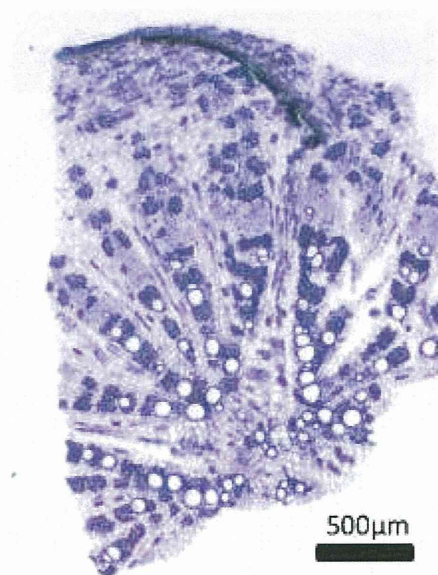
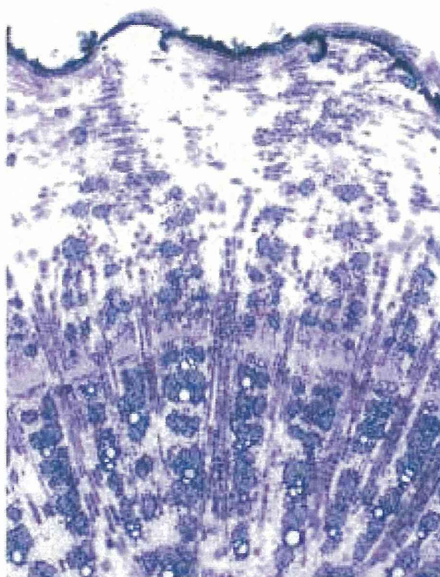
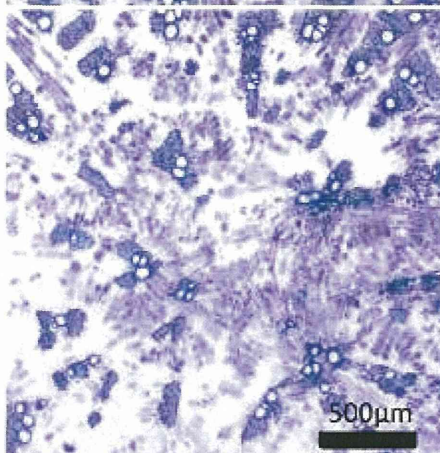
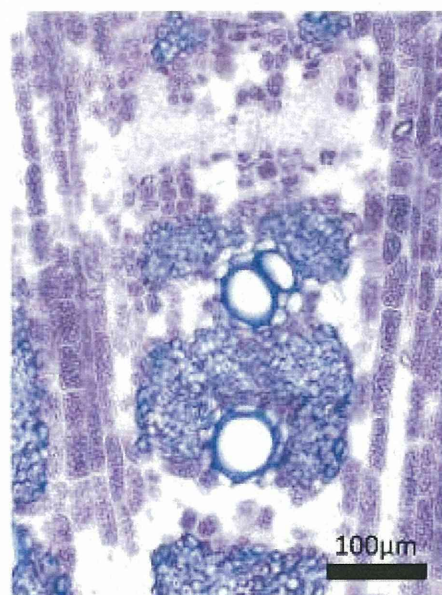




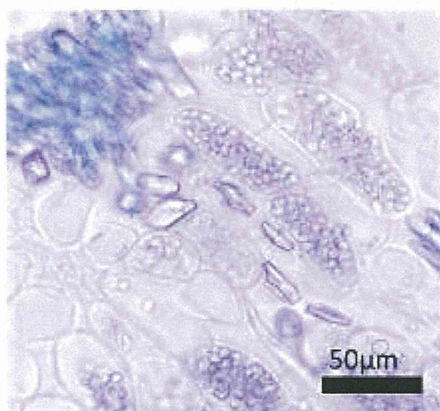
細いところの横切片全体(軽く漂白)



太いところの横切片全体(軽く漂白)

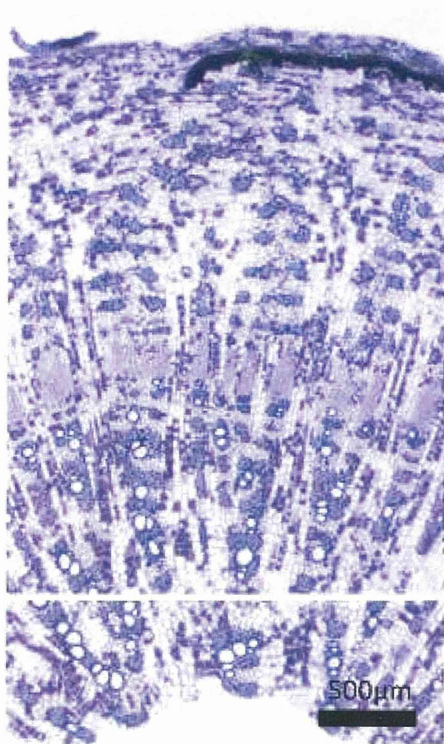


太いところの道管周辺

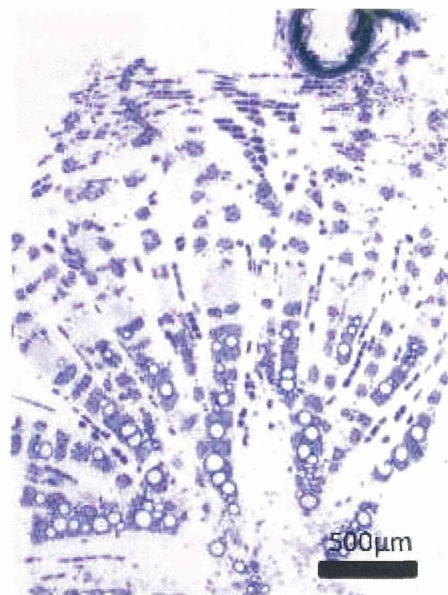


太いところの皮部柔組織中の
シュウ酸カルシウム単晶

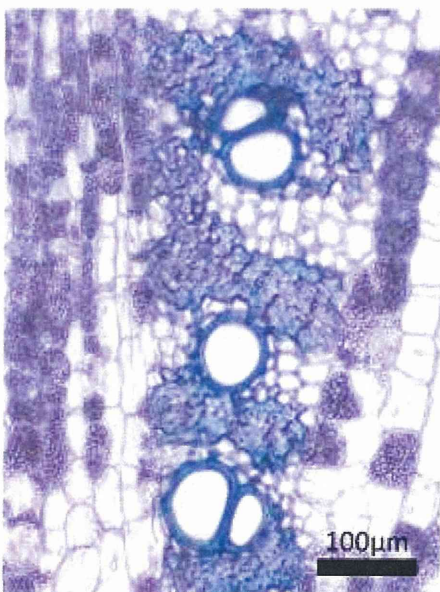
図 7-2. 圃場栽培品甘草 IV2-HK1 (北海道栽培) の横切片鏡検図



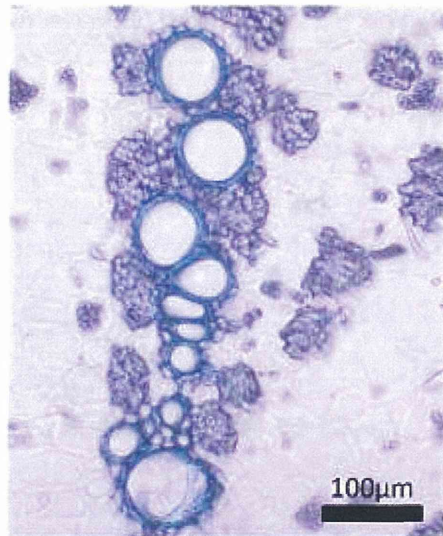
太いところの横切片全体(軽く漂白)



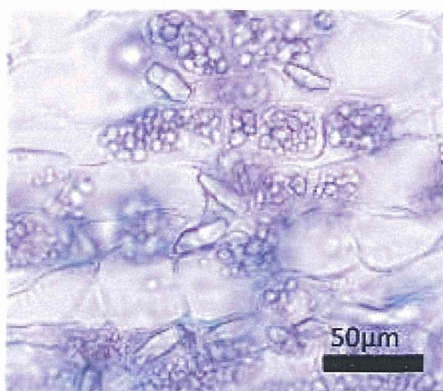
細いところの横切片全体(軽く漂白)



