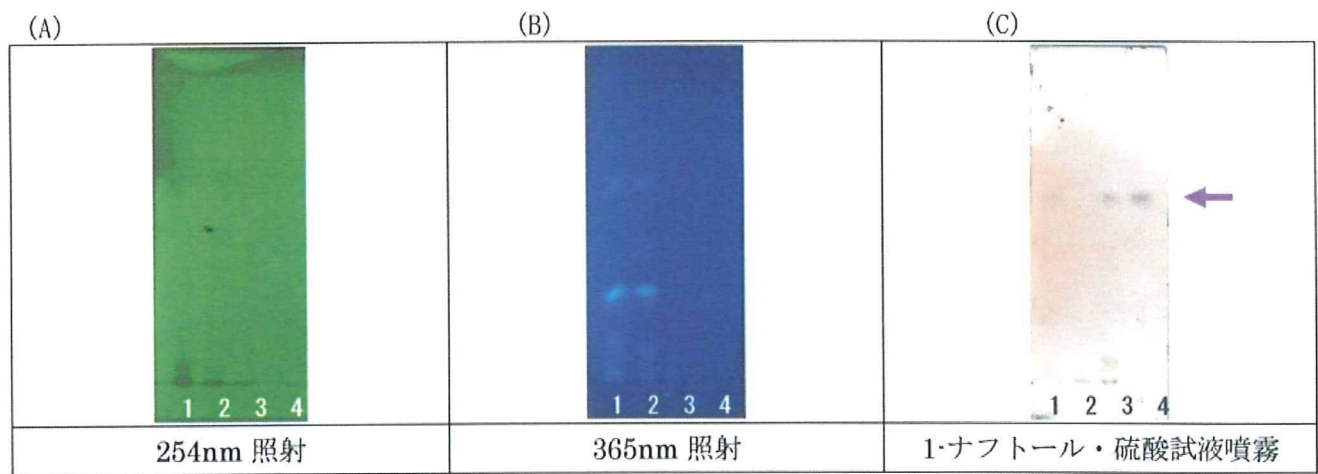


図2 当帰芍薬散加附子エキスにおけるシリカゲルTLCによる白朮確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去白朮処方 3…白朮単味 4…atractylenolide III
 展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル (1:1)

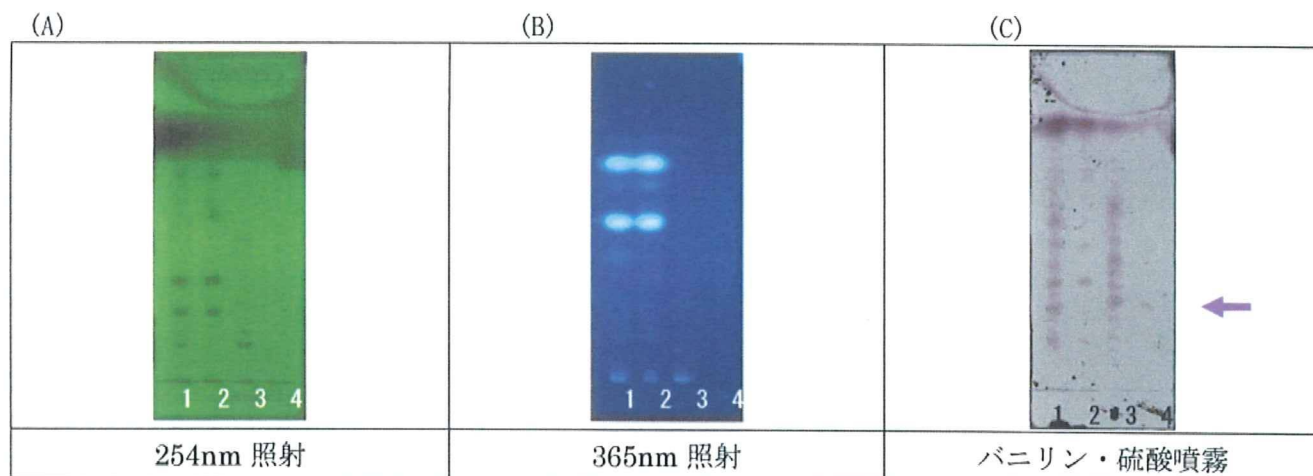


図3 当帰芍薬散加附子エキスにおけるシリカゲルTLCによる沢瀉確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去沢瀉処方 3…沢瀉単味 4…alisol A
 展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 (10:10:3)

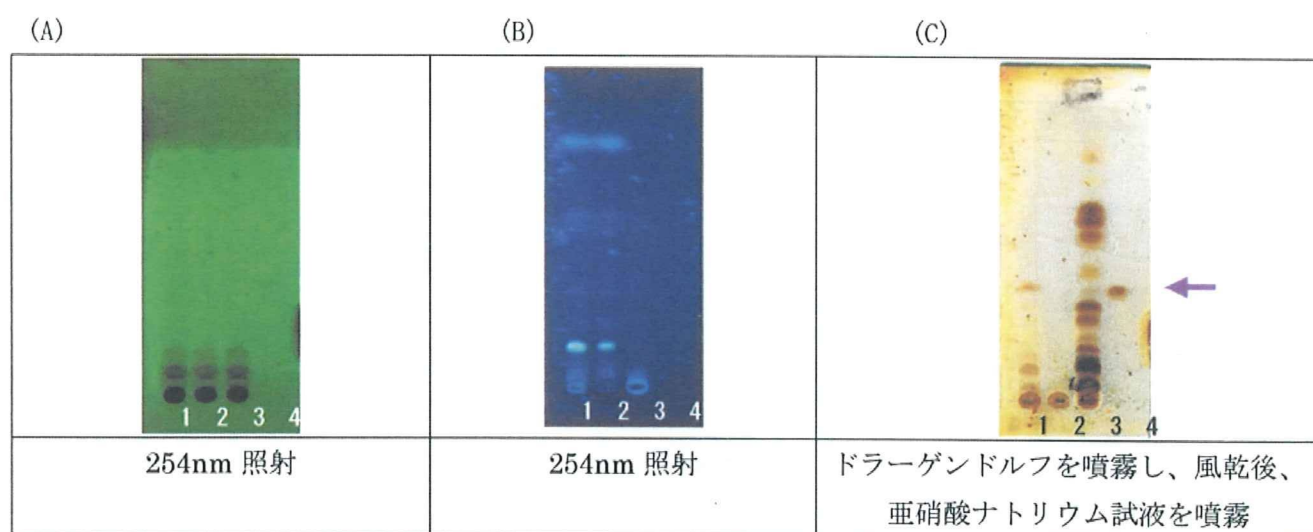


図4 当帰芍薬散加附子エキスにおけるシリカゲルTLCによる附子確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去附子処方 3…附子単味 4…benzoylmesaconine hydrochloride
 展開溶媒：酢酸エチル/エタノール/アンモニア水 (40:3:2)

