

- 14) 江島昭他：生物学的同等性の試験方法についての解説 —統計解析 その 3—, *IYAKUHIN KENKYU*, 15, 123 - 133 (1984).
- 15) 統計数値表編集委員会編：簡約統計数値表, 日本規格協会, 東京 (1977).
- 16) Liu, X., Li, H., Song, X., Qin, K., Guo, H., Wu, L., Cai, H., Cai, B. : Comparative pharmacokinetics studies of benzoylhypaconine, benzoylmesaconine, benzoylaconine and hypaconitine in rats by LC-MS method after administration of radix aconiti lateralis praeparata extract and dahuang fuji decoction., *Biomed. Chromatogr.*, 28. 966 - 973 (2014).
- 17) Liu, J., Li, Q., Yin, Y., Liu, R., Xu, H., Bi, K. : Ultra-fast LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of six highly toxic *Aconitum* alkaloids from *Aconiti kusnezoffii* radix in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study., *J. Sep. Sci.* 37. 171 - 178 (2014).
- 18) 村田正弘：副作用と剤形, *Pharmaceuticals Monthly*, 29 (2), 319 - 324 (1987).
- F. 健康危機情報
なし.
- G. 研究発表
1. 論文発表
Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H., Goda, Y. : Studies on bioequivalence of kakkonto decoction and its extract preparation (I)., *Shoyakugaku Zasshi*, 68, 9 - 14 (2014).
2. 学会発表等
1) 堀井周文, 小此木明, 高橋隆二, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 合田幸広：小青竜湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 (第3報), 第31回和漢医薬学会学術大会 (千葉), 2014. 8.
2) 堀井周文, 小此木明, 高橋隆二, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 合田幸広：八味地黄丸エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 (第1報), 日本薬学会第135年会 (神戸), 2015. 3.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

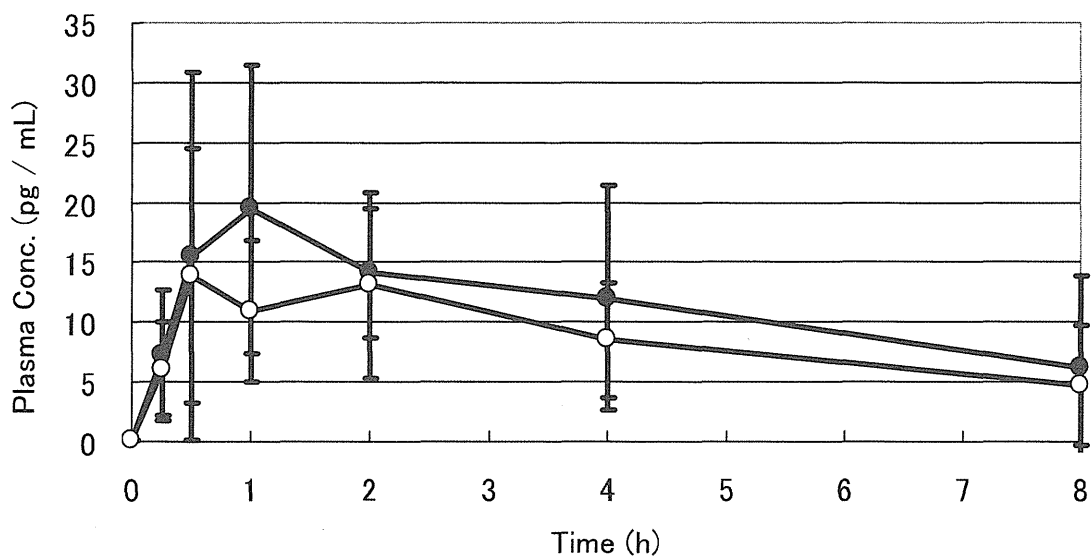


図. 1 ベンゾイルメサコニンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6)
 (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

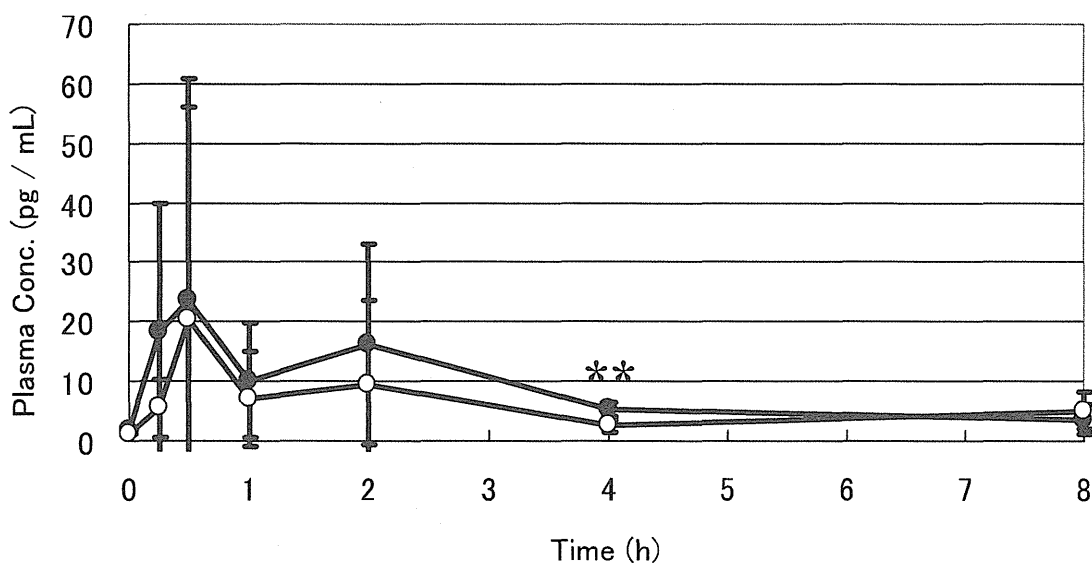


図. 2 ベンゾイルヒパコニンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6)
 (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

**p < 0.01

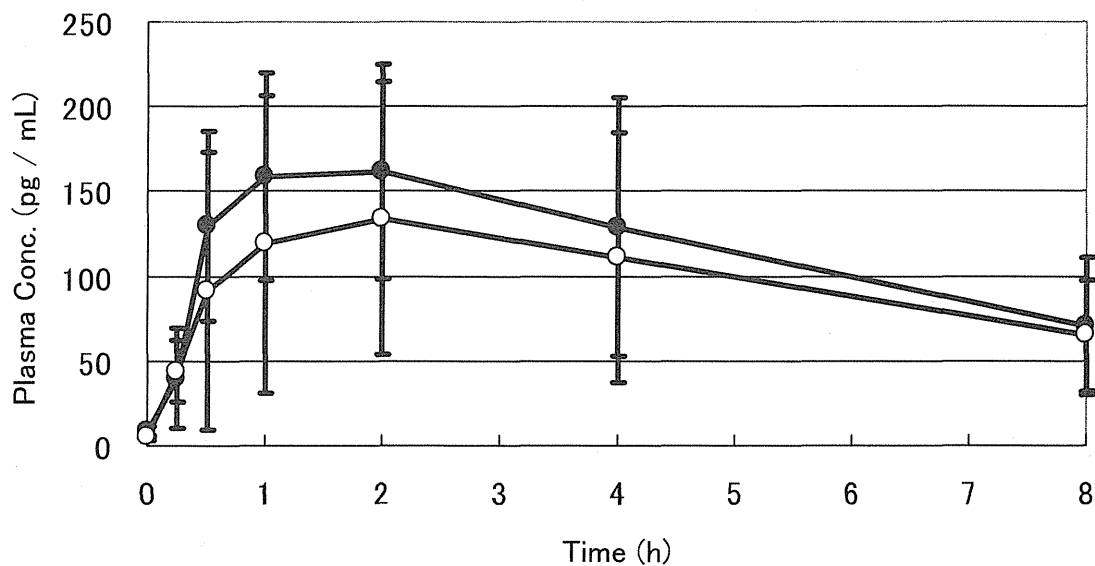


図. 3.14 アニソイルアコニンの血漿中濃度推移 (mean \pm SD, n = 6)
 (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

表 1 湯剤, エキス製剤投与時の各成分の T_{max} , C_{max} , AUC 及び MRT
 (Values are means \pm SD (n = 6))

		T_{max} (h)	C_{max} (pg/mL)		AUC (pg/mL · h)		MRT (h)	
				CV 値 (%)		CV 値 (%)		
ベンゾイル	製剤	1.25	23 \pm 12	52	92 \pm 53	58	1.63 \pm 0.26	
メサコニン	湯剤	1.92	17 \pm 9	53	70 \pm 34	49	1.63 \pm 0.21	
ベンゾイル	製剤	1.29	28 \pm 37	132	69 \pm 51	74	1.62 \pm 0.24	
ヒパコニン	湯剤	2.17	22 \pm 35	159	47 \pm 40	85	2.11 \pm 0.45	
14-アニソイル	製剤	1.75	173 \pm 62	36	948 \pm 435	46	1.71 \pm 0.15	
アコニン	湯剤	1.92	165 \pm 81	49	799 \pm 437	55	1.80 \pm 0.21	