太いところの道管周辺

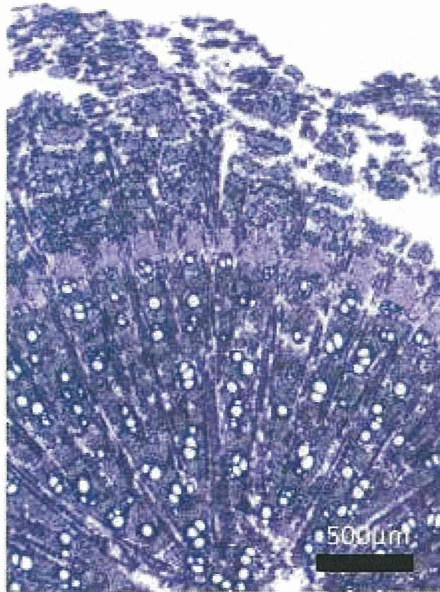


細いところの道管周辺

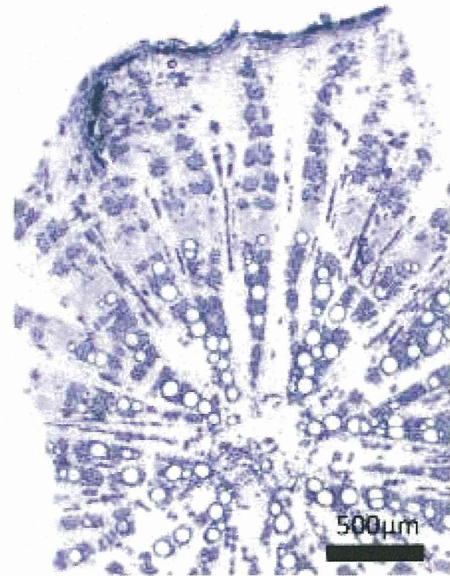


太いところの皮部柔組織中の
シュウ酸カルシウム単晶

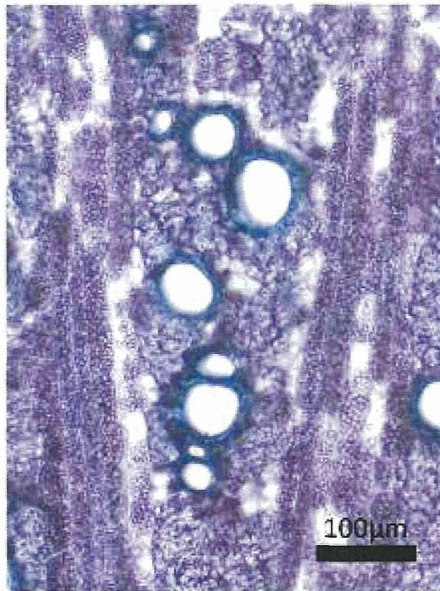
図 7-3. 圃場栽培品甘草 IV2-TN1 (種子島栽培) の横切片鏡検図



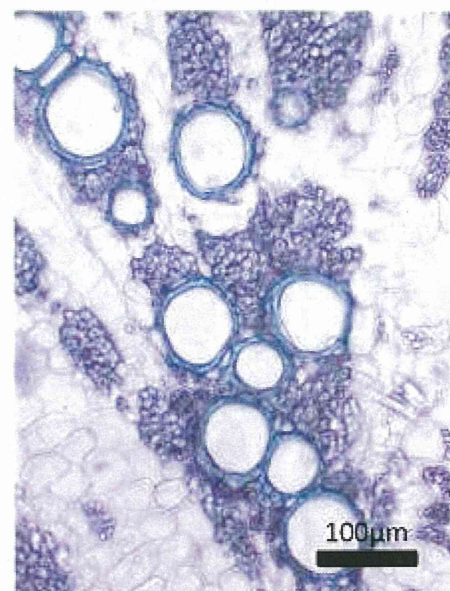
太いところの横切片全体(軽く漂白)



細いところの横切片全体(軽く漂白)



太いところの道管周辺



細いところの道管周辺

図 7-4. 圃場栽培品甘草 IV2-TS (つくば栽培) の横切片鏡検図

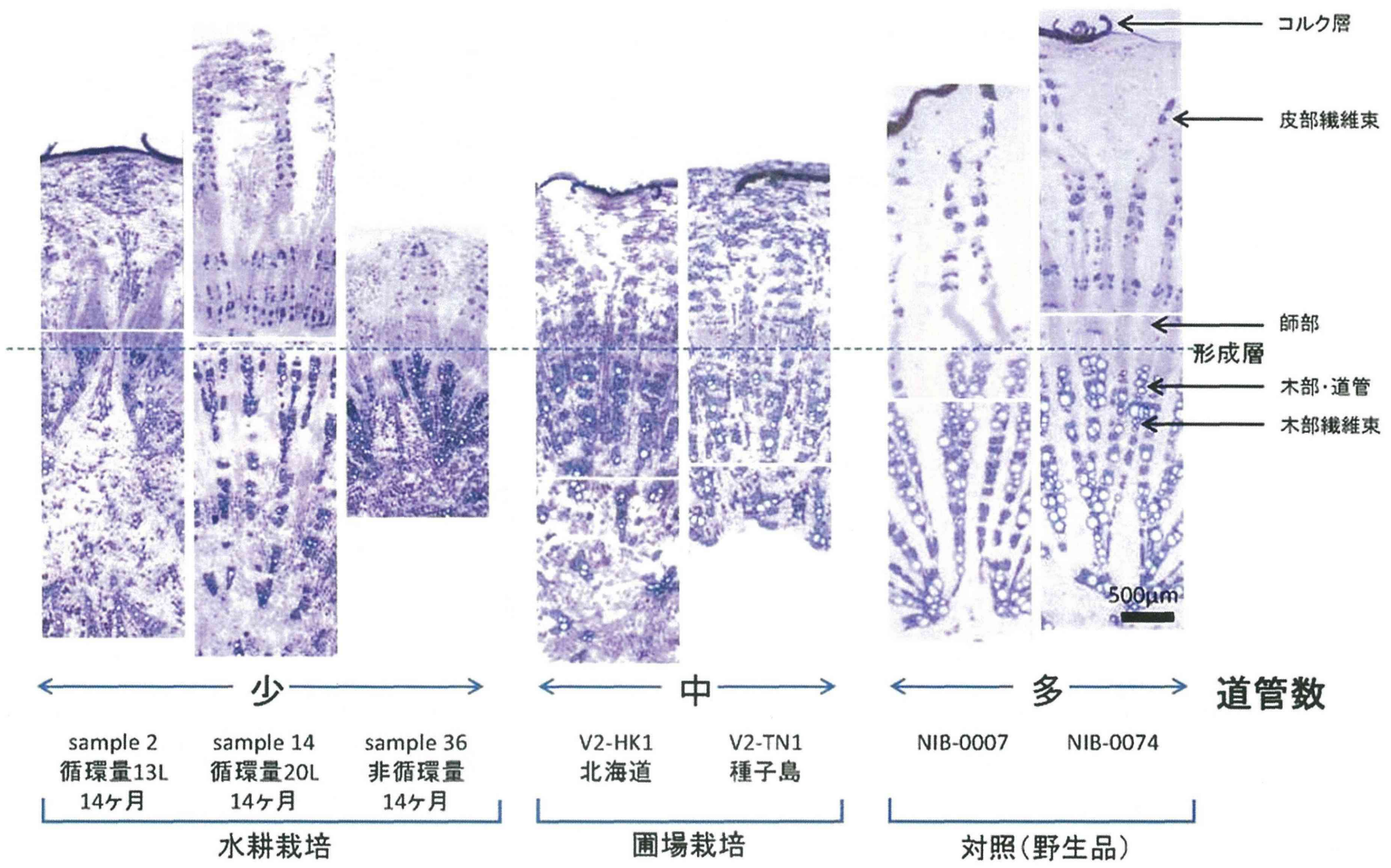
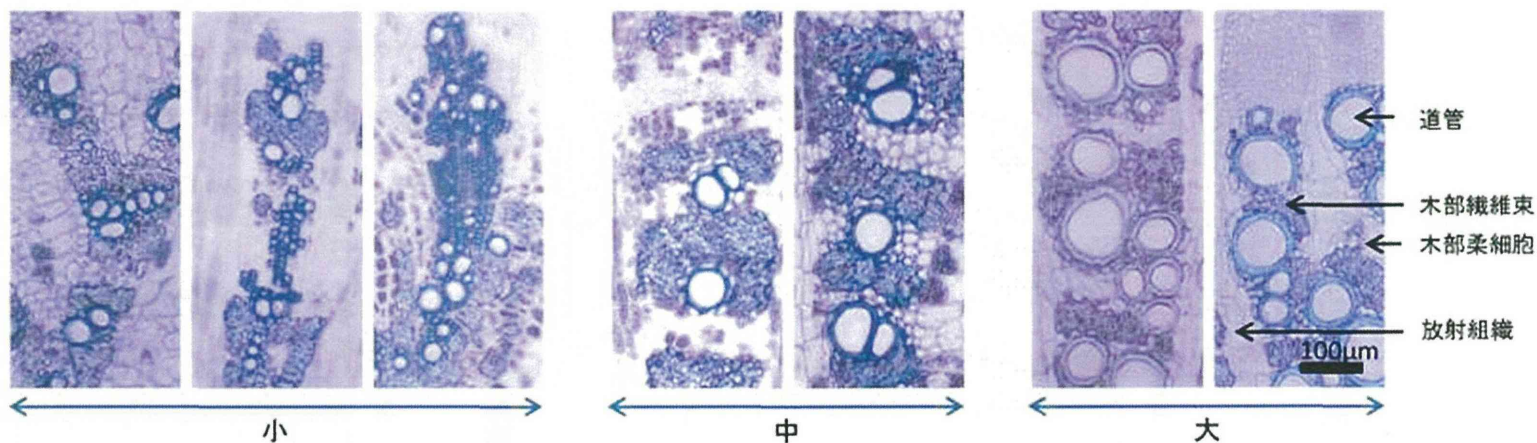


図 8. カンゾウにおける水耕栽培品、圃場栽培品、野生品の横切片性状比較 (全景)