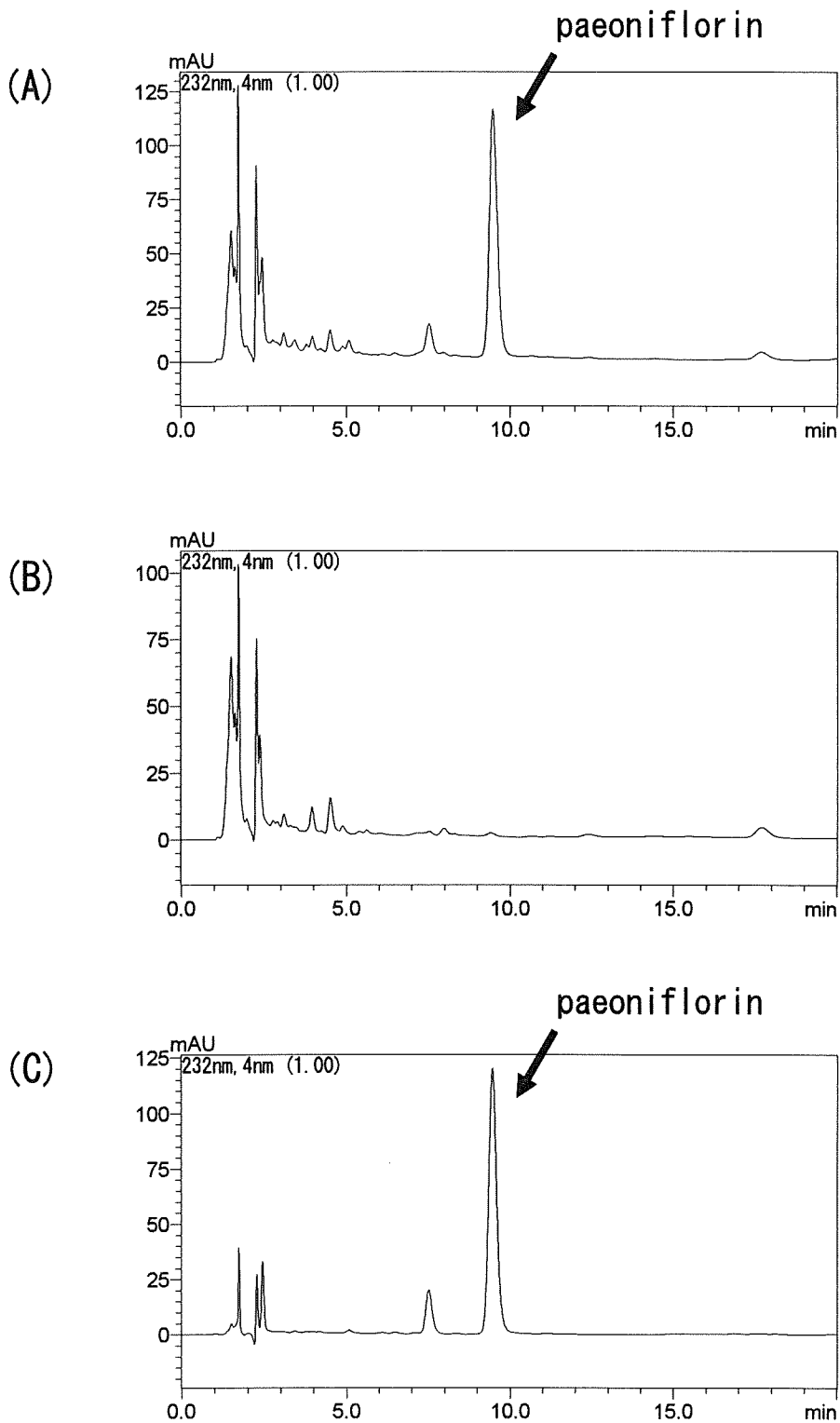


図5 当帰芍薬散加附子エキスにおける逆相 HPLC による paeoniflorin の定量分析 (その1)
 分析試料: (A) 当帰芍薬散加附子エキス、(B) 当帰芍薬散加附子去芍薬エキス、(C) 芍薬単味エキス

カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)

移動相: 水/アセトニトリル/リン酸 (850:150:1)

流速: 1.0 mL/min、検出波長: 232 nm、カラム温度: 20 $^{\circ}$ C

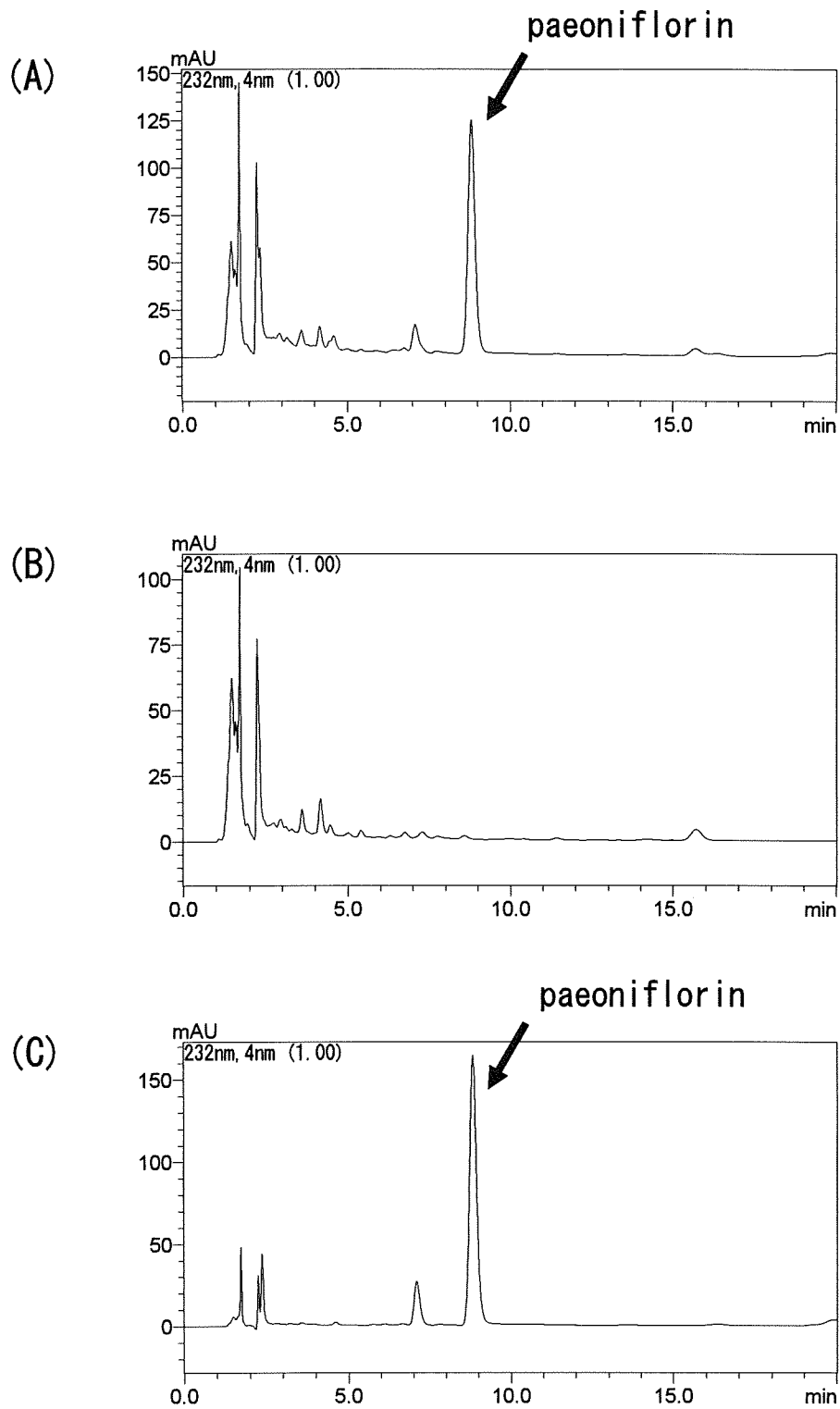


図6 当帰芍薬散加附子エキスにおける逆相 HPLC による paeoniflorin の定量分析 (その2)
 分析試料: (A) 当帰芍薬散加附子エキス、(B) 当帰芍薬散加附子去芍薬エキス、(C) 芍薬単味エキス
 カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)
 移動相: 水/アセトニトリル/リン酸 (850:150:1)
 流速: 1.0 mL/min、検出波長: 232 nm、カラム温度: 25 $^{\circ}$ C