表 2 ベンゾイルメサコニンの分散分析表

	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値	
AUC	薬剤	1480	1	1480	3.703	7.71
	時期	968	1	968	2.423	7.71
	被験者	17160	5	3432	8.588	6.26
合計	21206	11	1928			
残差	1598	4	400			

	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値	
C _{max}	薬剤	108	1	108	3.125	7.71
	時期	66	1	66	1.900	7.71
	被験者	944	5	189	5.448	6.26
合計	1257	11	114			
残差	139	4	35			

表 3 ベンゾイルヒパコニンの分散分析表

	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値	
AUC	薬剤	1497	1	1497	0.440	7.71
	時期	625	1	625	0.184	7.71
	被験者	6905	5	1381	0.406	6.26
合計	22644	11	2059			
残差	13616	4	3404			

	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値	
C _{max}	薬剤	113	1	113	0.063	7.71
	時期	165	1	165	0.092	7.71
	被験者	5722	5	1144	0.637	6.26
合計	13190	11	1199			
残差	7191	4	1798			

表 4 14-アニソイルアコニンの分散分析表

	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値
薬剤	66838	1	66838	0.861	7.71
AUC 時期	3010	1	3010	0.039	7.71
被験者	1588636	5	317727	4.093	6.26
合計	1969016	11	179001		
残差	310532	4	77633		

	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値
薬剤	198	1	198	0.068	7.71
C _{max} 時期	669	1	669	0.230	7.71
被験者	40000	5	8000	2.745	6.26
合計	52526	11	4775		
残差	11659	4	2915		

分担研究課題 生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性等に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長

研究協力者 政田さやか 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

LC/MS 分析データを利用した生薬の品質評価に関する研究

生薬の品質管理・評価におけるメタボロミクス解析の有用性を検討するため、商品規格の多様性に富むシャクヤク及びセキシヤクを対象として、LC/MS 分析と多変量解析を行った。その結果、シャクヤクとセキシヤクの成分比較では、スクロース及びペオニフロリンが両者の判別に有効な成分として見出された。さらに、シャクヤクの成分比較では、産地や性状に関連する特異的な成分は見出されず、国内市場品の同等性が確認された。すなわち、LC/MS データを用いたメタボロミクス解析は、生薬の規格判別のみならず、同等性評価においても有用であることが示唆された。

研究協力者

山本 豊 株式会社栃本天海堂

神谷 洋 株式会社ウチダ和漢薬

川崎武志 株式会社ウチダ和漢薬

林 茂樹 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

柴田敏郎 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

A. 研究目的

総人口に占める高齢者の割合が急速に増加し、国民の健康ニーズも多様化する中、代替医療やセルフメディケーションの担い手として漢方医学が注目を集めている。漢方医学で 사용되는漢方薬は動植物を原料とする生薬から構成されるが、これらは天然由来であるため、基原種や産地、栽培条件、加工・調製法などの違いにより品質に差が生じやすく、品質保証のためには化学薬品とは異なった視点からのアプローチが求められる。特に、近年、生薬資源の中国依存脱却のため進められている薬用植物の国内栽培により、近い将来、従来流通品と

は異なる条件下で栽培された新規栽培品について、同等性や代替性を含めた品質評価が必要となると予想される。他方では、高性能な機器分析により得られた膨大なデータの網羅的解析を行うメタボロミクス研究が急速な発展を遂げており、薬用植物や生薬を含め、幅広い分野に活用され始めている¹⁻³⁾。このような背景の下、本研究では、国内栽培品を含む生薬試料の品質管理・評価法の確立を目指し、商品規格の多様性に富み、かつ、国内栽培の先行品目であるシャクヤクを対象として LC/MS データを利用したメタボローム解析を行い、その有用性を検討した。

シャクヤク (以下、芍薬) はボタン科シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas) の根を基原とし、補血薬として婦人科系疾患を目標とした漢方処方に多く用いられる汎用生薬の一つである。カンゾウに次いで使用量の多い生薬であり、年間使用量は 1,000 トンを超え、そのうち 40 トン程度が国内生産されている。セキシヤク (以下、赤芍) は日本薬局方および局外生規における規定はなく、一般的に、ボタン科シャクヤク (*P.*

lactiflora)、*P. obovate* Maxim.、または *P. veitchii* Lynch の根を皮付きのまま乾燥させたものとされる。

B. 研究方法

材料

本研究に用いた芍薬 32 ロット及び赤芍 16 ロットは、国内の生薬メーカー及び医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部より譲り受けた。試料の詳細を Table1 に示す。

LC/MS 測定

原形生薬を分割し、異なる 2 箇所を粉末化して試料を調製した。試料 5 mg を抽出溶媒 9 mL に溶解し 30 分間超音波処理した後、メスアップして 0.5 mg/mL に調製した。抽出溶媒は、0.1% ギ酸を含む 75% MeOH 溶液に、基準物質として 0.1 mg/mL の ethyl *p*-hydroxybenzoate を添加したものをを用いた。遠心分離後の上清をフィルターろ過して LC/MS 分析に供した。測定条件は以下の通りである。

LC 部: Acquity UPLC I-Class FL (Waters)

- カラム Acquity UPLC HSS C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 μm (40°C)
- 移動相 A = 0.1 % ギ酸水溶液、
B = 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液
- グラジエント
B = 10 – 20% (0 – 4 min) – 70% (7.5 min) – 98% (8.5 – 9.5 min)
- 流速 0.4 mL/min
- 注入量 2 μL

MS 部: Synapt G2-Si (Waters)

- MSモード ESI negative, Resolution mode
- キャピラリー電圧 2.5 kV
- コーン電圧 40V
- ソース温度 120°C
- 脱溶媒ガス 800 L/hr (350°C)
- コーンガス 50 L/hr
- スキャン *m/z* 範囲 100~1,200

- スキャン時間 0.2 sec

得られた主要なピークのLCクロマトグラムの保持時間とMSスペクトルのフラグメントパターンを文献情報と比較することによって、芍薬の主要成分である sucrose, gallic acid, oxypaeoniflorin, catechin, methylgallate, albiflorin, paeoniflorin, pentagalloylglucose, galloylpaeoniflorin と推定されるピークを特定した (Table 2)。

ピーク抽出

MarkerLynx XS (Waters) を用いてピーク抽出を行った。ピーク抽出条件は以下の通り。

- 実験タイプ Peak Detection
- 抽出時間範囲 0 – 9.5 min
- 抽出 *m/z* 範囲 100~1,200
- ピーク強度閾値 10000
- 時間幅 0.2 min
- フレーム *m/z* 幅 10 ppm (± 5 ppm)
- フレーム最大数 5,000

多変量解析

SIMCA-P⁺ 12 (Umetrics) を用いて主成分分析 (PCA) および判別分析 (OPLS-DA) を行った。データの標準化には、平均化後に標準偏差の平方根で除するパレートスケール (Par) を適用した。

C. 結果・考察

国内市場に流通する芍薬の規格は、産地 (日本・中国) や加工調整 (皮付き・皮去り・湯通し)、乾燥 (日干し・陰干し) 等の違いにより多岐に亘る。従来、栽培種のシャクヤクを皮去り後に湯通し、あるいは生干ししたものが芍薬 (白芍)、野生種のシャクヤクを皮付きのまま生干ししたものが赤芍とされてきたが、近年は指標成分であるペオニフロリンの含量が重視され、ペオニフロリン含量の高い皮付きの芍薬の流通が増えつつある。本研究では、様々な規格の芍薬及び赤芍を対象として、LC/MS 分析デー

タの多変量解析を行い、その差異や同等性についての品質評価を行った。

ダイナミックレンジの確認

0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 mg/mL に調製した芍薬試料について、PCA プロット第一主成分とサンプル濃度の直線性を評価した結果、0.05 – 5 mg/mL において直線の相関係数 $R^2 > 0.95$ が得られた (Fig. 1)。そこで、ダイナミックレンジは 0.05 – 5 mg/mL とし、測定サンプル濃度は 0.5 mg/mL に確定した。