A. 木部



B. 皮部のシュウ酸カルシウム単晶

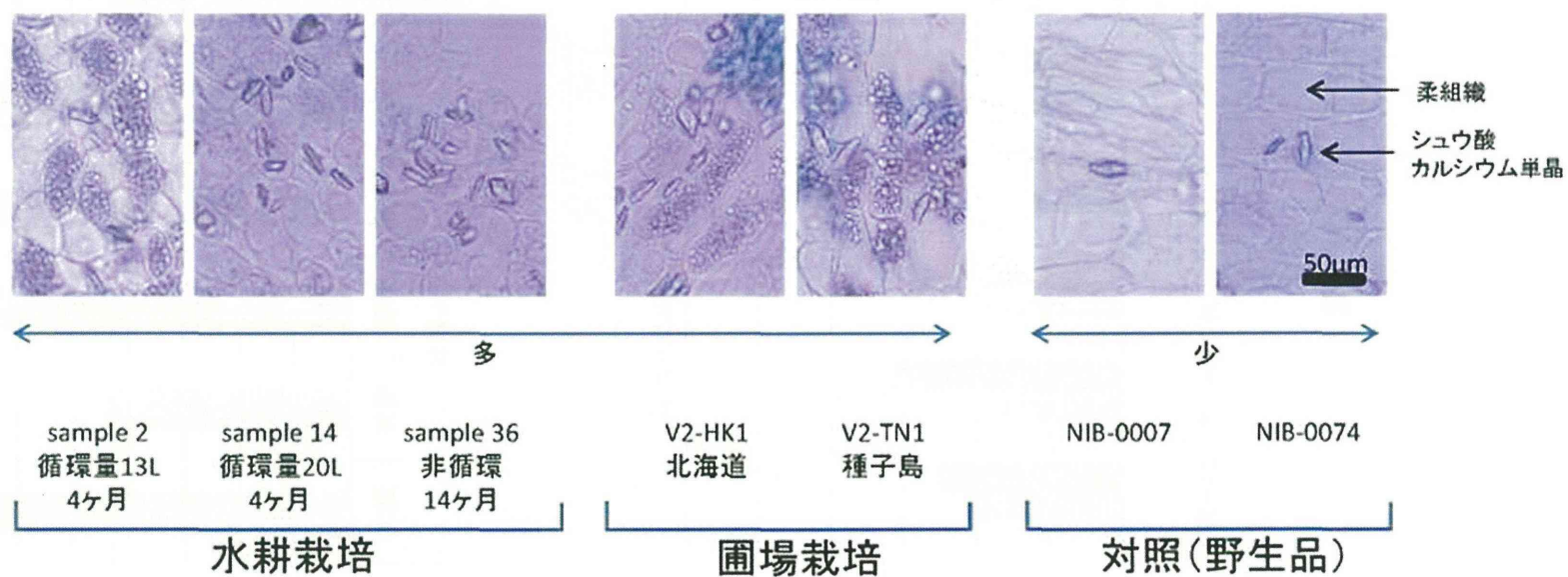


図9. カンゾウにおける水耕栽培品、圃場栽培品、野生品の横切片性状比較
(A. 木部、B. 皮部のシュウ酸カルシウム単晶)