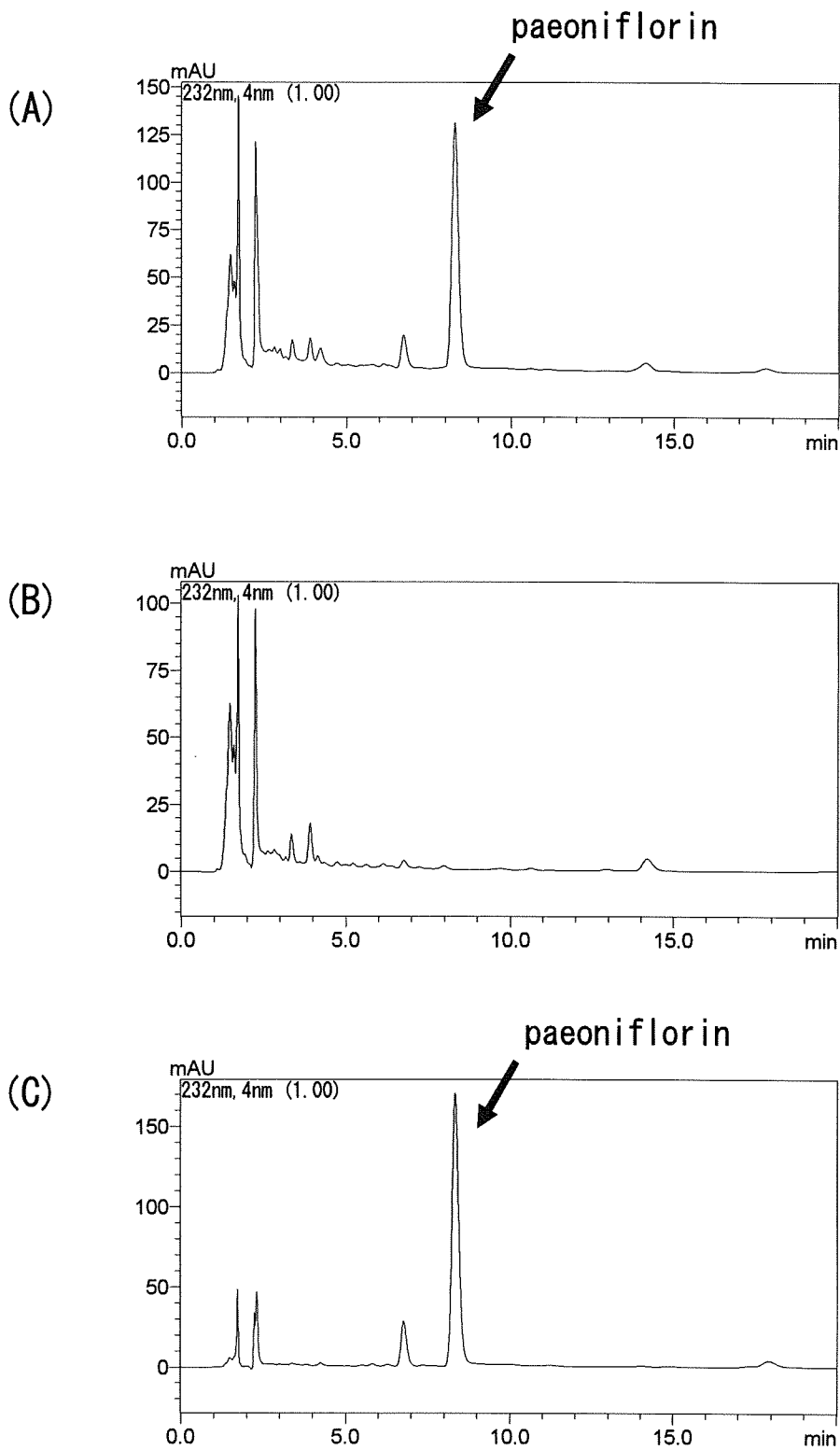


図7 当帰芍薬散加附子エキスにおける逆相HPLCによる paeoniflorin の定量分析 (その3)
 分析試料: (A) 当帰芍薬散加附子エキス、(B) 当帰芍薬散加附子去芍薬エキス、(C) 芍薬単味エキス
 カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)
 移動相: 水/アセトニトリル/リン酸 (850:150:1)
 流速: 1.0 mL/min、検出波長: 232 nm、カラム温度: 30 $^{\circ}$ C