芍薬及び赤芍の主成分分析

全 48 品目 96 サンプルについて、前述の条件に従って LC/MS 測定とピーク抽出を行い、1,362 のピークを得た。PCA-X による主成分分析の結果、芍薬及び赤芍はスコアプロット上で、第一主成分が負の値を示すグループ A、第二主成分が負の値を示すグループ B、第一主成分と第二主成分共に正の値を示すグループ C に大別することができた (Fig. 2)。このうち、グループ A は主に日本産の芍薬 22 品目、グループ B は主に中国産の芍薬 10 品目、グループ C には赤芍 16 品目から成り、日本国内に流通する芍薬と赤芍は概ね、成分によって区別可能であることが示された (Table 1)。さらに、ローディングプロットから、第一主成分に対して負の寄与を示し ($p[1] = -0.42$)、グループ A の形成に影響する成分として sucrose、第一、第二の両主成分に対して正の寄与を示し ($p[1] = 0.32$, $p[2] = 0.25$)、グループ C の形成に影響する成分として paeoniflorin と推定される化合物が見出され、グループ B の形成に大きく寄与する成分は見つからなかった (Fig. 3)。すなわち、日本産芍薬は中国産芍薬よりも sucrose を多く含む傾向があり、赤芍は芍薬よりも sucrose が少なく paeoniflorin を多く含む傾向があることが明らかになった。

生薬中の糖の含量は、加工・調製法や貯蔵期間によって変化すること^{4,5)}、また、paeoniflorin

がシャクヤクの皮に多く含まれること⁶⁾は、既によく知られており、実際、HPLC や NMR 等の従来定量法によって、sucrose と paeoniflorin が芍薬と赤芍の判別の指標となり得ることが報告されている^{7,8,9)}。今回、LC/MS データの多変量解析という新たなアプローチによって、既報と同様の結果が得られたことから、本評価法は生薬の品質管理・評価法の一つとして有用であると考えられた。

シャクヤクの主成分分析

日本産及び中国産の芍薬 32 品目 64 サンプルの LC/MS 測定データについて、PCA-X による主成分分析を行った。その結果、スコアプロット上で、新潟産、長野産、中国産の皮付き芍薬のグループが確認された (Fig. 4)。一方、富山産及び兵庫産芍薬はサンプル数が少ないため分類できず、奈良産及び北海道産芍薬は分布が分散しており、明確なグループは確認できなかった。さらに、ローディングプロットからは、新潟産、長野産、中国産芍薬のグループ形成に大きく寄与する成分は見出せず、成分情報から芍薬の産地や性状の判定を行うことは困難だった (Fig. 5)。すなわち、国内市場に流通する芍薬の成分差異は比較的小さく、品種や産地、加工調製法が異なっても、その品質は比較的安定していることが示唆された。このことから、LC/MS データを用いた多変量解析は、生薬の規格判別のみならず、同等性評価においても有用であると考えられた。

D. 結論

規格が多様な芍薬及び赤芍を対象として、LC/MS 分析と多変量解析を行い、試料の差異や同等性についての品質評価を行うと同時に、生薬の品質管理・評価におけるメタボロミクス解析の有用性を検討した。芍薬と赤芍の成分比較では、両者の判別に有効な成分として既報と同様の結果が得られ、芍薬の成分比較では、試料の同等性が確認された。すなわち、LC/MS デー

タを用いた多変量解析は、生薬の規格判別のみならず、同等性評価においても有用であることが示唆された。今後、芍薬以外の生薬を用いて検討を行い、引き続き本評価法の有用性を確認することが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

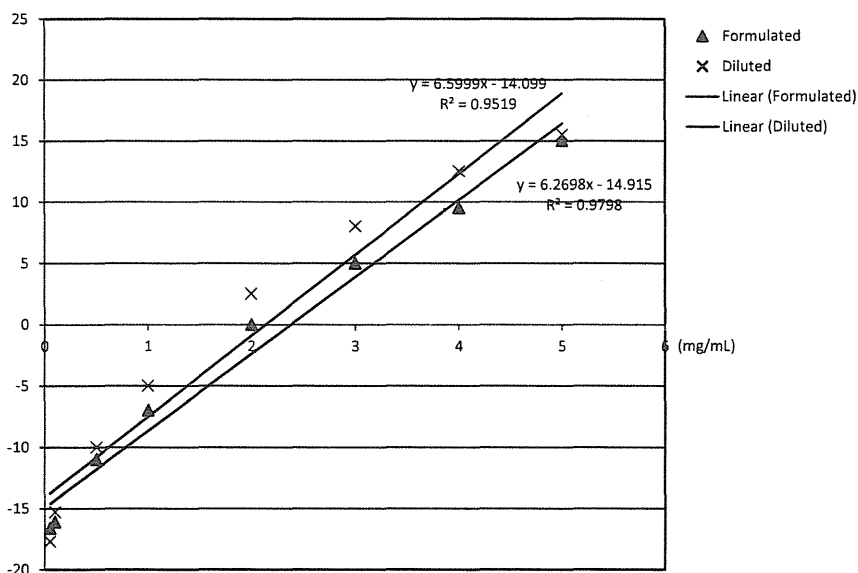
- 1) Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G.: Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13, 263-269 (2012).
- 2) Jumhawan, U., Putri, S.P., Yusianto, Marwani, E., Bamba, T., Fukusaki, E.: Selection of discriminant markers for authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak): a metabolomics approach. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 7994-8001 (2013).
- 3) 大根谷章浩, 淵野裕之, 高橋豊, 合田幸広, 川原信夫: ショウキョウ国内市場品の一酸化窒素賛成抑制活性と LC/MS メタボローム解析, *生薬学雑誌*, 67, 1-6 (2013).
- 4) 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎; シャクヤク・キバナオウギ・モッコウ生根の低温処理による糖及び希エタノールエキス含量の経時変化, *医薬品研究*, 40, 497-504 (2009).
- 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へ及ぼす影響, *生薬学雑誌*, 64, 68-75 (2010).
- 6) 吉崎正雄, 富森毅, 吉岡成美, 難波恒雄; 生薬の品質評価に関する基礎研究(第5報) 水素炎イオン化検出器を用いた薄層クロマトグラフィーによる生薬成分の定量法 その2 芍薬中の Paeoniflorin および Albiflorin の定量, *薬学雑誌*, 97, 916-921 (1977).
- 7) Cai, Y., Phillipson, J.D., Harper, J.I., Corne, S.J.; High performance liquid chromatographic and proton magnetic resonance spectroscopic methods for quality evaluation of Paeonia roots, *Phytochem. Anal.*, 5, 183-189 (1994).
- 8) Wang, Q., Liu, R., Guo, H., Ye, M., Huo, C., Bi, K., Guo, D.; Simultaneous LC determination of major constituents in Red and White Peony Root. *Chromatographia*, 62, 581-588 (2005).
- 9) Xu, S., Tian, R., Wang, Z., Liu, Z., Xie, P., Feng, Q.: Species differentiation and quality assessment of Radix Paeoniae Rubra (Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint, *J. Chromatogr. A*, 1216, 2163-2168 (2009).

Table 1 Details of the Peony Root and Red Peony Root samples using in this study

ID	産地	入荷年	備考	group	ID	産地	入荷年	備考	group
シヤクヤク					SYA-10	日本・長野	2008	切り花	A
SY-Y1	日本・奈良	2008		A	SYA-11	日本・長野	2008	薬用	A
SY-Y2	日本・奈良	2007		A	SYA-12	日本・奈良	2009	薬用	A
SY-Y3	日本・奈良	2006		A	SYA-13	日本・奈良	2006	薬用	A
SY-N1	日本・新潟	2009	春の粧	A	SYA-14	日本・新潟	2009	薬用	A
SY-N2	日本・新潟	2009	滝の粧	A	SYA-15	日本・兵庫	2008	薬用	A
SY-N3	日本・新潟	2009	和芍	A	SYA-16	日本・北海道	2010	薬用	A
SY-N4	日本・新潟	2009	花籠	A	SYA-17	日本・北海道	2009	薬用	A
SY-N5	日本・新潟	2009	氷点	A	赤芍				
SY-N6	日本・新潟	2009	夕映	A	SEKI-01	香港市場品	1992	皮付き	C
SY-N7	日本・新潟	2008	春の粧	A	SEKI-02	香港市場品	1992	皮付き	C
SY-T1	中国・安徽	2009		A	SEKI-03	中国・吉林	1993	皮付き	C
SY-T2	中国・安徽	2009		B	SEKI-04	中国・吉林	1994	皮付き	C
SY-T3	中国・安徽	2008		B	SEKI-05	香港市場品	1995	皮付き	C
SY-H1	日本・北海道	2008	べにしずか	B	SEKI-06	中国・河北	1996	皮付き	C
SY-H2	日本・北海道	2008	北宰相	B	SEKI-07	中国・河北	1996	皮付き	C
SYA-01	中国・安徽	2005	皮付き	B	SEKI-08	中国・河北	1998	皮付き	C
SYA-02	中国・山東	2002	皮付き	B	SEKI-09	中国・内モンゴ	1999	皮付き	C
SYA-03	中国・四川	2010		B	SEKI-10	中国・内モンゴ	2001	皮付き	C
SYA-04	中国・四川	2010		B	SEKI-11	中国・内モンゴ	2004	皮付き	C
SYA-05	中国・四川	2003	皮付き	B	SEKI-12	中国・内モンゴ	2005	皮付き	C
SYA-06	中国・浙江	2009		B	SEKI-13	中国・内モンゴ	2006	皮付き	C
SYA-07	中国	2001	皮付き	A	SEKI-14	中国・内モンゴ	2007	皮付き	C
SYA-08	日本・富山	2010		A	SEKI-15	中国・内モンゴ	2009	皮付き	C
SYA-09	日本・長野	2009	春の粧	A	SEKI-16	中国・内モンゴ	2009	皮付き	C