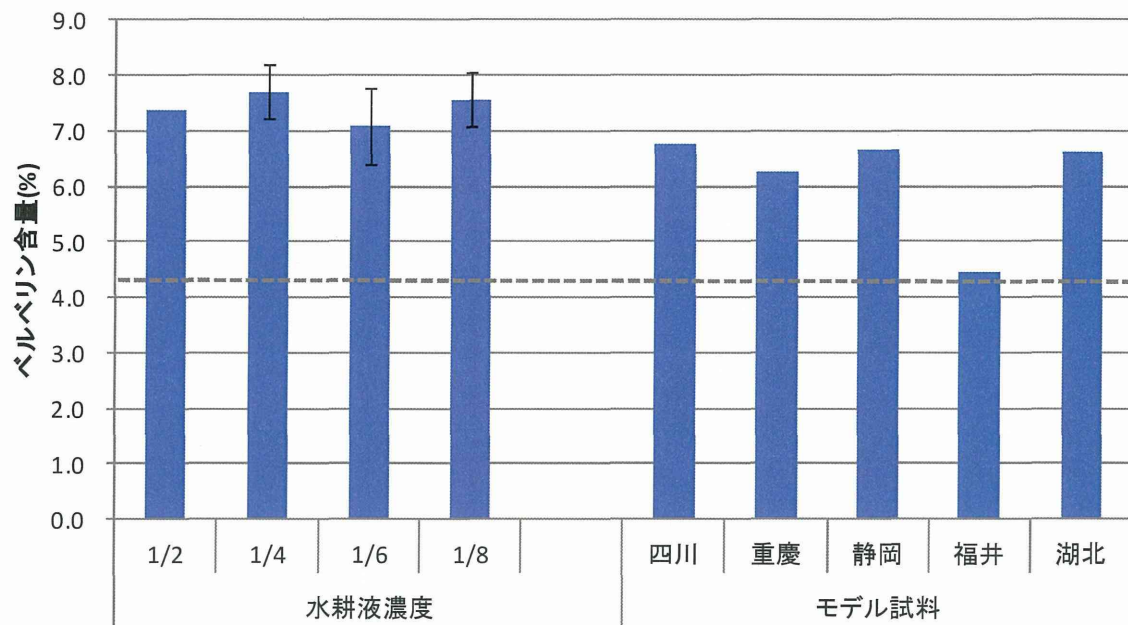


図 10. 黄連 ベルベリン含量

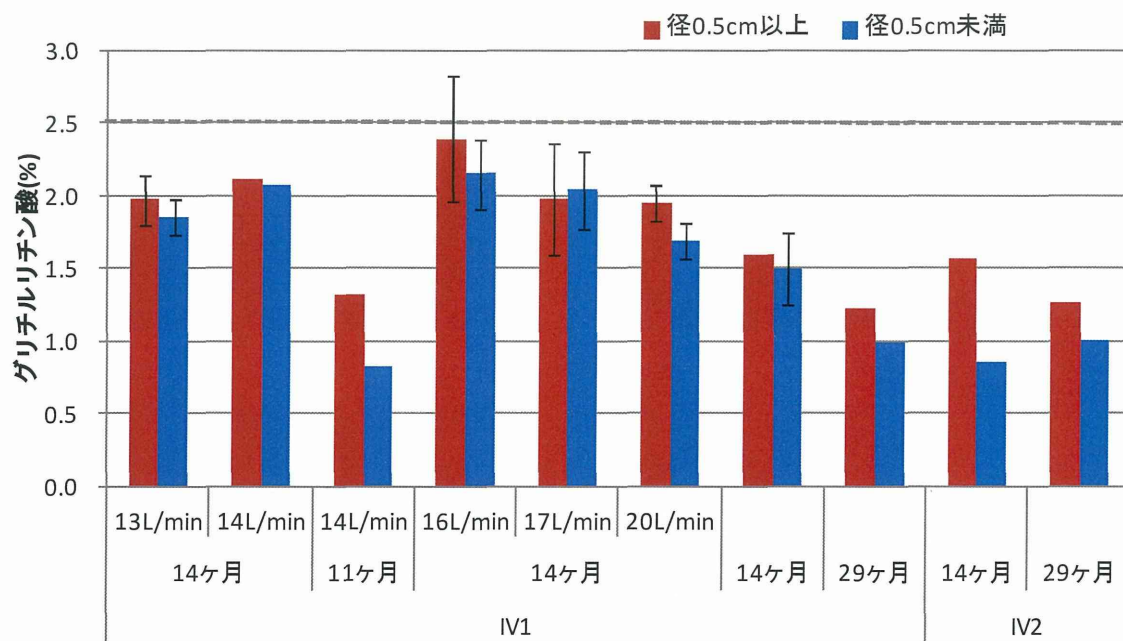


図 11. 水耕栽培甘草 グリチルリチン酸含量

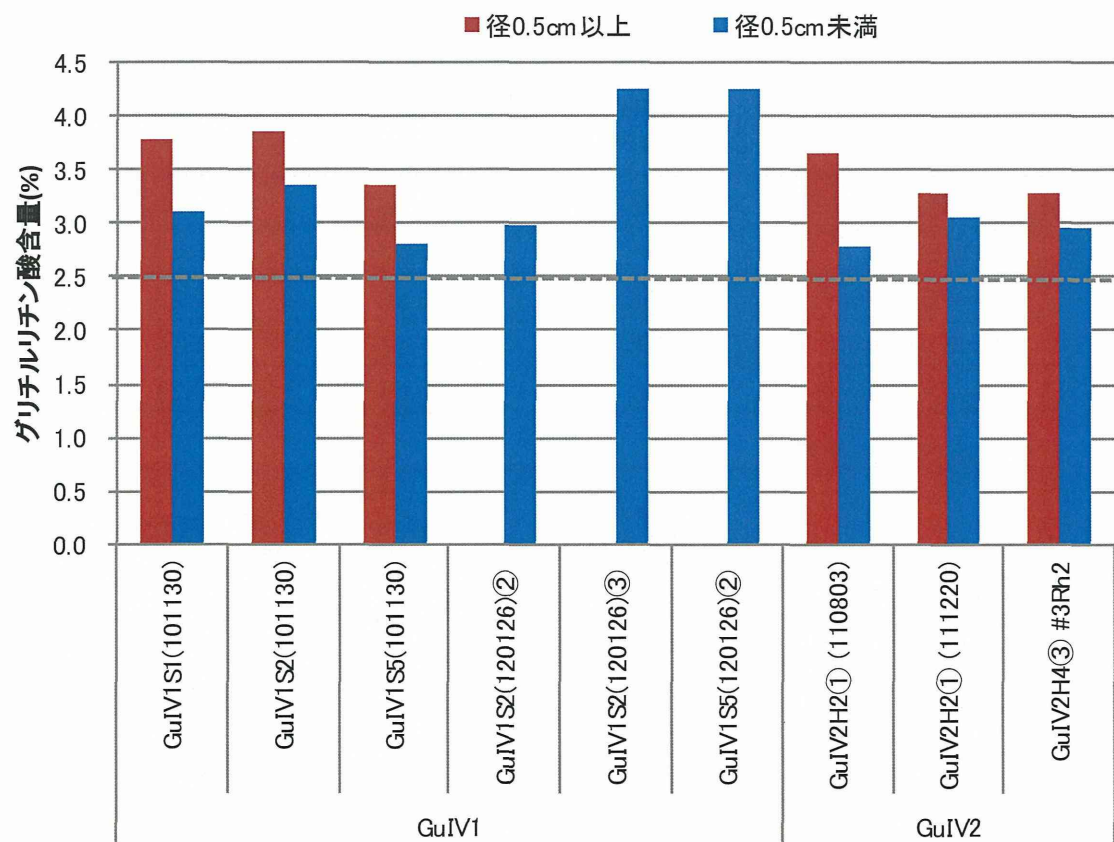


図 12. 支持体養液栽培甘草 グリチルリチン酸含量

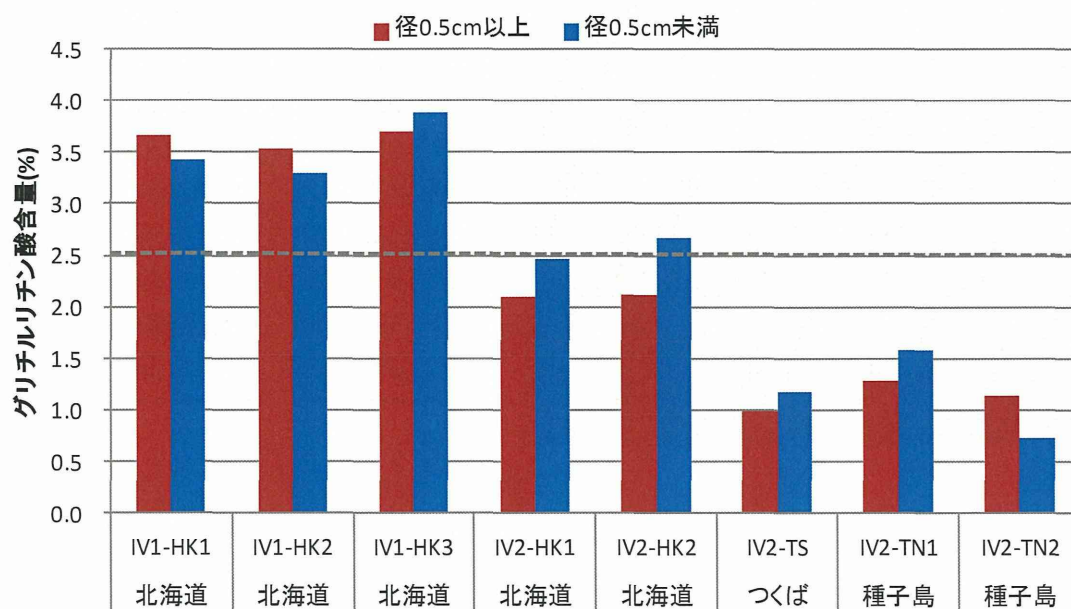


図 13. 圃場栽培甘草 グリチルリチン酸含量

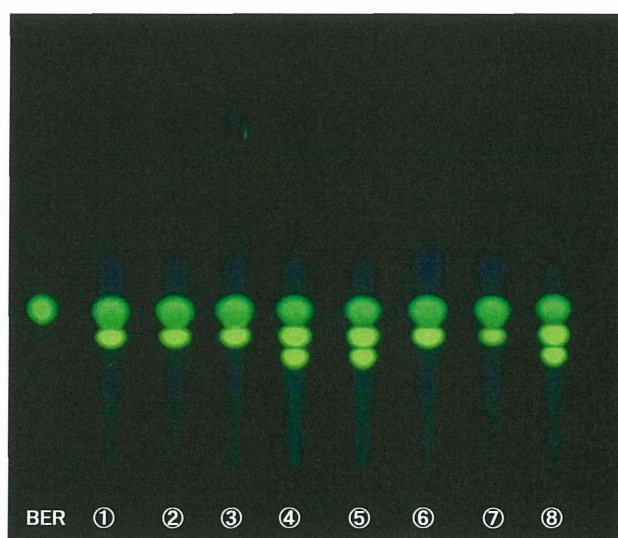
表 7. 黄連理化学試験

水耕栽培

	確認試験 (TLC,ベルベリン)	灰分	酸不溶性灰分
日局規格	スポットを確認	4.0%以下	1.0%以下
ours-1	確認	3.97	0.32
ours-3,-4mix		3.08	0.25
ours-8,-9mix		3.26	0.74
ours-14,-15mix		3.64	0.25

市場品(モデル試料)

	確認試験 (TLC,ベルベリン)	灰分	酸不溶性灰分
日局規格	スポットを確認	4.0%以下	1.0%以下
NIB-0042	確認	2.65	0.33
NIB-0150	確認	2.66	0.35
THS-88830	確認	2.12	0.10
NIB-0185	確認	1.32	0.08
THS-88835	確認	2.12	0.49



BER : ベルベリン 標準溶液

- ① ours-3 + ours-4 mix
- ② ours-8 + ours-9 mix
- ③ ours-14 + ours-15 mix
- ④ NIB-0042 (四川産)
- ⑤ NIB-0150 (重慶産)
- ⑥ THS-88830 (静岡産)
- ⑦ NIB-0185 (福井産)
- ⑧ THS-88835 (湖北産)

図 14. 黄連 確認試験 TLC

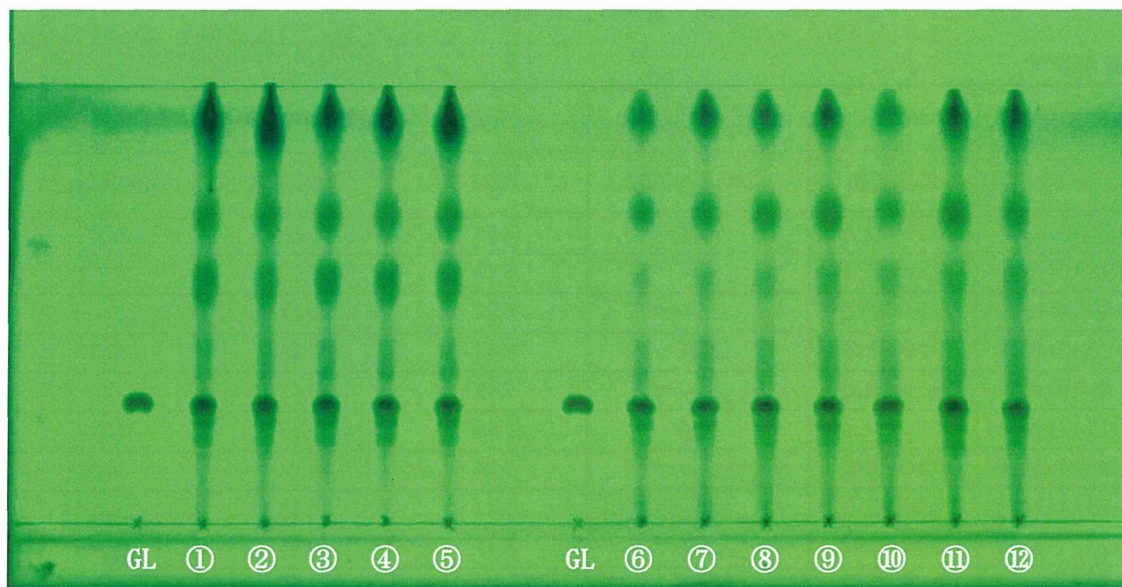
表 8. 甘草理化学試験

支持体養液栽培

		確認試験TLC (グリチルリチン酸)	灰分	酸不溶性灰分	エキス含量
	日局規格	スポットを確認	7.0%以下	2.0%以下	25.0%以上
GuIV1S1(101130)	0.5cm以上	確認	5.85	0.28	27.93
GuIV1S1(101130)	0.5cm未満		6.53	0.19	28.12
GuIV1S2(101130)	0.5cm以上		6.84	0.31	
GuIV1S2(101130)	0.5cm未満	確認	8.62	0.39	30.21
GuIV1S5(101130)	0.5cm以上		7.42	0.42	
GuIV2H2①(110803)	0.5cm以上	確認	6.98	0.33	27.11
GuIV2H2①(110803)	0.5cm未満		7.14	0.78	34.32
GuIV2H2①(111220)	0.5cm以上		7.71	0.38	
GuIV2H2①(111220)	0.5cm未満		7.42	0.25	
GuIV2H4③'#3Rh2	0.5cm以上	確認	6.88	0.30	34.19
GuIV2H4③'#3Rh2	0.5cm未満	確認	6.33	0.22	

圃場栽培

	日局規格	確認試験TLC (グリチルリチン酸)	灰分	酸不溶性灰分	エキス含量
		スポットを確認	7.0%以下	2.0%以下	25.0%以上
IV1-HK1	0.5cm以上	確認	4.46	0.24	32.62
IV1-HK1	0.5cm未満	確認	4.17	0.47	32.60
IV1-HK2	0.5cm以上	確認	4.64	0.42	27.21
IV1-HK2	0.5cm未満	確認	4.00	0.41	29.02
IV1-HK3	0.5cm以上	確認	4.25	0.25	29.70
IV1-HK3	0.5cm未満	確認	4.37	0.30	28.47
IV2-HK2	0.5cm未満	確認	5.15	0.64	25.95