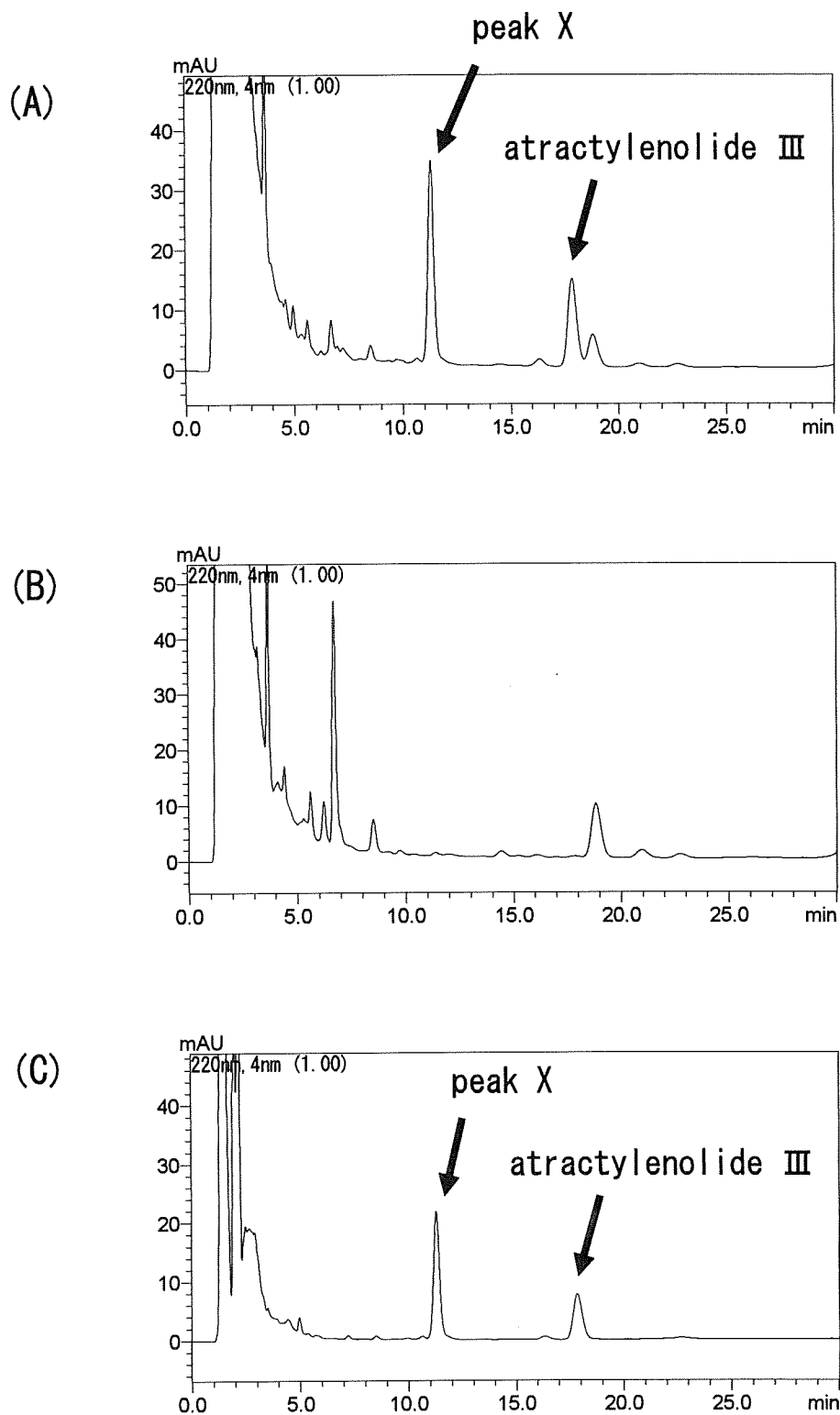


図8 当帰芍薬散加附子エキスにおける逆相HPLCによるattractylenolide IIIの定量分析(その1)
 分析試料: (A) 当帰芍薬散加附子エキス、(B) 当帰芍薬散加附子去白朮エキス、(C) 白朮単味エキス
 カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)
 移動相: 水/アセトニトリル (3:2)
 流速: 1.0 mL/min、検出波長: 220 nm、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

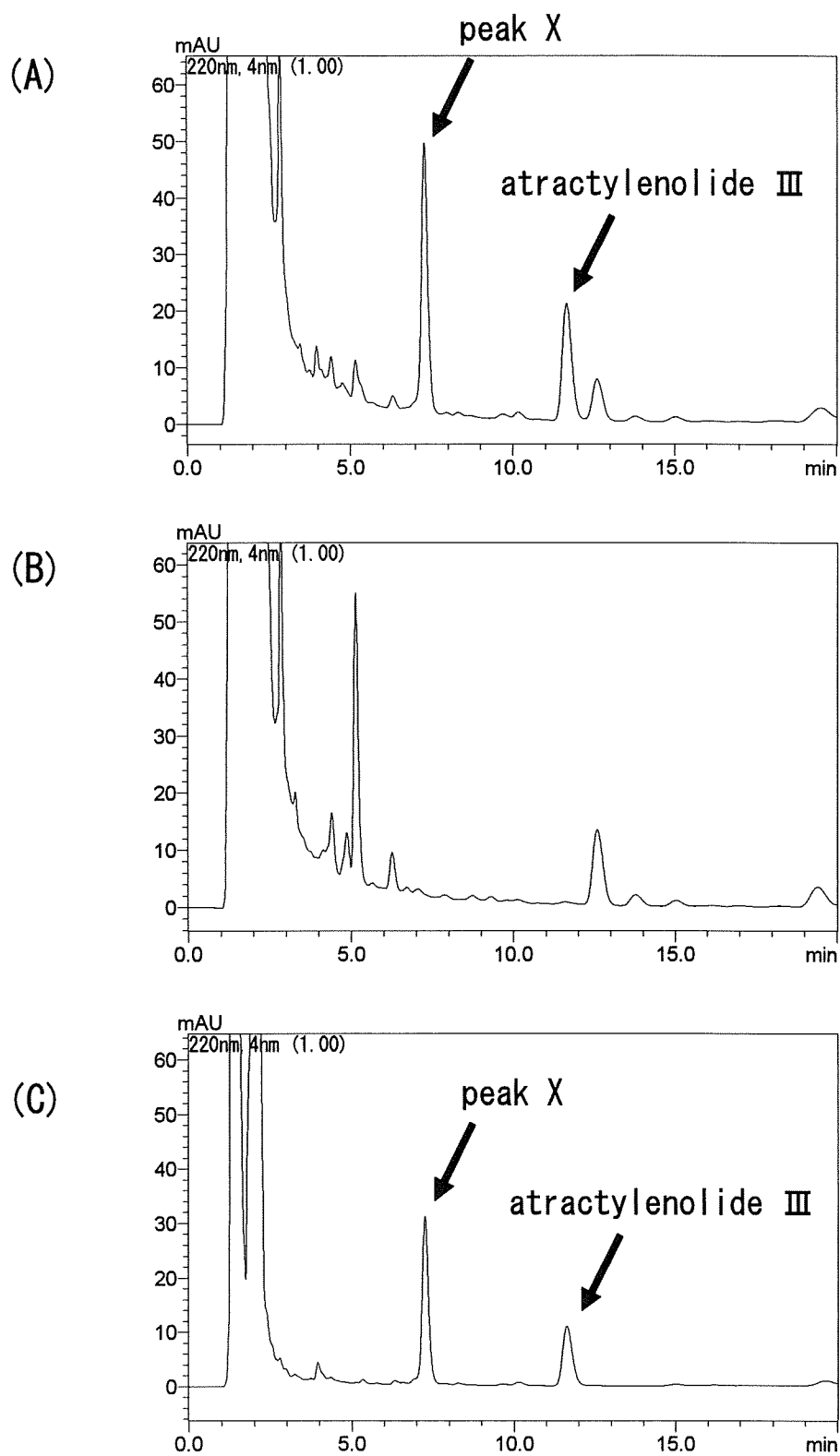


図9 当帰芍薬散加附子エキスにおける逆相 HPLC による atractylenolide III の定量分析 (その2)
 分析試料: (A) 当帰芍薬散加附子エキス、(B) 当帰芍薬散加附子去白朮エキス、(C) 白朮単味エキス

カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)

移動相: 水/アセトニトリル (11:9)

流速: 1.0 mL/min、検出波長: 220 nm、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