Table 2 Major contents detected on LC/MS chromatograms from the Peony Roots and the Red Peony Roots

Compound	RT (min)	m/z
Sucrose	0.54	341.1059 [M-H] ⁻
Gallic acid	0.80	169.0124 [M-H] ⁻
Oxypaeoniflorin	1.59	495.1527 [M-H] ⁻
Catechin	1.69	289.0686 [M-H] ⁻
Methylgallate	1.96	183.0302 [M-H] ⁻
Albiflorin	2.81	525.1633 [M+HCOO] ⁻ , 479.1541 [M-H] ⁻
Peoniflorin	3.18	525.1633 [M+HCOO] ⁻ , 479.1541 [M-H] ⁻ , 449.1465 [M-OCH ₃] ⁻
Pentagalloylglucose	4.30	939.1067 [M-H] ⁻
Galloylpaconiflorin	4.34	631.1651 [M-H] ⁻
Paeonin B or Paeonin C	5.37	525.1619 [M+HCOO] ⁻ , 479.1540 [M-H] ⁻

**Fig. 1** Linear plot of [1] score vs. sample concentration

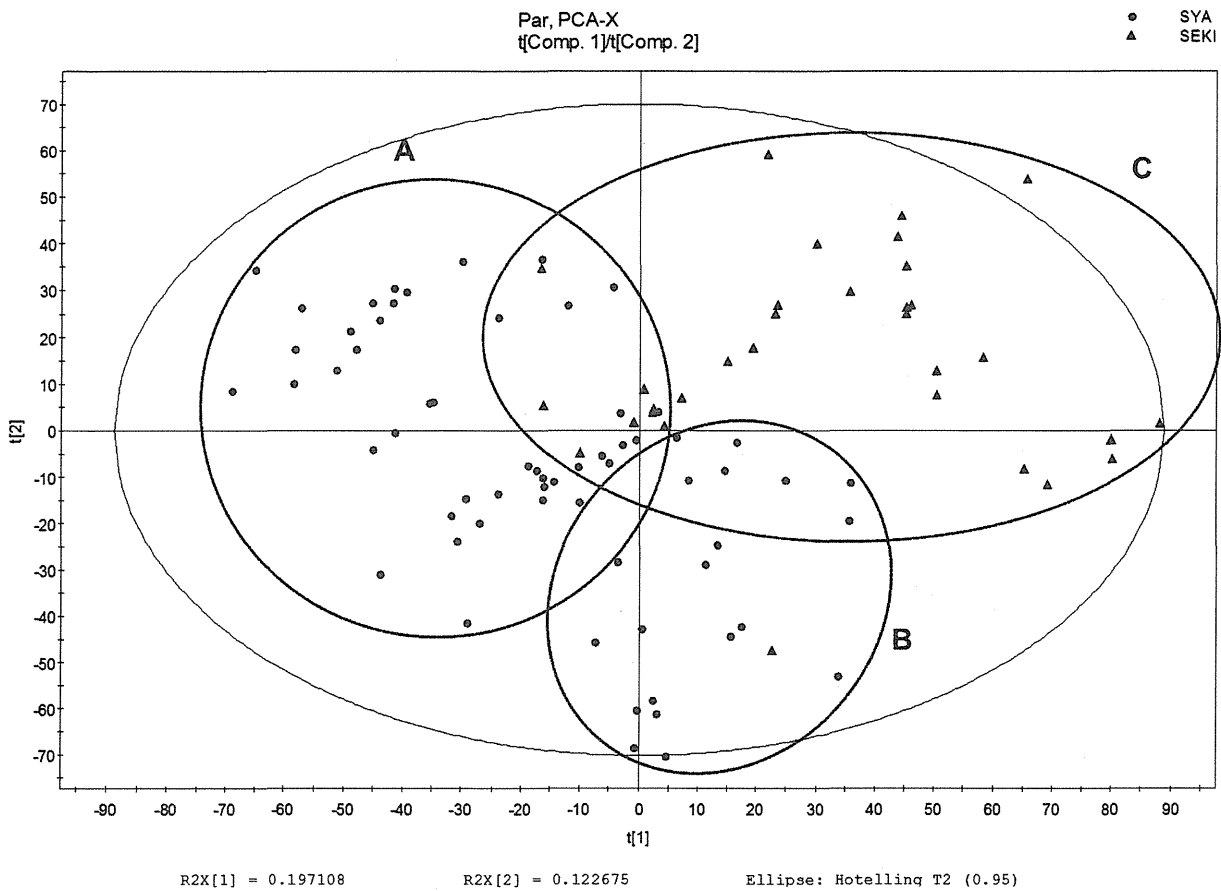


Fig. 2 PCA-X score plot from LC/MS analysis for the Peony Roots and the Red Peony Roots

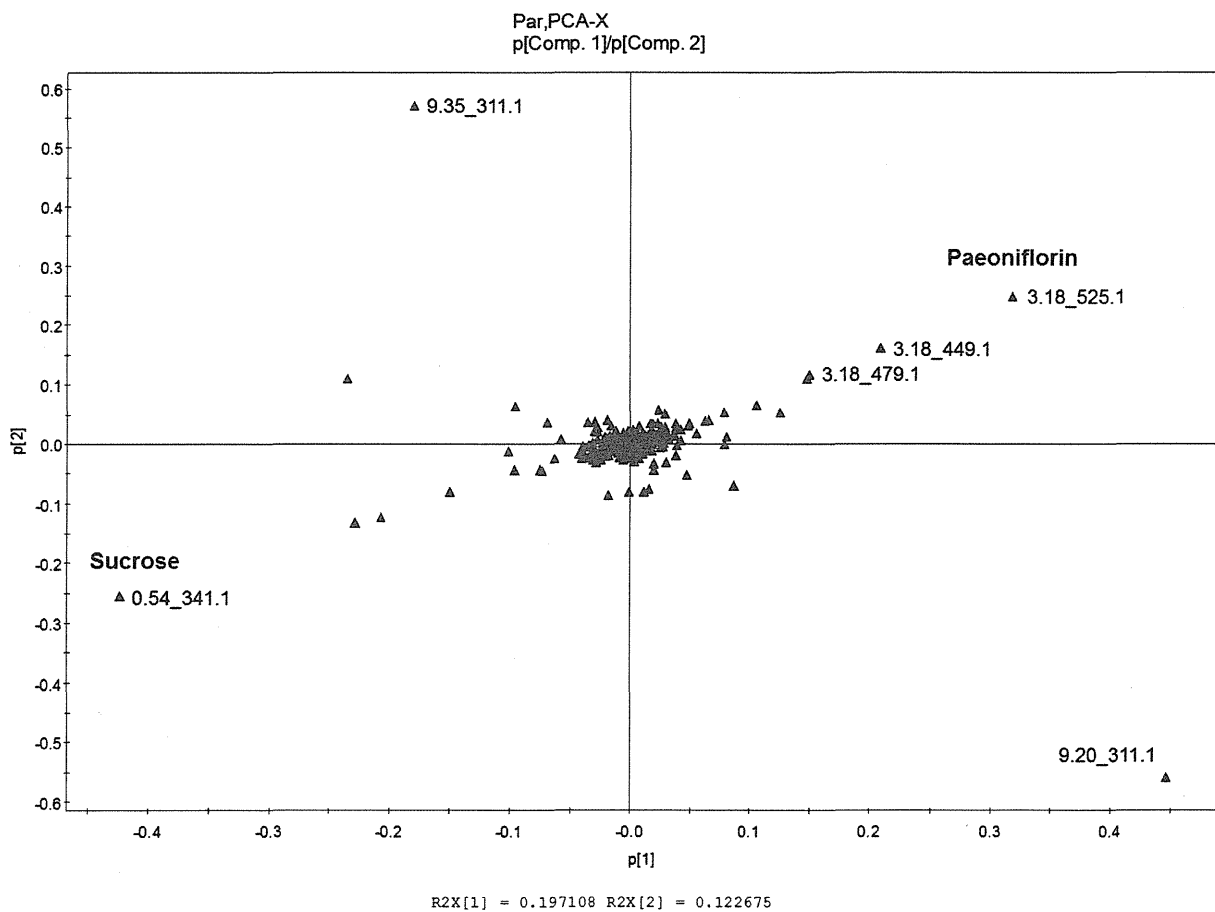


Fig. 3 PCA-X loading plot from LC/MS analysis for the Peony Roots and the Red Peony Roots