GL : グリチルリチン酸 標準溶液
 ① GuIV1S1(101130) 0.5cm 以上
 ② GuIV1S2(101130) 0.5cm 未満
 ③ GuIV2H2①(110803) 0.5cm 以上
 ④ GuIV2H4③'#3Rh2 0.5cm 以上
 ⑤ GuIV2H4③'#3Rh2 0.5cm 未満

GL : グリチルリチン酸 標準溶液
 ⑥ IV1HK1 0.5cm 以上
 ⑦ IV1HK1 0.5cm 未満
 ⑧ IV1HK2 0.5cm 以上
 ⑨ IV1HK2 0.5cm 未満
 ⑩ IV1HK3 0.5cm 以上
 ⑪ IV1HK3 0.5cm 未満
 ⑫ IV2HK2 0.5cm 未満

図 15. 甘草確認試験 TLC

表 9. 黄連個別元素分析

水耕栽培		(濃度ppm)			
試料名	水耕液濃度	As	Cd	Hg	Pb
ours-1	1/2	<LOQ	0.03	<LOD	<LOQ
ours-3	1/4	<LOQ	0.04	<LOD	<LOQ
ours-4	1/4	<LOQ	0.03	<LOD	<LOQ
ours-8	1/6	<LOQ	0.02	<LOD	<LOQ
ours-9	1/6	<LOQ	0.03	<LOD	<LOQ
ours-14	1/8	<LOQ	0.02	<LOD	<LOD
ours-15	1/8	<LOQ	0.03	<LOD	<LOQ
モデル試料(市場品)					
NIB-0042	四川産	0.12	0.79	<LOD	1.44
NIB-0150	重慶産	0.12	0.77	<LOD	1.71
THS-88830	静岡産	<LOQ	0.10	<LOD	0.32
NIB-0185	福井産	<LOQ	0.34	<LOD	36.71
THS-88835	湖北産	<LOQ	0.60	<LOD	1.22

<LOD 検出限界未満 As:0.01 Cd:0.002 Hg:0.02 Pb:0.02

<LOQ 定量下限未満 As:0.05 Cd:0.007 Hg:0.05 Pb:0.05

表 10. 甘草個別元素分析

支持体養液栽培

(濃度ppm)

クローン名	試料名	径	As	Cd	Hg	Pb
GuIV1	GuIV1S1(101130)	0.5cm以上	0.38	<LOQ	<LOD	0.08
		0.5cm未満	1.23	0.02	<LOD	0.42
	GuIV1S2(101130)	0.5cm未満	1.06	0.03	<LOD	0.73
GuIV2	GuIV2H2①(110803)	0.5cm以上	0.07	0.01	<LOD	<LOQ
		0.5cm未満	0.41	0.02	<LOD	0.15
	GuIV2H2①(111220)	0.5cm未満	0.42	0.02	<LOD	0.12
	GuIV2H4③'#3Rh2	0.5cm以上	0.10	<LOQ	<LOD	<LOQ
		0.5cm未満	0.33	0.01	<LOD	0.08

圃場栽培

GuIV1	IV1-HK1	0.5cm以上	0.09	0.05	<LOD	0.13
	IV1-HK1	0.5cm未満	0.20	0.08	<LOD	0.22
	IV1-HK2	0.5cm以上	0.11	0.05	<LOD	0.15
	IV1-HK2	0.5cm未満	0.20	0.06	<LOD	0.21
	IV1-HK3	0.5cm以上	<LOQ	0.04	<LOD	0.09
	IV1-HK3	0.5cm未満	0.14	0.05	<LOD	0.17
GuIV2	IV2-HK1	0.5cm以上	0.10	0.05	<LOD	0.13
	IV2-HK1	0.5cm未満	0.23	0.06	<LOD	0.23
	IV2-HK2	0.5cm以上	0.13	0.03	<LOD	0.15
	IV2-HK2	0.5cm未満	0.30	0.06	<LOD	0.30
	IV2-TS	0.5cm以上	<LOQ	0.03	<LOD	0.13
	IV2-TS	0.5cm未満	0.44	0.06	<LOD	0.99
	IV2-TN1	0.5cm以上	0.07	0.01	<LOD	0.14
	IV2-TN1	0.5cm未満	0.17	0.03	<LOD	0.44
	IV2-TN2	0.5cm以上	0.07	0.02	<LOD	0.20
	IV2-TN2	0.5cm未満	0.21	0.03	<LOD	0.35

<LOD 検出限界未満 As:0.01 Cd:0.002 Hg:0.02 Pb:0.02

<LOQ 定量下限未満 As:0.05 Cd:0.007 Hg:0.05 Pb:0.05

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究（H24-創薬総合一般-007）
分担研究報告書

分担研究課題：人工水耕栽培システムにより生産した生薬・食品添加物の性能、均質
性及び安全性試験に関する研究

研究分担者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

要旨 カンゾウエキスには、様々な病態マウスモデルを用いた抗アレルギー作用が既に報告されている。異なる機序により発症する二つのアレルギーマウスモデルを構築し、検討した。T細胞依存的な炎症を誘導される接触性皮膚炎モデルを用いた評価系では、有効成分であるグリチルリチン酸含有量を同一にしたカンゾウエキスの経口投与により、市場流通品3品、水耕栽培品3品ともに抗アレルギー活性が示された。両活性に関しては有意な差はなかったことから市場流通品と水耕栽培品のカンゾウエキスは同等の効果があると示唆された。IgE依存的な三相の炎症反応を誘導するマウスのアレルギーモデルを用いた評価系では、惹起後72時間での炎症抑制が示された。

研究協力者

大月典子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 協力研究員

杉本直樹 同 第二室長

伊藤裕才 同 主任研究官

建部千絵 同 主任研究官

佐藤恭子 同 第一室長

能勢充彦 名城大学薬学部 教授

川原信夫 （独）医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター
センター長

渕野裕之 同 筑波研究部 栽培研究室長

吉松嘉代 同 筑波研究部
育種生理研究室長

栽培甘草を用いて検討することにより、生薬あるいは食品添加物としての素材の価値を維持した機能的クローンを同定する。それにより、品質の安定化と確実な国内供給に結びつくことを目的とする。昨年度、安全性評価として、甘草市場流通品と人工水耕栽培品における変異原性試験による評価と有害微量元素（ヒ素および重金属類）の定量を行った。今年度は有効性評価として、異なる要因から惹起されるアレルギー炎症の抑制作用に関して両甘草品を評価するための評価系を構築し、検討した。

B. 研究方法

①試料

市場流通品および水耕栽培品のウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* L) は（独）医薬基盤研究所より提供を受けた。

市場流通品 三品、NIB-003、NIB-074、NIB-176 および、水耕栽培品 三品、GuIV2H2-1、GuIV2H2-4、GuIV1-16L の計 6 品のカンゾウ

A. 研究目的

効率的かつ安定的な国内産甘草を供給するために、水耕栽培システムで生産した甘草の安全性と有効性についてのデータを蓄積する必要がある。従来生薬で報告されてきた安全性と薬理効果を複数のクローンの水耕

根由来熱水抽出エキスを試料として検討に用いた。各カンゾウ個体についての詳細は以下に示す。

水耕栽培品			
名称	GL*	備考	
GuIV2H2-1	3.65%	地上茎	≥5 mm
GuIV2H2-4	2.96%	ストロン	< 5 mm
GuIV1 16A	2.88%	地上茎	≥5 mm

市場流通品	
名称	GL*
NIB-003	3.10%
NIB-074	2.50%
NIB-176	7.10%

*GL…カンゾウ根に含まれるグリチルリチン酸含量(%)

調製法を要約すると、カンゾウ根粉砕物 20 g を 200 mL の超純水を抽出溶媒として加え、100℃ で 2 時間煮沸した。得られたエキスを凍結乾燥処理を 7 時間施し、非晶質の形態として試料に用いた。試料は-80℃ に保存した。

② 動物および細胞、抗体、抗原等

マウスは、6 週令、雌の BALB/c マウスを購入した。TNP (2, 4, 6-Trinitrophenol) 特異的 IgE 抗体はハイブリドーマ IGELb4 (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA) を BALB/c マウスの腹腔に播種し、腹水を回収し定量した。アレルギーを感作、惹起する際に用いた抗原は TNCB (2, 4, 6-trinitrochlorobenzene) (東京化成、東京) を用いた。

IgE 抗体の調製法

Cr1j:CD1-Foxn1^{nu} マウス (ICR nude; 週令 5 週、雌) はハイブリドーマ接種 7 日以前にあらかじめ腹腔に pristane (2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane, P7820, シグマアルドリッチ合同会社) を 0.5 mL 投与し、ハイブリドーマの生着と抗体産生が効率よく行われるよう処置を施した。

IGELb4 は 4 mM L-Glutamine、4500 mg/L Glucose、1 mM Sodium pyruvate、1500 mg/L NaHCO₃、20% Fetal bovine serum を含んだ Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) で継代した。細胞の増殖曲線が対数期 (Log phase) を保つ時期に細胞を回収し、PBS (-) で 2 度洗浄後、1 x10⁶ cells/0.2 mL/マウスの濃度で PBS(-) に再懸濁し、マウスの腹腔に投与した。

投与後、約 2 週間 (10~14 日) で貯留した腹水を 18G の針を腹部に刺し、体外に流出させた。流出させる際には、あらかじめヘパリンを適宜入れた 15 mL チューブを用意しておき、針から流れてくる腹水を受けた。