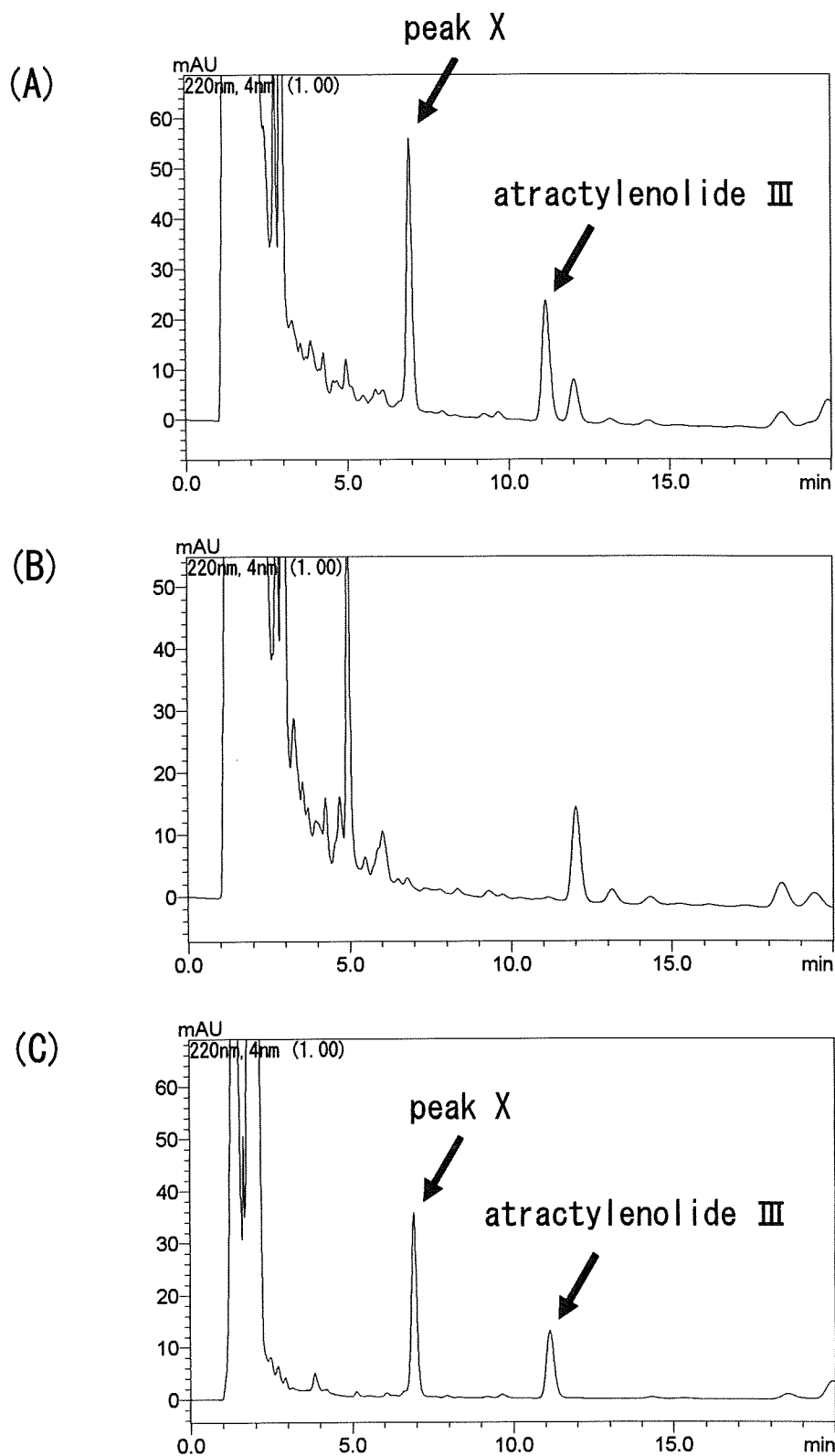


図 10 当帰芍薬散加附子エキスにおける逆相 HPLC による atractylenolide III の定量分析 (その 3)
 分析試料: (A) 当帰芍薬散加附子エキス、(B) 当帰芍薬散加附子去白朮エキス、(C) 白朮単味エキス
 カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)
 移動相: 水/アセトニトリル/リン酸 (550:450:1)
 流速: 1.0 mL/min、検出波長: 220 nm、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

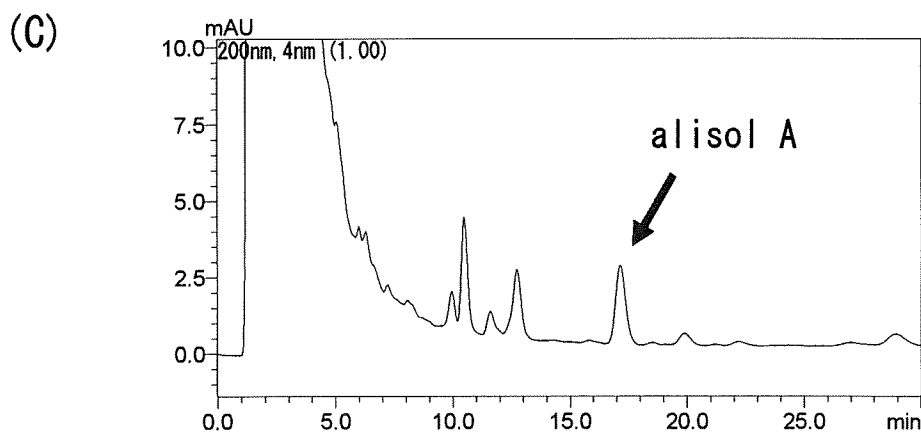
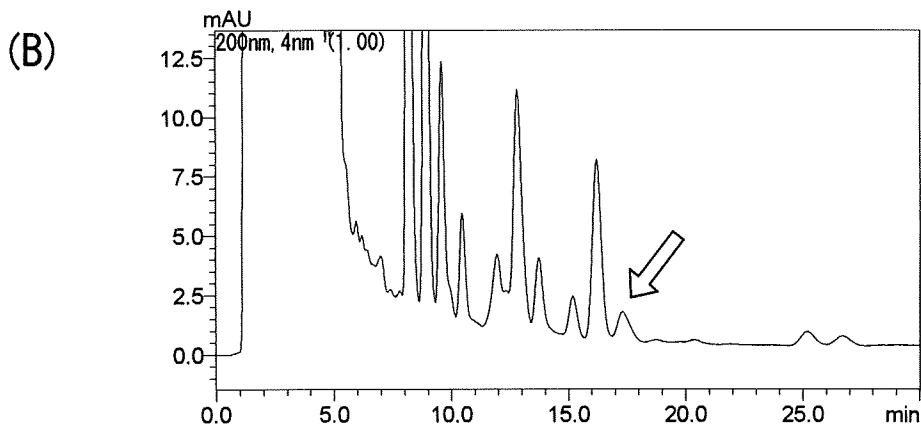
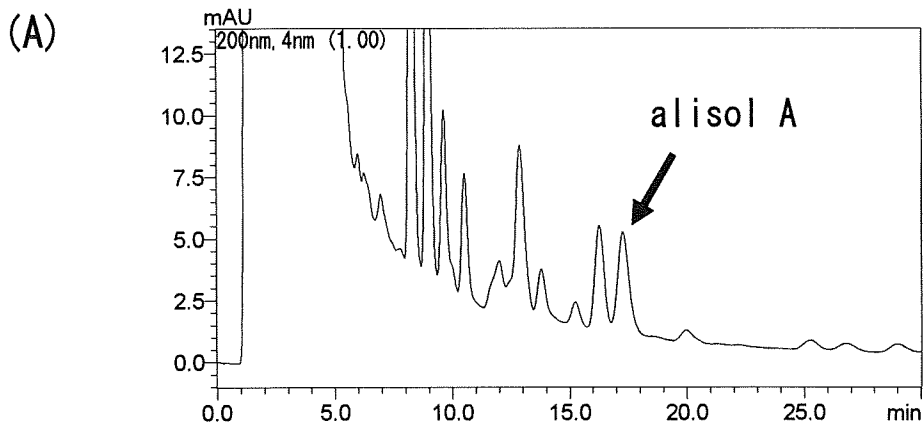