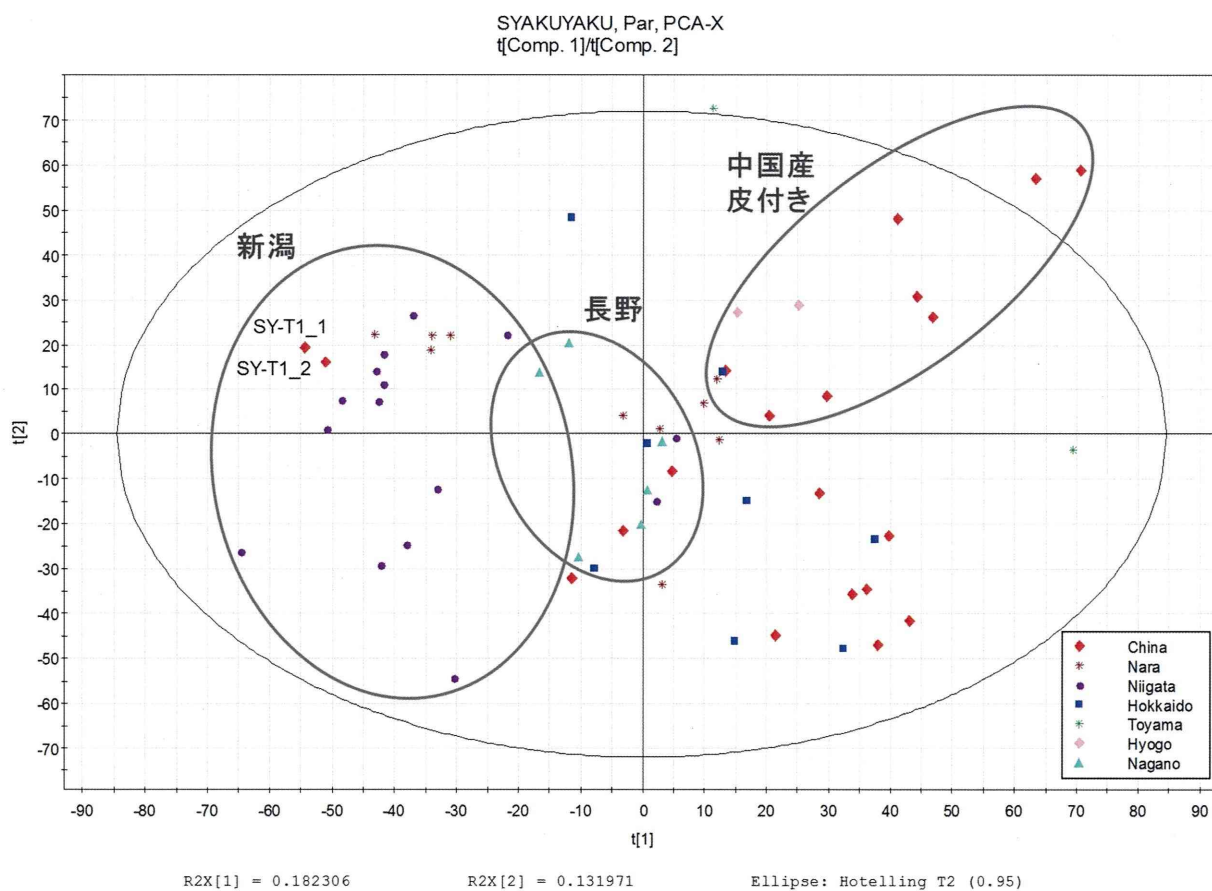


Fig. 4 PCA-X score plot from LC/MS analysis for the Peony Roots

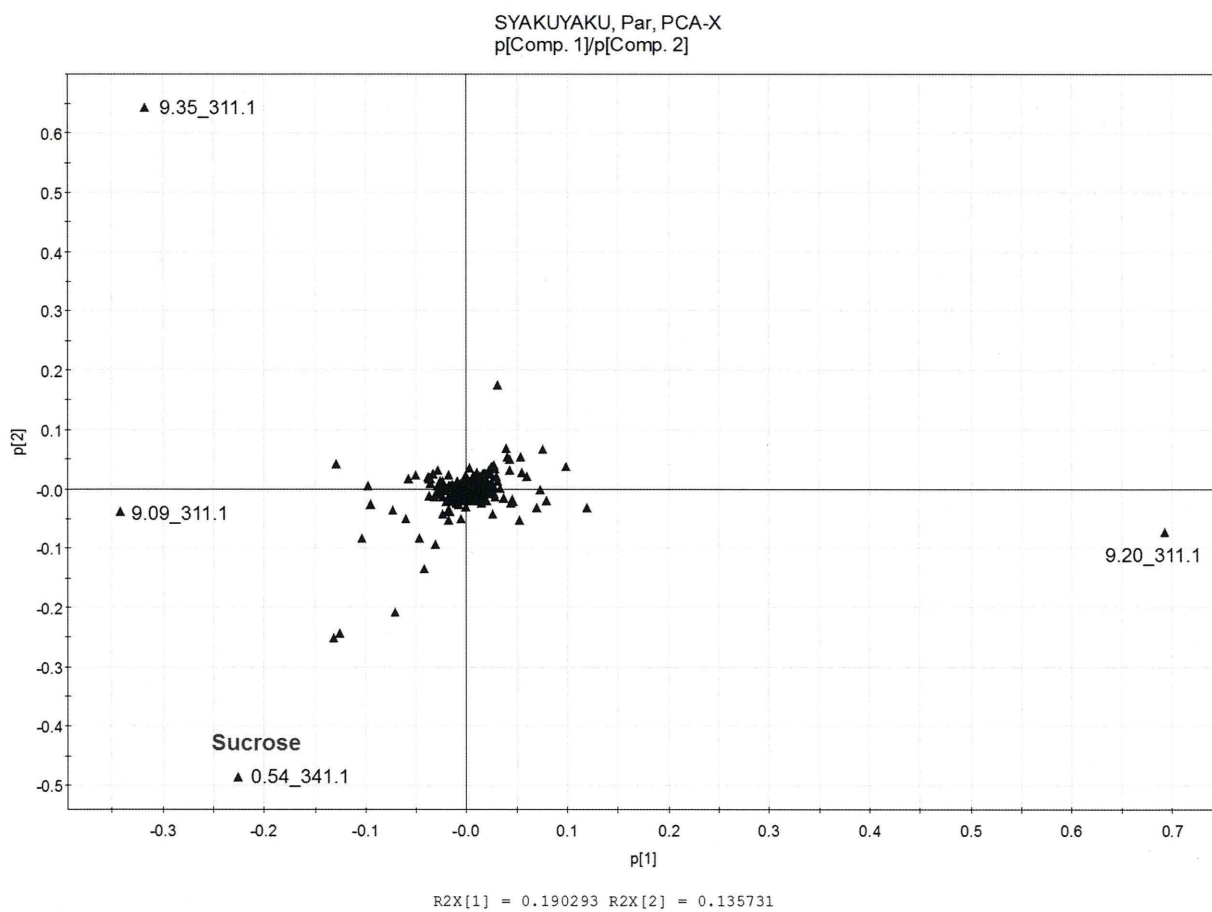


Fig. 5 PCA-X loading plot from LC/MS analysis for the Peony Roots

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 生薬及び生薬製剤の品質確保と安全性・有効性等に関する研究

研究分担者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究協力者 佐藤 直子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部研究員

半夏に含有される抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現増強活性成分に関する研究

我々は、漢方処方の有効性・安全性に関する研究の一環として腸内環境に対する漢方処方の影響について検討する中で、六君子湯にマクロファージにおける抗炎症性サイトカイン Interleukin-10 発現誘導活性を見出した。これまで、六君子湯構成生薬のうち半夏に強い発現誘導活性を確認しており、その活性成分は特殊な糖より構成される糖鎖、あるいは糖以外の高分子化合物であることを明らかにしている。本研究では、タンパク質である可能性を視野に入れ、活性成分の特性のほか、効率的に活性本体を得る方法についても検討した。