回収した腹水は 1000 x g、室温で遠心分離をし、細胞成分および凝固タンパク等を除いた。上清をろ紙でろ過し、プレフィルターを数段階経て、最終的に 0.45 μm のシリンジフィルター (SLHV033R, Merck Millipore, Billerica, MA) 通し不純物を除いた。さらに透析膜 (バイオテック CE メンブレン, 131417, 100 kD, Spectrum Laboratories, Inc., St. Rancho Dominguez, CA) に封入し、PBS (-) で透析した。透析後、0.22 μm の滅菌用シリンジフィルター (SLGVX13R, Merck Millipore) を通過させ、滅菌処理を施したのち、ELISA によって IgE 量を定量した。Mouse IgE ELISA MAX Deluxe (432404, BioLegend Company, San diego, CA) を用いて Sandwich ELISA を行い TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) で発色させた後に、マイクロプレートリーダー (Ultramark, Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA) で参照波長を 570 nm とし、450 nm の吸光度を測定した。

③ グリチルリチン酸モノアンモニウム塩の精製

グリチルリチン酸モノアンモニウム塩は丸善製薬株式会社 (尾道、広島) より純度 70% の粗結晶を購入した。グリチルリチン酸モノアンモニウム塩の粗結晶を少量の 70% 酢酸に過剰に溶解し、水浴で加熱した。完全に溶解させ、ろ紙 (JIS5 種 A、アドバンテッ

ク東洋株式会社、東京) でろ過した。ろ液を冷暗所に静置し、結晶を析出させた後、再度、70%酢酸に溶解し、再結晶化した。この過程を数回繰り返し、純度 95%のグリチルリチン酸モノアンモニウム塩を得た。

純度は HPLC で分析した。分析の条件は以下の通りである。

装置	Shimadzu LC-10AD Shimadzu SPD-10A
カラム	Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 mm I.D x 150 mm)
移動相	CH ₃ CN: 2.0% CH ₃ COOH/DDW= 40:60
溶媒	DDW
流速	1.0 mL/min
検出	254 nm
カラム温度	40°C

④ 試料の純度測定

精製グリチルリチン酸、市場流通品 (NIB-003)、水耕栽培品 (IV2H2-1) について HPLC による分析を行った。分析条件は以下のとおりである

装置	JASCO PU-2089 plus JASCO MD-2018 plus
分析・解析制御システム	ChromNAV
カラム	TSKgel ODS-100V (5 μ m, 4.6 mm I.D x 150 mm)
移動相	(A) 0.1%TFA : (B) CH ₃ CN (B) 10% 0-5min,
濃度勾配	10-90% 5-50 min, 90% 50-60 min
溶媒	DDW
流速	1.0 mL/min
検出	200-600 nm
カラム温度	room temperature

⑤ 接触性皮膚炎モデルマウスの病態誘導

BALB/c (7 週令、雌) の側腹部の体毛を感作開始二日前に眼科用はさみと電気シェーバーで剃毛した (day -2 とする)。感作開始日を day 0 とし、アセトンに溶解した 5%TNCB 溶液を 100 μ L 側腹部に塗布した (感作日を

day 0 とする)。Day 7 に 1% TNCB アセトン溶液を右耳介の表裏に 10 μ L ずつ塗布し (惹起日を day 7 とする)、day 8 (24 時間後)、day 9 (48 時間後) の耳介の腫脹を測定した。耳介の腫脹の測定にはダイヤル・シックネス・ゲージ (G-1A, 株式会社尾崎製作所) を用い、1 匹につき 3 回測定し、その平均値を実測値とした。

肥厚の変化は (1) の式により算出した。

$$\Delta \text{ Ear swelling } (\mu\text{m}) = [\text{各測定時の実測値 } (\mu\text{m})] - [\text{初回測定時 (day 0) の実測値 } (\mu\text{m})] \quad \text{----- (1)}$$

カンゾウエキス経口投与群は、グリチルリチン酸量に換算し 100 mg/kg を設定した。1 匹当たり最大 200 μ L 以内の投与量になるよう、グリチルリチン酸として 10 mg/mL に精製水 (大塚蒸留水, 大塚製薬, 東京) で調製し、day 0 より惹起 1 日前の day 6 まで計 7 回反復投与した。実験のスケジュールは図に示した [図 2-A]。

⑥ 三相型アレルギーモデルマウスの病態誘導

BALB/c (7 週令、雌) に抗 TNP-IgE 抗体 (100 μ g/mice) を尾静脈より注射し、疑似感作状態を獲得した (感作日を day -3 とする)。

感作 3 日後にオリーブオイル に溶解した 1%TNCB を右耳介の表裏に 10 μ L ずつ塗布し (惹起日を day 0 とする) 炎症を惹起した。

抗アレルギー活性評価のために、惹起後 4 時間までは 1 時間間隔で (1、2、3、4h)、その後 10 時間までは 2 時間間隔で (6、8、10h)、以降は 24 時間間隔で、24 時間後 (day 1)、48 時間後 (day 2)、72 時間後 (day 3)、と 168 時間後 (day 7) に至るまで耳介の腫脹を測定した。

カンゾウエキス経口投与群は、グリチルリチン酸量に換算し 100 mg/kg の量で、惹起 1 時間前に単回投与を行った。エキスの調整法は前項に記したとおりである。

⑦ 有効性評価におけるマウス群の設定

抗アレルギー評価を施行したマウスは 9 群に分けた。アレルギーを誘導しないネガティブコントロール (健常マウス) 1 群は 3 匹、アレルギー病態を誘導した他の 8 群は各 5 匹ずつ検討を行った。8 群の内訳はポジティブコントロール群 (精製水投与)、精製グリチルリチン酸投与群 (GL) 各 1 群に加えて、市場流通品エキスを投与する 3 群 (NIB-003、NIB-074、NIB-176)、水耕栽培品エキスを投与する 3 群 (GuIV2H2-1、GuIV2H2-4、GuIV1-16)、である。

⑧ 血中グリチルレチン酸の測定

BALB/c (7 週令、雌) を 27 匹ずつ、2 群に分け、グリチルリチン酸の量に換算して、40 mg/kg の精製グリチルリチン酸 (GL)、市場流通品カンゾウエキス (KZT) を経口投与した。

血中グリチルレチン酸の濃度は、投与 1、2、3、4、6、8、10、12、24 時間後に各 3 匹のマウスより採血した試料を HPLC により測定した。試料の前処理にはアセトニトリルを用いた除タンパクを行った。

詳細は、マウスより血液を回収後、30 分以上常温に静置した。静置により血餅の形成を確認した後、2500 x g、室温で 15 分遠心分離を行い、上層の血清を回収した。

内部標準として、2-methylanthraquinone を用いた。回収した血清 200 μ L に、2-methylanthraquinone を 10 ng 添加し、アセトニトリル (HPLC グレード) を 1800 μ L 加えた。ボルテックスミキサーで攪拌後、氷上で 45 分間静置した。その後、22,000 x g、4°C、10 分間遠心分離を行い、上清 1800 μ L を別チューブに回収し、遠心濃縮機で乾固した。乾固した残渣にメタノール (HPLC グレード) 100 μ L を加えて溶解し、30 μ L を分析に供した。この操作によるグリチルレチン酸の回収率は 96% である。

HPLC 分析条件を以下に示す。

装置	Shimadzu LC-10AD Shimadzu SPD-10A
カラム	COSMOSIL 5C18-AR (5 μ m, 4.6 mm I.D x 150 mm)
移動相	CH ₃ CN: 2.0% CH ₃ COOH/DDW = 40:60
流速	1.0 mL/min
検出	254 nm
カラム温度	40°C

これらの動物実験はヘルシンキ宣言に示された倫理的原則の遵守と、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に基づき、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験審査委員会および、名城大学学部等委員会・動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

① 市場流通品 NIB-003 と水耕栽培品 GuIV2H2-1 の純度比較

市場流通品と水耕栽培品のカンゾウエキスの有効性を比較するために、本試験で使用するカンゾウ熱水抽出エキスの純度を確認した [図 1]。

先に純度 95% に精製したグリチルリチン酸モノアンモニウム塩を HPLC で分析した。紫外部 254 nm の吸光度をフォトダイオードアレイ検出器 (PDA) で検出したところ、保持時間 26 分付近にグリチルリチン酸のピークを検出した。さらに、200-600 nm の波長で三次元に展開すると、他の波長領域での吸収を検出されなかったため、これを標品としてカンゾウエキスの分析を行った。

市場流通品 (NIB-003)、水耕栽培品 (GuIV2H2-1) とともに保持時間 26 分付近にグリチルリチン酸のピークが検出された。多波長で三次元に展開すると、紫外部から近紫外部にかけてそれぞれ複数の吸収が認められた。

このクロマトグラムとスペクトルデータの結果より、市場流通品 (NIB-003) と水耕栽培品 (GuIV2H2-1) の熱水抽出エキスは、グリ

チルリチン酸以外に、ほぼ同程度のカンゾウ由来成分を含有し、明らかな差は認められないものとして、以下の検討に使用した。

② T細胞依存的炎症・接触性皮膚炎モデルマウスへのカンゾウエキス経口投与による有効性評価

・市場流通品 NIB-003 と水耕栽培品 GuIV2H2-1 の検討

既に我々は予備的な検討で、T細胞依存的に炎症が誘導される接触性皮膚炎モデルマウスにおいて、70 mg/kg の精製グリチルリチン酸経口投与によるアレルギー反応の抑制効果を確認していた。その効果と比較するために、精製グリチルリチン酸と並行して、市場流通品エキス、水耕栽培品エキス、各1品を、初回の検討対象とした。