図 11 当帰芍薬散加附子エキスにおける逆相 HPLC による沢瀉の分析
 分析試料：(A) 当帰芍薬散加附子エキス、(B) 当帰芍薬散加附子去沢瀉エキス、(C) 沢瀉単味エキス

カラム：Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)

移動相：水/アセトニトリル (1:1)

流速：1.0 mL/min、検出波長：200 nm、カラム温度：40 $^{\circ}$ C

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 漢方処方製剤の同等性の評価に関するおよび漢方処方の安全性と
有効性に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

甘露飲処方による薬物排出トランスポーターの発現抑制に関する研究

これまで我々は、漢方処方の安全性及び有効性に関する研究の一環として、小腸培養細胞のトランスポーター遺伝子の発現に対する影響を検討し、甘露飲処方エキス及びその構成生薬である黄芩の煎出エキス、そして黄芩の主要成分である Wogonin が、薬物排出トランスポーターである MRP2 及び MRP3 の mRNA 量を著しく低減させることを見出している。本研究では、ウェスタンブロット解析により、40 μ M の Wogonin が MRP2 の発現をタンパク質レベルでも抑制していることを見出した。

A. 研究目的

高齢者の全人口に占める割合が増加し、国民の健康ニーズも多様化している中、天然物由来で高齢者や生活習慣病患者に受け入れられやすい漢方処方が注目されている。折しも、平成 21 年 6 月に改正薬事法が施行され、一般用医薬品はリスクの程度に応じて第 1 類より第 3 類に分類されたが、一般用漢方製剤は第 2 類に分類され、薬剤師や登録販売者による適切な情報提供のもとに販売されることになった。一般用医薬品を利用するセルフメディケーションに改めて国民の注目が集まる中、一般用漢方製剤の有効性や安全性をいかに担保し、品質をいかに確保していくか、という問題が今後益々重要になるものと思われる。

我々は平成 15～17 年度の厚生労働科学研究費補助金による医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「一般用漢方処方の見直しに資するための有用性評価（EBM 確保）手法及び安全性確保等に関する研究」において「一般用漢方処方の見直しを図るための調査研究班」を組織し、従来の一般用漢方処方「210 処方」の見直しと共に、現代社会に相応しいと考え得る新規処

方の追加について検討し、平成 17 年度末に「新一般用漢方処方の手引き案」を報告している。さらに、これを引き継いだ平成 18～20 年度の同研究事業「生薬及び漢方処方の有用性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」では、平成 19 年度末に「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」を報告している。そして、この手引き案（改訂版）を基礎として、厚生労働省一般用医薬品部会において一般用漢方処方の見直しが審議され、平成 20 年 9 月 30 日に厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として、「一般用漢方製剤承認基準の制定について」（薬食審査発第 0930001 号）が発出され、昭和 40 年代末に公表された一般用漢方処方 210 処方の承認審査内規は、多くの見直しと共に、内規から通知へと格上げされた。

今回の通知は、従来の内規に記載されていた 210 処方について見直したものであるが、「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」において新規追加が提案された処方 85 処方あり、これらについても、今後順次検討されていく予定である。これらの新規追加候補処方は、従来の 210 処方と同様に長年の臨床使用経験により有効性・安全性

を担保されているものであるが、この経験的な保証に加え、現代科学的視点による評価を付与することが必要と思われる。その一環として我々は、前出の厚生労働科学研究「生薬及び漢方処方の有効性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」において、経口摂取した食物・薬物の吸収に重要な役割を果たすトランスポーター分子に着目し、体内の主な吸収の場である小腸上皮細胞のモデル系を利用して、漢方処方「甘露飲」のトランスポーター遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。甘露飲は、上述の新規追加候補処方の一つであり、口内炎、舌の荒れや痛み、及び歯槽膿漏に効果があるとされ、一般用医薬品として理想的な効能・効果を有している。そして、甘露飲処方エキス及びその構成生薬である黄芩の煎出エキス、そして黄芩の主要成分である Wogonin が、小腸上皮細胞系培養細胞において、薬物排出トランスポーターMRP2 及びMRP3 の mRNA 量を著しく低減させることを見出した。本研究はこれを引き継ぐものとして、黄芩成分である Wogonin による MRP2 の発現抑制について、タンパク質レベルで検討した結果について報告する。

B. 研究方法

試薬

ヒト腸上皮細胞様細胞株 Caco-2 及び Non Essential Amino Acids (NEAA) は大日本住友製薬より購入した。DMEM 培地、0.25% Trypsin-EDTA (1 mM EDTA・4Na) 及び Penicillin-Streptomycin 溶液は Invitrogen より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は、カナダ Cansera 社製の CCT-Fetal Bovine Serum を三光純薬より購入した。Caco-2 細胞の分化培養には、BD の BioCoat 腸上皮分化エンバイロメントキットを用いた。M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent 及び Protease Inhibitor Cocktail kit は Thermo Scientific より購入した。タンパク質定量には、PIERCE の BCA Protein Assay Kit を用いた。ウェスタンブロットティングの膜には、GE Healthcare の Amersham

Hybond-P を用いた。タンパク質電気泳動のマーカーには、BIO-RAD の Precision Plus Protein Standard のブルー着色タイプと未着色タイプを用いた。未着色タイプマーカーの化学発光には、BIO-RAD の HRP 標識ストレプトアクチンを用いた。免疫染色には、GE Healthcare の Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いた。MRP2 の一次抗体には、ALEXIS BIOCHEMICALS の Monoclonal Antibody to MRP2 (M₂III-6) (Isotype: Mouse IgG2a) を使い、 β -actin の一次抗体には、SIGMA の Monoclonal Anti- β -actin (Isotype: Mouse IgG) を用いた。二次抗体には、GE Healthcare の Amersham ECL Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep) を用いた。写真のフィルムは Polaroid の 667 を用いた。Wogonin は和光純薬より購入した。その他の試薬は、いずれも各試薬メーカーの特級品を用いた。

機器

細胞は SANYO の CO₂ インキュベーター MCO-5AC で培養し、SANYO のクリーンベンチ MCV-91BNF 内で無菌操作を行った。タンパク定量における 562 nm の吸光測定には、Molecular Devices の吸光マイクロプレートリーダー Spectra MAX 190 を用いた。タンパク質電気泳動及びブロットティングは、BIO-RAD の Mini-PROTEAN Tetra Cell 及び Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell を用いた。ポラロイド写真の撮影は、GE Healthcare の Amersham ECL Mini-Camera により行った。

細胞培養

Caco-2 細胞の培養は、DMEM 培地 (10% FBS、1% NEAA、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin) で、37°C、5% CO₂、暗黒下に行った。継代する際は、Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin、1 mM EDTA・4Na) により 5 分間処理して細胞を浮遊・分散させ、新鮮培地に 1/5~1/20 の希釈倍率で播種した。

Caco-2 細胞の上皮細胞への分化誘導は、BD 社の BD BioCoat 腸上皮分化エンバイロメントキットを用い、フィブリコラーゲンマトリックスをコートしたメンブレンインサート上で行った。24 穴タイプのフィブリコラーゲンコートインサートに 2×10^5 cells/Insert の濃度で細胞を播種し、DMEM 培地で 24 時間培養した後、キット添付の分化誘導培地に交換し、さらに 48 時間培養して上皮細胞へ分化させた。