A. 研究目的

平成 20 年 9 月 30 日に薬食審査発第 0930001 号通知として一般用漢方製剤承認基準が発出され、昭和 40 年代末に公表された一般用漢方処方承認内規は約 30 年ぶりに見直された。これは、平成 14 年に厚労省の主催で開催された一般用医薬品承認審査合理化等検討会の中間報告書「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－」に対応したものであり、国立医薬品食品衛生研究所生薬部が主導した厚労科学研究における研究班報告書「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」（平成 20 年 3 月）を基盤としたものである。さらに通知発出がつつき計 294 処方を収載する承認基準へと拡大され、平成 25 年 9 月にはその解説書の「新一般用漢方処方の手引き」が発刊されている。

一般用漢方製剤承認基準に収載された処方、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。我々はこれに対して、漢方処方の腸内環境への関与という新たな視点で考察を進め、小腸

上皮細胞の周辺に局在し、腸内の炎症反応に深く関与するマクロファージ細胞に着目し、そのサイトカイン産生に対する影響について検討している。すでに、附子理中湯及び六君子湯を含むいくつかの処方に、抗炎症性サイトカイン Interleukin-10 (IL-10) の発現誘導活性を見出し、それぞれの処方の主な活性生薬が乾姜及び半夏であることを明らかにしている。昨年度までの研究で、半夏に含有される活性成分は、特殊な糖より構成される糖鎖、あるいは糖以外の高分子化合物であることが推察された。しかし、昨年度までの方法では、活性成分を同定できるほどの分量を得ることが困難であるという課題もあった。そこで本年度は、タンパク質である可能性を視野に入れ、ひきつづき活性成分の特性について検討を進めつつ、活性成分を大量に得る方法についても検討した。

B. 研究方法

試薬及び器具

半夏、甘草、人参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。DMEM 培地 (GIBCO

DMEM+GlutaMax™-1)、RPMI1640 培地 (GIBCO RPMI+GlutaMax™-1)、Penicillin-Streptomycin 溶液は Invitrogen 製を用いた。ウシ胎児血清 (FBS) は、biowest 社製の Fetal Bovine Serum を用いた。LPS (Lipopolysaccharides from Escherichia coli 0127:B8) は SIGMA-ALDRICH より購入した。水は MilliQ 水を用いた。

レクチン検出試験は、IWAKI 製の丸底の 96 穴マイクロプレートで行い、コスモ・バイオ株式会社製のウサギ保存血液を用いた。

サイトカインの定量には、Meso Scale Discovery 社の 96-Well Mouse Cytokine Assays Tissue Culture Kit を用いた。0.45 及び 0.22 μm 孔のメンブランフィルターは MILLIPORE Ultrafree-CL Centrifugal Filter Units を用いた。24 穴マルチプレート (FALCON MULTIWELL™ 24 well) は BD バイオサイエンスより購入した。100 mm シャーレ、96 穴プレート及びセルスクレーパーは旭テクノグラス製のものを用いた。

TLC 試験においては、Merck 社製の TLC Silica gel 60 F₂₅₄ を分析用薄層板として用いた。

脱塩は GE Healthcare 社の PD MiniTrap™ G-25 を用いて行った。また、ゲルろ過には、TSKgel GMPW_{XL} (13 μm 、7.8×300 mm、TOSHO) を用いた。

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 FREESE DRYER FDU-830 (東京理科器械) を用いて行った。細胞は、SANYO の CO₂ インキュベーター MOC-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。電気化学発光法によるサイトカインの定量には、Meso Scale Discovery 社のプレートリーダー Sector Imager 2400 を用いた。タンパク質濃度の測定には、コロナ電気社の紫外吸光度計 SH-1200 Lab を用いた。溶媒の留去には、佐久間製作所の遠心エバポレーター EC-57CS を用いた。LC-CAD 分析における LC 部は、LC-20AD (ポンプ)、SPD-M20A (検出器)、DGU-20A₃ (デガッサ

ー)、SIL-20AC (オートサンプラー) 及び CTO-20AC (カラムオーブン) から構成される島津製作所の Prominence システムを用いた。検出器としてフォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A (島津製作所) 及び荷電化粒子検出器 Corona CAD (日本ダイオネクス) を用いた。

半夏のエキス調製

半夏 20 g をポット (らくらく煎) にとり、生薬総重量の 20 倍量の水 (400 mL) を入れ、半量になるまで煎じた。熱いうちに茶こしでろ過し、広口の三角フラスコに移して冷ました。冷めた煎出液を 50 mL チューブに分注し、遠心分離 (3000 rpm、5 min、Kubota 6500) したのち、デカントで上清をナスフラスコに移した。これを -45°C で 90 分間おき予備凍結させたのち、2 日間凍結乾燥させてエキスを調製した。

レクチン検出試験及び TLC によるアミノ酸分析に用いる検体の調製

Oasis HLB カラム (30 mg/1 cc、Waters) に MeOH 1 mL を流してコンディショニングし、続けて水 1 mL により平衡化させた。ここに、半夏エキスの水溶液を 1 mL ロードし、非吸着画分 (S42-1) を回収した。この画分 6 mL 分を凍結乾燥させ、水 1 mL に溶解したうえでエタノール 4 mL を加え、一晚静置 (4°C) した。遠心分離 (3000 rpm、20 min) ののち、沈殿画分 (S42-1 EtP) を得た。これを凍結乾燥させ (用いるまで -30°C または 4°C にて保存)、5 mM Sodium Acetate buffer (pH 4.8) に 4.5 mg/mL になるよう溶解し、溶液 1 mL に対し加水分解酵素 (α -Amylase、 α -Arabinanase、Dextranase、Pectinase) をそれぞれ 2 unit 添加した。これについて、37°C で 24 h 酵素反応を行った後、95°C で 15 分間加熱し反応を停止した。遠心分離 (10,000 rpm、5 min) の後、上清を脱塩カラムに供して buffer を水に交換した。これを、後述の“ゲルろ過カラムによる分離分析”に従ってゲルろ過カラム TSKgel GMPW_{XL} に供し、保

持時間 10~40 分の間に 1 分間隔でフラクションを分取した。

レクチン検出試験

ウサギ保存血液 1 mL をとり、5 倍量の PBS を加え、遠心分離 (2000 rpm、5 min) ののち、上清を捨てた。これを 3 回繰り返す、赤血球画分を得、PBS を加えて 2%(v/v) 血球浮遊液とした。先述のように調整したレクチン検出試験用の検体について、丸底の 96 穴プレートに $1/2^{10}$ の濃度まで PBS で希釈した 2 倍希釈液をつくった (各濃度 50 μ L ずつ)。これに、2%(v/v) 血球浮遊液 50 μ L を加え、室温で 30 分間静置した。陽性対照にはコンカナバリン A (SIGMA-ALDRICH) を、陰性対照には PBS を用い、赤血球の沈降状態により凝集の有無を判定した。

TLC によるアミノ酸分析

先述のように調整した TLC 用検体を 2 mL チューブに入れ溶媒を留去した。これに 6N 塩酸 1 mL を加えて密封し、1 時間振とうさせたのち、110°C で 1 時間加水分解した。反応後、溶媒を留去し、残留物を 1 mL のメタノールに溶解させた。これを 30 μ L になるまで濃縮したものを試料溶液とした。別に、アミノ酸標品(グリシン、メチオニン、トリプトファン、リジン)を 1 mg/mL になるようメタノールに溶解し標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液を薄層板にスポットし、ブタノール/酢酸/水混液 (4 : 1 : 2) を展開溶媒として約 4 cm 展開した後、薄層板を風乾した。ニンヒドリン溶液を噴霧し、105°C で加熱しスポットを観察した。

タンパク質の抽出

生薬 10 g を粉砕機 (TI-200 型、株式会社シー・エム・ティー) にて粉末にし、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) バッファーと 1.5 倍量の海砂を加え、すりつぶした。これをガーゼでこしとり、50 mL チューブにうつし、遠心分離 (10000 rpm、3 min) した後、上清をタンパク質粗抽出液 (PW) として

得た。

硫酸アンモニウムによるタンパク質の分画

先述のタンパク質粗抽出液を氷冷下で攪拌させながら、予め細かく砕いた硫酸アンモニウムを 30% の濃度になるよう徐々に添加し完全に溶解させた。1 時間攪拌させたのち、遠心分離 (10000 rpm、30 min) し、上清と沈澱に分けた。得られた上清については、50%、70% の濃度になるよう同様に硫酸アンモニウムを添加し、それぞれの濃度で沈澱を得た。得られた沈澱には少量の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) バッファーを加えて再溶解させ、30% 硫酸沈澱画分 (P30)、50% 硫酸沈澱画分 (P50)、70% 硫酸沈澱画分 (P70) とした。また、70% の濃度になるよう硫酸アンモニウムを加えた際に得た上清を上清画分 (PS) とし、後述の試験に用いた。