7週令 BALB/c 健常マウスの体重は 18.5 ± 0.7 g (平均 $\pm$ SD) であった。耳介の厚さは実測値で 200 μ m から 210 μ m の範囲内であった。我々の確立した接触性皮膚炎マウスモデルは、TNCB 感作後 7 日目に、同抗原を再投与する[図 2-A]。その後 24 時間を最大として、48 時間にかけて耳介の腫脹を認めた。

抗原感作の後、精製水のみ投与したポジティブコントロール群は、惹起後の耳介の腫脹が 24 時間後で 97.3 ± 3.8 μ m (耳介厚変化： Δ の平均 $\pm$ SEM)、48 時間後で 68.3 ± 4.4 μ m であった。これに対して精製グリチルリチン酸投与群は 24 時間後で 62.0 ± 5.3 μ m、48 時間後で 48.0 ± 3.6 μ m と、グリチルリチン酸投与により腫脹が抑制された。

一方、カンゾウエキス投与群では市場流通品 NIB-003 は 24 時間後で 75.0 ± 3.8 μ m、48 時間後で 52.0 ± 1.3 μ m、水耕栽培品 GuIV2H2-1 は、24 時間後で 70.7 ± 2.7 μ m、48 時間後で 43.0 ± 3.0 μ m であった[図 2-B1]。

ネガティブコントロール群である健常マウスは、実験開始後 9 日目に相当する 48 時間後の耳介の厚さの変化は 1.0 ± 2.4 μ m であった。また、ネガティブコントロール群以外のアレルギー誘導マウス群 4 群間(ポジティブコントロール、精製グリチルリチン酸、NIB-003、GuIV2H2-1 投与群)で、投与物質

の違いによる有意な体重の変化は認められなかった[図 2-B2]。

この結果により、精製グリチルリチン酸投与群同様、市場流通品 NIB-003、水耕栽培品 GuIV2H2-1 とともに、カンゾウエキス経口投与により、耳介の腫脹の抑制が示された。

・市場流通品 NIB-074、NIB-176 と水耕栽培品 GuIV2H2-4、GuIV1-16L の検討

先の検討で 2 品のカンゾウエキスによる耳介腫脹の抑制が認められたため、他の市場流通品、水耕栽培品、各 2 品のカンゾウエキスについて、同様の検討を行った。実験開始時のすべてのマウスの体重は 18.5 ± 0.8 g (平均 $\pm$ SD) で、前回とほぼ同様であった。

ポジティブコントロール群は、24 時間後で 156.0 ± 14.8 μ m、48 時間後で 84.7 ± 6.7 μ m であった。これに対して精製グリチルリチン酸投与群は 24 時間後で 104.0 ± 6.8 μ m、48 時間後で 58.3 ± 6.2 μ m と、グリチルリチン酸投与により腫脹が抑制された。

一方、市場流通品エキスでは NIB-074 投与群は 24 時間後で 95.3 ± 6.7 μ m、48 時間後で 56.3 ± 4.9 μ m であった。NIB-176 投与群は 24 時間後で 64.3 ± 9.6 μ m、48 時間後で 52.3 ± 4.1 μ m であった。

水耕栽培品エキスでは GuIV2H2-4 投与群は 24 時間後で 69.0 ± 14.0 μ m、48 時間後で 47.0 ± 6.4 μ m、GuIV1-16L 投与群は 24 時間後で 87.0 ± 3.7 μ m、48 時間後で 46.0 ± 2.5 μ m であった[図 2-C]。

健常マウス群は、実験開始後 9 日目の耳介の厚さの変化は 0.6 ± 0.6 μ m であり、アレルギー誘導マウス群 6 群間で、投与物質の違いによる有意な体重の変化は認められなかった[data not shown]。

以上の結果により、本検討で用いた市場流通品 3 品と水耕栽培品 3 品はグリチルリチン酸 100 mg/kg 相当の熱水抽出エキスを経口投与することにより、T細胞依存性の炎症が誘導される接触性皮膚炎モデルマウスのアレルギー反応を抑制することが示された。また、市場流通品、水耕栽培品各 3 品間のグリチルリチン酸 100 mg/kg 相当熱水抽出エキスによ

るアレルギー抑制効果は有意な差は認められなかった。

③ IgE 依存的炎症・三相型アレルギーモデルマウスへのカンゾウエキス経口投与による有効性評価

・三相型アレルギーマウスモデルの構築

IgE 依存的な三相の炎症反応を誘導するマウスのアレルギーモデルで、カンゾウエキス経口投与による炎症反応抑制が過去に報告されている。我々は過去の報告をもとに実験系の構築を行い、評価方法を検討した。

三相の炎症反応については、別図に示す[図 3-A および B]¹⁾。我々の構築した実験系では[図 3-B]、第一相は惹起後 1-2 時間で即時性の激しい耳介の腫脹を生じ、第二相は準即時相として 10 時間前後に穏やかな腫脹を生じる。さらに第三相として 48-72 時間後に遅発性のやや激しい腫脹が観察される。しかしながら、第二相の穏やかな腫脹を評価の対象とするためにはさらなる条件設定が必要であったため、今回、評価から除外した。1-2 時間後の第一相と 48-72 時間後の第三相に観察される耳介の腫脹について、カンゾウエキス経口投与の効果を評価することとした。

・市場流通品 NIB-003 と水耕栽培品 GuIV2H2-1 の検討

アレルギー抑制効果について検討するために、構築した実験系を用いて、精製グリチルリチン酸、市場流通品 NIB-003、水耕栽培品 GuIV2H2-1 のカンゾウエキスをを用いて、初回の評価を行った。

惹起一時間前に精製水のみ経口投与したポジティブコントロール群は、第一相の反応である惹起 1 時間後に $60.0 \pm 11.4 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $60.0 \pm 10.8 \mu\text{m}$ 、第三相の反応である惹起 48 時間後に $20.0 \pm 2.8 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $20.0 \pm 1.6 \mu\text{m}$ の耳介の腫脹を示した。

一方、精製グリチルリチン酸を投与した群は、1 時間後に $44.3 \pm 10.5 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $55.3 \pm 7.5 \mu\text{m}$ 、48 時間後に $4.18 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $-0.33 \pm 2.9 \mu\text{m}$ であった。

また、カンゾウエキス投与群では、市場流

通品 NIB-003 は、1 時間後に $39.0 \pm 10.2 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $40.0 \pm 11.3 \mu\text{m}$ 、48 時間後に $8.0 \pm 3.3 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $5.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$ であった。

水耕栽培品 GuIV2H2-1 は、1 時間後に $49.7 \pm 10.5 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $61.0 \pm 9.7 \mu\text{m}$ 、48 時間後に $9.0 \pm 3.7 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $8.0 \pm 2.3 \mu\text{m}$ であった。[図 3-C1]

アレルギーを誘導したマウス群 4 群間で、腫脹のパターンは一致していた。また、疑似感作時から第三相の測定を行う 8 日間をわたり、ネガティブコントロールを含めた 5 群間での体重の変化には有意な差はなかった[図 3-C2]。

これらの結果より、惹起前 1 時間の単回投与では、第一相の惹起後 1-2 時間では精製グリチルリチン酸投与も含めカンゾウエキス投与による腫脹の抑制が認められなかった。さらに第三相の 48 時間後では、精製グリチルリチン酸投与群のみ有意な腫脹の抑制を認め、72 時間後に、精製グリチルリチン酸、市場流通品 NIB-003、水耕栽培品 GuIV2H2-1 ともに有意な腫脹の抑制が示されたが、膨張程度が比較的微小のため、今後再検討の必要があると思われた。

④ 血中グリチルレチン酸濃度の測定

精製グリチルリチン酸、あるいはカンゾウエキスの経口投与後の薬物動態を解析するために、グリチルリチン酸のアグリコンであるグリチルレチン酸の血中濃度を測定した[図 4]。グリチルリチン酸 40 mg/kg に相当する量の精製グリチルリチン酸あるいはカンゾウエキスを経口投与後、精製グリチルリチン酸では 3 時間後に約 50 ng/mL 、カンゾウエキスでは 2 時間後に約 25 ng/mL の血中グリチルレチン酸が検出された。

その後、血中濃度は上昇し、精製グリチルリチン酸で 14 時間後、カンゾウエキスでは 12 時間後を最大としてそれぞれ約 150 ng/mL の濃度を示した。

12 時間以降は 24 時間後まで未測定だが、24 時間後ではそれぞれ約 50 ng/mL の濃度を示した。

この結果から、グリチルリチン酸、あるいはカンゾウ熱水抽出エキスをマウスへ経口投与すると、2-3 時間後に血中でグリチルレチン酸として検出されるレベルまで代謝され、さらに血液中からのクリアランスには 24 時間以上の時間がかかる可能性が示された。

D. 考察

今年度、カンゾウ熱水抽出エキスの抗アレルギー活性の評価法として、機序の異なる二つのアレルギーモデルを構築し評価した。一つは T 細胞依存性アレルギー（IV 型アレルギー・遅延型アレルギー）の接触性皮膚炎モデルであり、もう一つは IgE 依存性アレルギー（I 型アレルギー・即時型アレルギー）の三相型のアレルギーモデルである。評価法はともに耳介の腫脹を測定する方法であり、測定技術の安定により信頼性の高いデータを得ることができた。

接触性皮膚炎モデルでは、100 mg/kg 相当のグリチルリチン酸を含むカンゾウエキスを、感作当日から惹起前日まで 7 日間反復投与することによる抗アレルギー効果が示された。今回の検討では市場流通品 3 品、水耕栽培品 3 品ともにほぼ同等の抑制効果が示されている。現在までに接触性皮膚炎におけるグリチルリチン酸、あるいはウラルカンゾウエキスの経口投与について評価している報告はなく、今回の結果は初めて示した結果である。