検体投与及び収穫

分化 Caco-2 細胞が培養されているインサートの培地に対して、8 mM Wogonin エタノール溶液を $5 \mu\text{L}/\text{mL}$ で添加し（最終濃度 $40 \mu\text{M}$ ）、 37°C 、5% CO_2 で再びインキュベートした。対照実験では同量のエタノールを添加した。6 時間あるいは 24 時間インキュベートした後、培地を除去し、細胞に Lysis Buffer (Protease Inhibitor Cocktail を $10 \mu\text{L}/\text{mL}$ で含む M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent) を加えて溶解し、その溶解液の一部をタンパク定量に回し、残りを -80°C で保存した。タンパク定量は、PIERCE の BCA Protein Assay Kit を用いた比色定量 (562 nm) により行った。

タンパク質の電気泳動及びブロッティング

SDS-PAGE タンパク質電気泳動は、7.5%ゲルで行い、各レーンに試料 $20 \mu\text{g}$ ずつロードし、また、端の 2 レーンにブルー着色及び未着色のマーカーをロードし、ゲル当たり 20mA の定電流で泳動した。泳動の様子は着色マーカーにより目視で確認した。泳動したタンパク質は、PVDF メンブレンに対して 100V の定電圧でブロッティングした。

抗 MRP2 抗体による免疫染色

タンパク質をブロットした膜は、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents のプロトコールに従って免疫染色した。ブロッキングは、5% ECL blocking reagent in TBS-T (0.1% Tween 20) で 1 時間行った。MRP2 の一次抗体を TOYOBO

の Can Get Signal Solution 1 により 1:100 に希釈し、これを膜に載せて 4°C で終夜インキュベートした。Horseradish peroxidase で標識した二次抗体は、TOYOBO の Can Get Signal Solution 2 により 1:50,000 に希釈し、さらに HRP 標識ストレプトタクチンを加え、これを膜に載せて室温で 1 時間インキュベートした。膜を TBS-T (0.1% Tween 20) により洗浄した後、ECL Plus 検出試薬を載せ、室温で 5 分間インキュベートし、その発光を Polaroid 667 フィルムにて撮影した。

抗 β -actin 抗体による免疫染色

上記の MRP2 検出済みの膜より抗体等を剥がし、抗 β -actin 抗体によるリプロービングを行った。膜を ECL Plus Western Blotting Detection Reagents の Stripping buffer により 60°C で 30 分処理し、5% ECL blocking reagent in TBS-T (0.1% Tween 20) で 1 時間ブロッキングした。 β -actin の一次抗体は、5% ECL blocking reagent in TBS-T (0.1% Tween 20) により 1:10,000 に希釈し、これを膜に載せて 4°C で終夜インキュベートした。その後の二次抗体処理及び検出は MRP-2 と同じ方法により行った。

倫理面への配慮

本研究はで用いるヒト培養細胞はいずれも株化されて全世界で汎用される細胞であり、倫理面を考慮すべき研究材料ではない。

C. 研究結果

最終濃度 $40 \mu\text{M}$ の Wogonin で処理した Caco-2 細胞における MRP2 のタンパク質発現をウェスタンブロットにより解析した (図 1)。検出感度は低いが、Wogonin 処理前 (レーン A) に発現が確認された約 200kD の MRP2 タンパク質は、Wogonin 処理後 6 時間 (レーン D) では明らかに発現が低下していた。この間、エタノールで処理した対照細胞 (レーン B 及び C) では、MRP2 の発現量は Wogonin 処理前 (レーン A) と変わらなかった。また、細

胞内タンパク質全体の指標として観察した β -actin タンパク質では、すべてのレーンにおいて発現量が変わらなかった。以上より、Wogonin 40 μ M で 30 時間処理した Caco-2 細胞において、MRP2 の発現はタンパク質レベルでも低減することが分かった。

D. 考察

平成 19 年度の「生薬及び漢方処方薬の有効性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究～甘露飲構成生薬のトランスポーター遺伝子発現への影響に関する研究」において、20 μ M 以上の Wogonin で 2 時間以上処理した際に、Caco-2 細胞の MRP2 及び MRP3 の mRNA 量が 20% 近くまで低下することを見出している。本研究の開始当初、Wogonin 20 μ M で 6 時間処理した Caco-2 細胞を材料として、MRP2 及び MRP3 のウェスタンブロットを行ったが、MRP3 は元々の発現量が低いために検出できず、MRP2 に関しては検出可能であるものの非常に感度が低く、その発現量の変化を判定することは難しかった（データ示さず）。そこで、MRP3 については解析を断念し、MRP2 は発現量の変動を明確に観察するために、Wogonin 濃度を 40 μ M に上げ、さらに、処理時間を 24 時間に延長した。また、平成 19 年度の研究及び上述の予備実験では、分化培地を血清不含の HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions) と交換した上で、Wogonin 等の検体処理を施していたが、血清不含のまま 24 時間培養することは細胞の生存に影響が出るため、HBSS への交換は行わず、血清を含む分化培地のままで検体処理を行うこととした。また、ウェスタンブロットにおけるバンド強度を上げるため、MRP2 の抗体処理に際し、抗体をブロッキング溶液で希釈せず、感度増強剤 (TOYOBO の Can Get Signal Solution) で希釈した。

Caco-2 細胞における MRP2 の発現量が低いことは既に知られており、他者の報告においても大量のタンパク質をウェスタンブロットに供する等の工夫が凝らされているが、いずれも鮮明なバン

ドは検出されていない。図 1 に示す通り、我々の場合も検出感度は十分に上がらなかった。しかし、40 μ M の Wogonin で 24 時間処理した Caco-2 細胞において、明らかに MRP2 の発現の低下を示すことができた。MRP2 の mRNA レベルは Wogonin 処理後 2 時間で 20% まで落ちることから、6 時間後であれば十分にタンパク質レベルも落ちると予想していたが、6 時間では対照サンプルの発現量と差が見られず、24 時間後の収穫において初めて発現低下が観察された。これは、MRP2 タンパク質の turn over が遅く、その寿命が長いことに起因するものと推測される。

平成 19 年度の前報においては、遺伝子レベルでのスクリーニングにおいて、甘露飲処方エキス及びその構成生薬である黄芩の煎出エキス、そして黄芩の主要成分である Wogonin が、小腸上皮細胞系培養細胞において、薬物排出トランスポーター MRP2 及び MRP3 の mRNA 量を著しく低減させることを見出した。今回、タンパク質のレベルでも発現が低下していることを見出し、実際に *in vivo* においても、甘露飲処方を含む黄芩配合処方により、MRP2 の発現低下が引き起こされる可能性が示された。MRP2 は上皮細胞内に吸収された薬物等を腸管側への排出することが役割とされているため、MRP2 の抑制は、処方の有効成分の排出速度の低減につながる可能性を持っている。また、当該処方の成分だけではなく、併用された薬物のうち MRP2 で排出されるものがあれば、その排出を抑え、血管側への吸収を促進する可能性も考えられる。すなわち、漢方処方の小腸上皮細胞トランスポーターに与える影響は、それ自身が当該処方の薬効の一部である可能性があり、また、併用される薬物あるいは共存する食物成分等との相互作用に関与する可能性があるため、漢方処方の有効性及び安全性を科学的に理解するためには、検討すべき非常に重要な指標であると思われる。今回の研究成果は、*in vitro* 培養のモデル系によって得られた限定的なものであるが、これを端緒に、動物実験などを通して、漢方処方とトランスポーター