ゲルろ過カラムによる分離分析

各生薬について、先述の脱塩したタンパク質抽出液を、タンパク質粗抽出液と硫酸アンモニウム沈澱による分画で得た液の生薬換算量が同じになるよう水で希釈し、メンブレンフィルターでろ過したものをゲルろ過カラム TSKgel GMPW_{XL} に供し、水を移動相として流速 0.3 mL/min で Isocratic に溶出させた。検出器は PDA-CAD を用い、カラムオーブンは 40°C に設定した。保持時間 0~60 分の間に 5 分間隔でフラクションを分取した。回収したフラクションの溶媒を留去し、血清抜き RPMI1640 培地 1.1 mL に溶解した後、メンブレンフィルターにてろ過したものを活性測定に供した。

培養細胞

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 (ATCC:TIB-71) は、大日本住友製薬より購入した。RAW264.7 細胞の継代培養は、DMEM 培地 (10%FBS、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin) で、37°C、5%CO₂、暗黒下にて行っ

た。継代する際は、セルスクレーパーでシャーレより剥がし、新鮮培地に1/5~1/40の希釈倍率で播種した。サイトカイン発現量定量においては、24穴プレートに 1.7×10^5 cells/1 mL/wellの濃度で細胞を播種し、24時間培養した後に用いた。

サイトカイン発現量の定量

検体試料として、ゲルろ過カラムによる分画前のタンパク質液を用いる場合は、表1に示すサンプル量に、それぞれ血清抜き RPMI1640 培地に加え総量 950 μ L とした。ゲルろ過カラムによる分画後の試料は先述の通りに調製した。これを、DMEM 培地を吸引除去した 24 穴プレートに投与した。対照区には血清抜き RPMI1640 培地 950 μ L を投与した。この状態で 30 分間培養した後、血清抜き RPMI1640 培地に溶解した LPS を 50 μ L/well (終濃度 100 ng/mL) になるよう添加した。これをさらに 6 時間培養した後、培地を収穫した。収穫した培地中のサイトカイン量は、Meso Scale Discovery 社の 96-Well Mouse Cytokine Assays Tissue Culture Kit に従って測定した。サイトカイン濃度は、Kit 添付のサイトカイン標準液より得た検量線を基準に算定した。

倫理面への配慮

本研究で用いるマウス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. 研究結果と考察

TLCによるアミノ酸検出

昨年度までの研究で、半夏に含まれる活性成分は特殊な糖より構成される糖鎖、あるいは糖以外的高分子化合物であることを明らかにしている。そこで、本年度はタンパク質である可能性を視野に入れ、活性画分を酸加水分解しアミノ酸が生成するかどうかを TLC にて確認した。

図1は、半夏由来の S42-1 EtP を糖加水分解酵素にて処理し、ゲルろ過カラムにて分画したもの

の IL-10 発現増強活性を示している。活性を示す画分のうち、GDM-T6 について塩酸による加水分解を行い TLC により展開したのち、ニンヒドリンを噴霧したところ、肉眼で2つのスポットを確認した(図2)。これにより、活性画分にはアミノ酸で構成されるものが含まれていることが示唆され、タンパク質の存在が推察された。

レクチン検出試験

TLC によりアミノ酸が検出されたことをうけ、まず、活性画分に含まれるタンパク質が、少量でも生理活性を示すことが知られている糖タンパク質のひとつであるレクチンの可能性を調べた。

図1に示す画分のうち、IL-10 発現増強活性のあった GDM-T5, T6, T7 及び増強活性のみられなかった GDM-T15, T25 について、レクチン検出のための赤血球凝集試験を行った。その結果、どの画分を用いた場合も赤血球の凝集は見られなかった。このことから、IL-10 発現増強活性画分にはレクチンが含まれていないか検出限界以下の量であることが示された。

各生薬のタンパク質粗抽出液および硫酸アンモニウム画分の IL-10 発現誘導活性

TLC によりアミノ酸が検出されたことをうけ、活性成分がタンパク質である可能性を確認するため、人参、甘草、半夏のそれぞれについて研究方法に示す通りタンパク質を抽出したものとその硫酸アンモニウム画分である PW、P30、P50、P70 および PS を作成した。これらのサンプルについて、RAW264.7 細胞における IL-10 発現増強活性を調べた結果を、図3((A)人参由来、(B)甘草由来、(C)半夏由来)に示す。これまでの研究で、単味生薬煎剤から作成したエキスの IL-10 発現増強活性は、人参ではほとんど見られず、甘草ではごく弱い活性が示された。しかし、タンパク質粗抽出液(PW)では、図3に示すように LPS 投与群と比較してどの生薬由来のタンパク質液でも強い IL-10 発現増強活性が示された。硫酸アンモニウ

ム沈澱により得た P30、P50、P70 でもその活性は保持されていた。

各タンパク質粗抽出液のゲルろ過カラムによる分離

人参、甘草、半夏それぞれの PW をゲルろ過カラムにより分画したのについて、RAW264.7 細胞における IL-10 発現増強活性を調べた。LPS 投与群の IL-10 発現量を 100 としたときの各画分における発現量の割合をグラフにしたものを図 4 に示す。なお、ゲルろ過カラムによる分画条件は、図 1 に示す半夏の単味生薬エキスから得られた S42-1 EtP を分画した際の条件と同様である。ただし、S42-1 EtP の場合は保持時間 10～40 分の間に 1 分間隔で、PW の場合は保持時間 0～60 分の間に 5 分間隔で分取したため、図 1 で IL-10 発現増強活性を示した画分 GDM-T4～GDM-T7 は、図 4 の P3 と P4 画分に含まれる。PW ゲルろ過カラム分取画分における IL-10 発現増強活性は、人参の場合、すべての画分で LPS 投与群に対し 5%以下だった。甘草と半夏では P3 および P4 画分に IL-10 発現増強活性がみられ、LPS 投与群に対し甘草ではそれぞれ 12%および 21%、半夏では 36%および 41%の活性を示した。3 種の生薬にみられた IL-10 発現増強活性の傾向は、単味生薬エキスの際にみられた傾向と矛盾がない結果となった。また、半夏の P3 および P4 画分で高い IL-10 発現増強活性が見られたことも S42-1 EtP の分画結果と一致していた。

次に、半夏の PW を硫酸アンモニウムにより分画して得た P30、P50、P70 および PS についても、PW と同様にゲルろ過カラムにより分画し、RAW264.7 細胞における IL-10 発現増強活性を調べた (図 5)。その結果、P30 を分画したもののうち、P3 および P4 に IL-10 発現増強活性の傾向が見られた (図 5A)。

人参や甘草の生薬由来サンプルにおいて、ゲルろ過カラムによる分画前には強い IL-10 発現増強活性が確認されたが、カラム分画後にはほぼみら

れなくなった。これは、S42-1 EtP に施した処理と同じ処理を行ったことで、IL-10 発現増強活性をもつタンパク質などが過酷な環境下で変性し、その活性を失ったためと考えられた。半夏においても同様の現象がみられたが、半夏の単味生薬エキスにおける活性成分と同様の挙動を示す画分の存在も確認され、この画分に含まれる活性成分は目的の成分と同じものである可能性が示唆された。今後、抽出方法を洗練させることで効率的に目的の活性成分を得、同定にむけた検討を進めていく予定である。

D. 結論

これまでの研究で、一般用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、マクロファージ様細胞をモデル系として用い、半夏における抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現増強活性成分についてその特性を明らかにしてきた。本年度は活性本体の特定のため、効率的に目的の活性成分を得る抽出法の検討を行い、従前の抽出法より簡潔に得られる可能性を見出した。今後、活性本体の特定にむけてさらなる検討を進めていく予定である。

E. 研究発表

1. 学会発表
該当無し
2. 誌上発表
該当無し

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表 1 RAW264.7 細胞に投与した、各生薬におけるタンパク質粗抽出液(PW)とその硫酸アンモニウム沈澱分画によって得た液(P30, P50, P70 および PS)の量。

	細胞投与量 (μL)		
	人参	甘草	半夏
PW	100	100	100
P30	13.33	16.84	8.33
P50	13.33	14.95	10.56
P70	14.58	18.95	10.56
PS	100	100	100
細胞に投与した液 の生薬換算量 (mg)	41.7	21.1	27.8