一方、三相型アレルギーモデルでは、抗 IgE 抗体による疑似感作後、TNCB でアレルギー反応を惹起させる一時間前に 100 mg/kg 相当のグリチルリチン酸を含むカンゾウエキスを単回投与することにより惹起後 72 時間経過した第三相の耳介の腫脹のみ抑制した。過去、Yamamoto らは²⁾、45 mg/kg 相当のグリチルリチン酸を含むウラルカンゾウエキスの経口投与で、即時相、準即時相、遅発相の三相ともに炎症が抑制されたことを報告している。まず、この結果の違いを、最も激しい腫脹を示す第一相の抑制について考察した。彼らのカンゾウエキスの初回投与が惹

起二時間前であったのに対し、我々の方法では惹起一時間前に投与したことが原因ではないかと考えられた。

そこで我々は、グリチルリチン酸の薬物動態について理解するために血中グリチルレチン酸濃度を測定した。代謝物が血中に運搬されるのは少なくとも経口投与後 2-3 時間は必要であることが示された。さらに、ほぼ 12 時間後までは血中濃度が上昇し続けたことから、惹起前の経口投与を 2-8 時間前に設定すると、第一相の炎症抑制が顕在化する可能性が考えられた。

次に第三相の抑制についても検討した。Yamamoto²⁾らのモデルでは第三相の炎症が惹起後 7 日以降に誘導されているため、惹起翌日から 6 日後にかけて反復投与を行っている。ところが今回の実験系では第三相が惹起後 2-3 日に誘導されているため、マウスへの負担を考え、惹起後の投与を行わなかった。これも、抑制が認められなかった一因と考えられる。

しかしながら単回投与にも拘わらず、惹起後 72 時間での炎症抑制が示されていることから、グリチルリチン酸、あるいはカンゾウエキスの薬効は投与から 72 時間持続している可能性が考えられた。あるいは、第一相から第三相に至る炎症は一つのカスケードとして誘導され、異なる細胞群がエフェクターであることが報告されている¹⁾ことから、第一相の炎症を効果的に抑制することによって、それに続く第三相の炎症抑制にも影響する可能性が考えられた。

今後の改善点をあげると、1) 惹起前のエキス投与を 2-8 時間前にする、2) 必要であれば惹起後翌日にエキス投与を行う、の 2 点があげられた。さらに耳介の腫脹を測定する評価系では、データの信頼性を高める上で、ある程度の腫脹を誘導した病態から抑制効果を示すことが重要である。そのため、現在、疑似感作に用いる抗体濃度の検討を行っており、今後、最適な評価法を樹立しなおし検討を行う予定である。

今回我々が検討した二つの病態マウスモデルは、いずれもよく行われる実験系である。

T細胞依存型（遅延型）とIgE依存型（即時型）という二つの機序の違いを示したが、いずれも初回の感作には、抗原提示細胞のアレルゲン提示によるT細胞の活性化、そしてT細胞依存的なB細胞の活性化が必要だと考えられている。T細胞依存的なアレルギーの発症は、アレルゲンを記憶したメモリーB細胞が再度アレルゲンに出会った時に反応し、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞を活性化し、炎症が誘導される。この反応は再度の抗原認識から数日間の時間が必要であるため、遅延型アレルギー反応と呼ばれる³⁾。それに対してIgE依存的なアレルギーの発症は、メモリーB細胞がIgE抗体を産生する形質細胞に分化して、過剰な抗原特異的なIgE抗体が既に産生されている状態である。抗原特異的IgE抗体は、一部、組織中の肥満細胞上のレセプターに結合し、再度アレルゲンに出会ったときにアレルゲンを認識して肥満細胞にシグナルを送り、炎症性化学物質を放出させる。これが、即時に発症する第一相、第二相のアレルギー炎症である。そして、肥満細胞同様、IgE受容体を発現している血中の好塩基球が遅発相である第三相の炎症を引き起こすと考えられている¹⁾。

ヒトの場合、遅延型アレルギーである接触性皮膚炎は、医薬品、化学物質、天然物、金属などの低分子物との接触により感作が成立することが多い⁴⁾。また即時型アレルギーには花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどがあげられる^{5,6,7)}。しかしヒトは、常に複数の抗原にさらされており、連続した感作を受けている。また他の炎症と合併することも珍しくなく、マウスのように明確ではない。そのような理由から、有効性評価のためにいくつかのタイプのアレルギーモデルを検討する必要があると考えられた。

本研究で我々は、T細胞依存的に炎症誘導されるアレルギー性接触性皮膚炎モデルマウスに対して、市場流通品カンゾウ、水耕栽培品カンゾウ、各3品の熱水抽出エキスが抗アレルギー効果を有することを示した。また、IgE依存的に炎症誘導される三相型アレルギーモデルマウスについては、好塩基球がエフ

エクターとなっていると思われる遅発相の炎症が一部抑制される傾向にあったが、未だ明らかではない。今後、実験系の改善を含め、さらなる検討を行うとともに、カンゾウエキ스로病態の改善が報告されている、細菌性肝炎⁸⁾、アレルギー性喘息モデル⁹⁾など、他のアレルギー性疾患についても検討を試みようと考えている。

E. 結論

我々は、カンゾウ水耕栽培品熱水抽出エキスの抗アレルギー活性の評価を行った。T細胞依存的アレルギーである接触性皮膚炎マウスモデルにカンゾウエキスを経口投与したところ、グリチルリチン酸単独、あるいは市場流通品カンゾウエキスと同等の抗アレルギー活性を示した。接触性皮膚炎におけるカンゾウエキスの効果についての初めての報告である。一方、IgE依存性の三相型アレルギーモデルについて、第一相と第三相に誘導される炎症について抑制効果を検討したが、部分的な抑制効果しか得られなかった。エキス投与時間と、誘導する炎症の程度について改善の余地があるため、今後も検討を続ける。

参考文献

1. Mukai K, et al. 2005, Basophils Play a Critical Role in the Development of IgE-Mediated Chronic Allergic Inflammation Independently of T Cells and Mast Cells. *Immunity*, 23: 191-202
2. Yamamoto Y, et al., 2003, Pharmaceutical Evaluation of *Glycyrrhiza uralensis* Roots Cultivated in Eastern Nei-Meng-Gu of China *Biol. Pharm. Bull.* 26(8): 1144-1149
3. Christensen AD and Haase C, 2012, Immunological mechanism of contact hypersensitivity *APMIS*. 120(1): 1-27
4. 日本皮膚科学会接触皮膚炎診療ガイドライン委員会 2009 接触皮膚炎ガイドライン日皮会誌 119(9) 1757-1793

5. 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン委員会 2009 アトピー性皮膚炎ガイドライン 日皮会誌 119(8) 1515-1534
 6. 「食物アレルギーの診療の手引き 2011」検討委員会 2011 食物アレルギーの診療の手引き 2011
 7. 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会 2009 アレルギー性鼻炎ガイド
 8. Xiao Y, et al, 2010, 18Beta-glycyrrhetic acid ameliorates acute Propionibacterium acnes-induced liver injury through inhibition of macrophage inflammatory protein-1 α . *J Biol Chem*, 285 (2) 1128-1137
 9. Ma C, et al 2013, Immunoregulatory effects of glycyrrhizic acid exerts anti-asthmatic effects via modulation of Th1/Th2 cytokines and enhancement of CD4(+)CD25(+)Foxp3+ regulatory T cells in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol*. 148 (3): 755-762
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) 杉本直樹、穂山浩：コチニール色素とアレルギー、公衆衛生 77、833-837 (2013)
 - 2) Minegishi, Y., Mano, J., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R.: Development and evaluation of a novel DNA extraction method suitable for processed foods, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 20, 96-104 (2013).
 - 3) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Teshima, R., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K.: Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya, *J. AOAC Int.*, 96, 1054-1058 (2013)
 - 4) Ohmori, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Hamaoka, S., Makiyama, H., Sakata, K., Kasahara, M., Kitta, K., Fujimaki, T., Teshima, R.: A DNA Extraction and Purification Method using an Ion-exchange Resin -type Kit for the Detection of Genetically Modified Papaya from Processed foods, *Food Control*, 32, 728-735 (2013).
 - 5) Takabatake, R., Takashima, K., Kurashima, T., Mano, J., Furui, S., Kitta, K., Koiwa, T., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Minegishi, Y.: Interlaboratory Study of Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Maize Events MON810, Bt11 and GA21, and CaMV P35S, *J. AOAC Int.*, 96, 1-7 (2013)
 - 6) Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Kurashima, T., Mano, J., Furui, S., Kitta, K.: Development and Interlaboratory Validation of Quantitative PCR Method for Screening Analysis of Genetically Modified Soybeans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36, 131-134 (2013)
 - 7) Koizumi, D., Shiota, K., Akita, R., Oda, H., Akiyama, H.: Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods, *Food Chem.*, 150, 348-352 (2014).
 2. 学会発表
 - 1) 大月典子、穂山 浩、工藤 善、杉山圭一、阿部 裕、六鹿元雄、伊藤裕才、多田敦子、杉本直樹、瀧野裕之、川原信夫、吉松嘉代：人工水耕栽培により生産した甘草の安全性評価に関する研究、第 6 回甘草に関するシンポジウム (2013. 8)
 - 2) 小俣洋奈、久木田卓弥、片山 茂、大月典子、穂山 浩、中村宗一郎：THP-1 由来樹状細胞のハプテン抗原を標的としたアレルギー性評価法の確立」、第 26 回日本動