との関係についてさらに研究が進展することを期待する。

E. 結論

一般用漢方処方の有効性・安全性に関する研究の一環として、ヒト小腸上皮細胞モデルを用い、新規収載候補処方の甘露飲の成分である Wogonin について、薬物排出トランスポーターである MRP2 の発現に与える影響を検討した。その結果、Wogonin は、40 μ M の濃度で MRP2 タンパク質の発現を抑制することが分かった。漢方処方の有効性の理解において、また、併用薬物及び食物成分等との相互作用という安全性の観点から、漢方処方のお小腸上皮細胞トランスポーターへの影響は、さらに注意深く検討されるべきと考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

該当無し

2. 誌上発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

分担研究課題 漢方処方製剤の同等性の評価に関するおよび漢方処方の安全性と有効性に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

腸内細菌 *Clostridium perfringens* の生育及び代謝に影響を及ぼす漢方処方の研究

漢方処方及び生薬エキスの腸内細菌の生育及び有機酸生成に対する影響を検討するため、前年度は *in vitro* 培養した腸内細菌 *Lactobacillus reuteri* を用い、顕微鏡観察画像における細菌占有面積より細菌増殖度を計測するアッセイ系を構築し、*L. reuteri* の増殖に影響を与える処方を見出した。今年度は *Clostridium perfringens* に本アッセイ系を適用し、効能・効果として下部消化管への作用が謳われる処方を中心にスクリーニングを行なった。その結果、*C. perfringens* の増殖を顕著に抑制する処方として、黄連解毒湯、乙字湯、桂枝加芍薬大黄湯、三黄瀉心湯、滋血潤腸湯、紫根牡蛎湯、小承気湯、大黄甘草湯、大黄牡丹皮湯、大柴胡湯、桃核承気湯及び麻子仁丸が見出され、その構成生薬に関する検討より、*C. perfringens* の大黄に対する感受性は極めて高いことが判明した。

研究協力者

勢ノ康代 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

A. 研究目的

腸内細菌叢の適切なバランスは宿主の健康を維持する上で極めて重要である。腸内細菌の多くは生育と共に酢酸、乳酸、酪酸等の有機酸を産生し、腸内の pH を下げて腸内環境を整える。また、生産された有機酸は宿主の腸管細胞よりエネルギー源として利用される。このため、腸内細菌叢の組成解明に関する研究やプロバイオティクス、プレバイオティクスを用いて腸内細菌叢や短鎖脂肪酸含量をコントロールする試み等が、ヒトを含む多くの動物を対象として盛んに行われている。漢方処方の作用発現における腸内細菌の関与も古くから論じられ、腸内細菌に代謝されることにより漢方処方成分の有効性に変化が生じる例はよく調べられている（表 1）。一方、漢方処方の服用が腸内細菌叢のバランス、腸内細菌の増殖及

び短鎖脂肪酸の生産に与える影響に関しては、あまり検討されていない。

さて、社会構造及び疾病構造の変化に加えて、自らの健康に強い関心を持つ国民が増え、軽度な疾病の予防や生活の質の改善、向上等を目標とした一般用医薬品によるセルフメディケーションの考え方が普及しつつあることを受けて、厚生労働省では、国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品の育成を考え、一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、その中間報告として、「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」を平成 14 年に発表している。そして、その具体的な方策の一つとして、一般用漢方処方の見直しとその積極的な活用が提言されている。

このような時代の要請と、一般用医薬品承認審査合理化等検討会の提言を受ける形で、厚生労働科学研究費補助金による医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「一般用漢方

処方を見直しに資するための有用性評価（EBM 確保）手法及び安全性確保等に関する研究」において「一般用漢方処方の見直しを図るための調査研究班」が組織され、従来の一般用漢方処方「210 処方」の見直しと共に、現代社会に相応しいと考え得る新規処方（85 処方）の追加が検討され、平成 17 年度末に「新一般用漢方処方の手引き案」として報告された。これを引き継いだ厚生労働科学研究費補助金による医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「生薬及び漢方処方の有用性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」では、平成 19 年度末に、「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」を報告している。そして、この手引き案（改訂版）を基礎として、厚生労働省一般用医薬品部会において一般用漢方処方の見直しが審議され、平成 20 年 9 月 30 日に厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として、「一般用漢方製剤承認基準の制定について」（薬食審査発第 0930001 号）が発出され、昭和 40 年代末に公表された一般用漢方処方 210 処方の承認審査内規は、多くの見直しと共に、内規から通知へと格上げされた。本通知は、従来の 210 処方に関して見直したものであるが、新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）において新規追加が提案された 85 処方についても、今後順次検討されていくものと期待される。

「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」に収載された新規追加候補処方は、長年の臨床使用経験により有効性・安全性を担保されているが、この経験的な保証に加え、現代科学的視点による評価を付与することが必要と思われる。我々は、前述の「生薬及び漢方処方の有用性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」において、漢方処方の有効性及び安全性に関する研究の一環として、ヒト腸内常在菌である *Lactobacillus reuteri* を取り上げ、その生育及び短鎖脂肪酸生産に及ぼす漢方処方及びその構成生薬の影響について検討を行った。本研究はこれを引き継ぎ、いわゆる悪玉菌の一種である *Clostridium*

perfringens を対象に、その生育への影響について検討した。

B. 研究方法

試薬及び器具

生薬はウチダ和漢薬より日本薬局方規格品を購入して用いた。生薬として販売していない粟、扁豆はウチダ和漢薬より購入し、蕪は高知県産のものを購入して用いた。D-glucose 及びブロムチモールブルーは関東化学の製品を用いた。アネロパックは三菱ガスケミカルの製品を用いた。嫌気ジャーは BD の GasPak 100 Holding Jar を用いた。96 穴マイクロプレートは AGC テクノグラス（IWAKI）の製品を用いた。0.22 μm 孔あるいは 0.45 μm 孔のメンブランフィルターは Millipore 社の Millex (PVDF) を用いた。顕微鏡観察用の細胞計数盤は、ワンセル社のワンセルカウンターを用いた。

腸内細菌

腸内細菌の基準株 *Clostridium perfringens* JCM 1290 は理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より購入した。

設備及び機器

生薬を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥は FREEZE DRYER FDU-830（東京理化）を用いて行った。オートクレーブには MAC-601（東京理化）を用いた。培地のガス噴射法による窒素置換は、嫌気性培養装置 AG-2（三神工業）により行った。嫌気グローブボックスは米国 COY 社の製品を用いた。pH の測定は、簡易 pH メーター Twin pH（HORIBA）及びストライプ pH 試験紙（PEHANON）を用いた。観察・撮影は、Olympus の位相差顕微鏡 IX51 及びデジタルカメラ DP20 を用い、画像処理・画像解析には WinROOF（MITANI）を用いた。OD₆₀₀ 測定には、NanoDrop ND-1000（Thermo Scientific）を用いた。