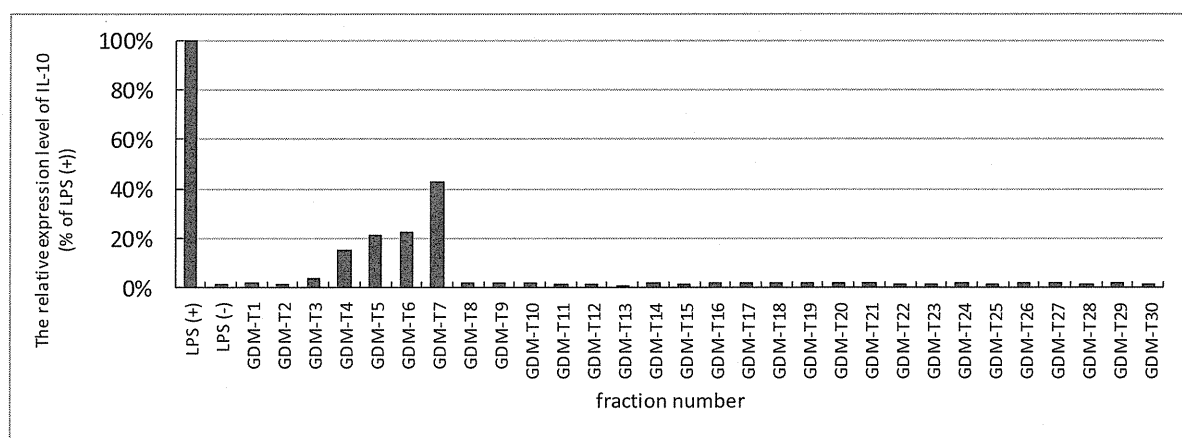


図 1 半夏単味煎出エキスのエタノール沈澱分画 (S42-EtP) におけるゲルろ過カラムフラクションの、RAW264.7 細胞における IL-10 発現増強活性

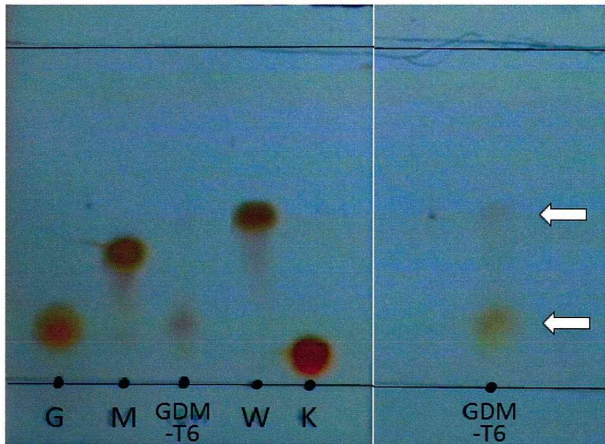


図 2 半夏単味煎出エキスにおける IL-10 発現増強活性画分 (GDM-T6) 加水分解物の TLC クロマトグラム。

G : グリシン、M : : メチオニン、W : トリプトファン、K : リジン、
GDM-T6 : 図 1 の GDM-T6 画分を塩酸により加水分解したもの

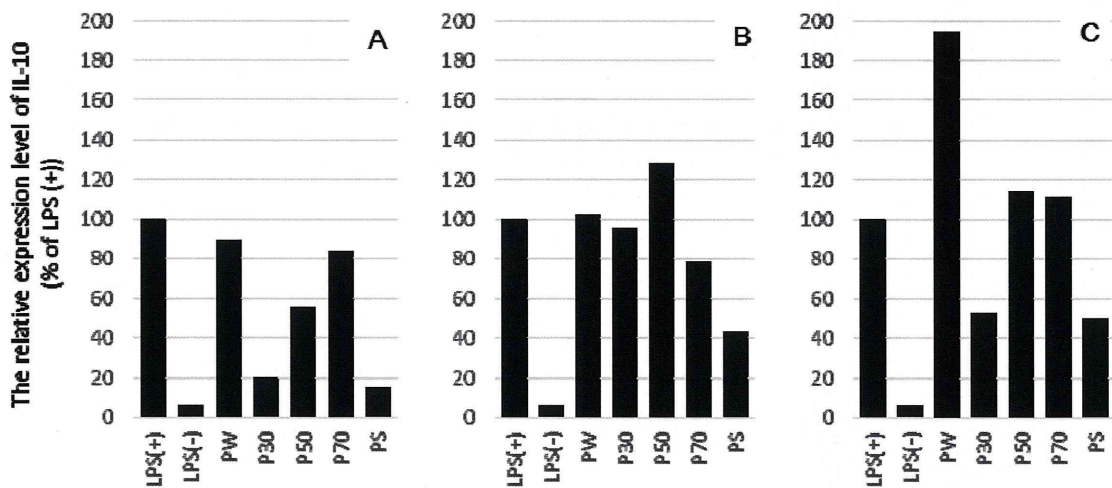


図 3 人参 (A)、甘草 (B)、半夏(C) 由来のタンパク質粗抽出液 (PW) および硫酸アンモニウム沈澱画分 (P30, P50, P70, PS) の RAW264.7 細胞における IL-10 発現増強活性

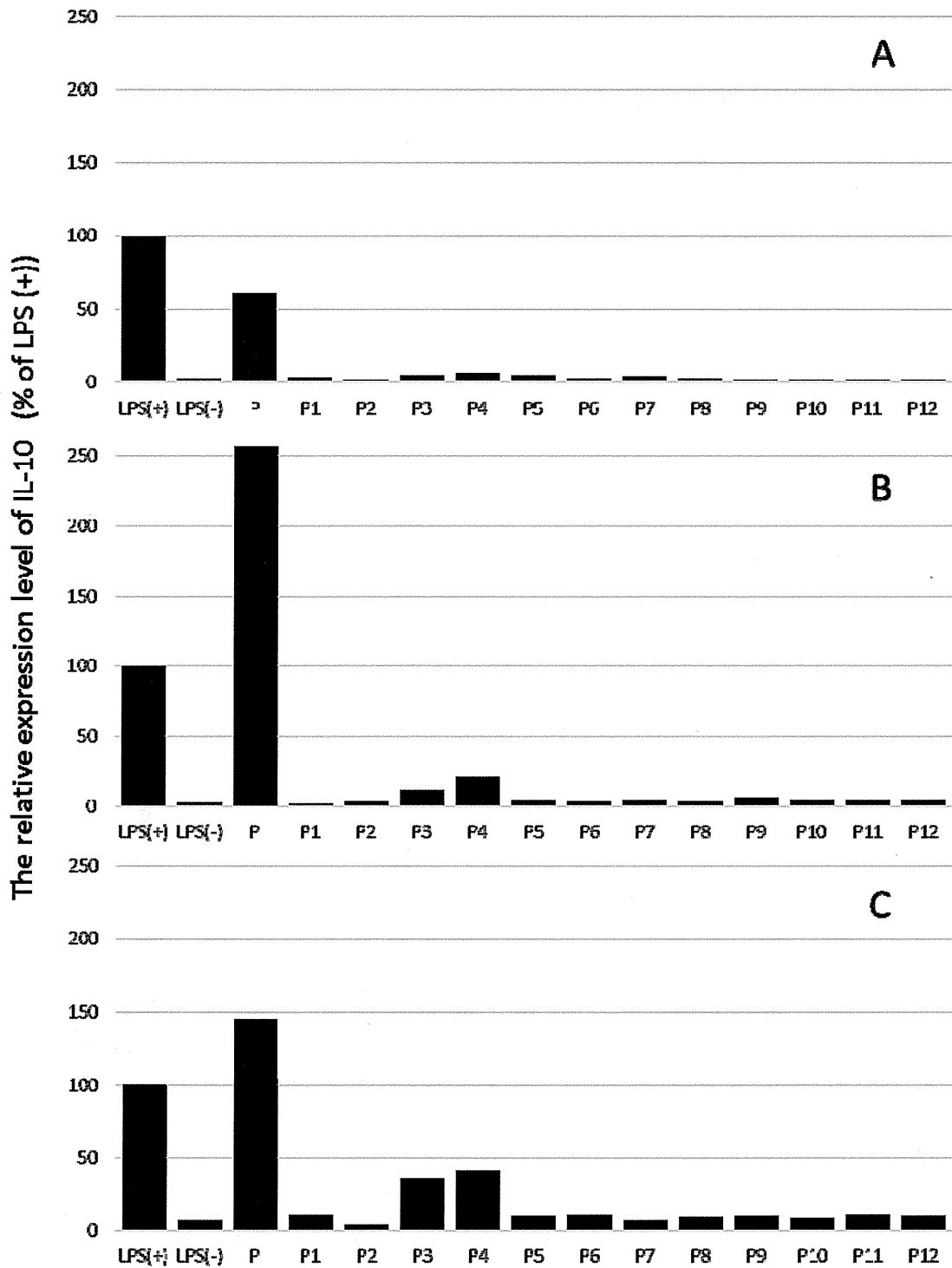


図4 人参 (A)、甘草 (B)、半夏(C)由来タンパク質粗抽出液 (PW) における、ゲルろ過カラムフラクションの IL-10 発現増強活性。

P : ゲルろ過カラム分画前の PW、P1~P12 : 保持時間 0~60 分間において 5 分間隔で分取した画分。図 1 の GDM-T4 と T5 は P3 に、GDM-T6 と T7 は P4 に相当する。