

Table 4 ISO/TC249 のワーキンググループ

WG1：(植物薬) 原材料及び伝統的加工の品質及び安全性 [中国]
WG2：(植物薬) 工業的 TCM 製品の品質及び安全性 [ドイツ]
WG3：鍼灸鍼の品質及び安全性 [中国]
WG4：鍼灸鍼以外の医療機器の品質と安全性 [韓国]
WG5：TCM の用語及び情報科学 [中国及び韓国]
JWG1：TCM の情報科学に関する TC215 (保健医療情報) との JWG
※教育、訓練は、優先順位が低いとされており、現時点では WG は設置されていない。

[]：幹事国

2.5 ワーキンググループ (WG) (Table 4)

ISO においては、通常、TC の中に複数の WG をおいて議論が行われます。TC249 には、現在のところ5つの WG と一つのジョイント WG (JWG) があります。

WG1 は、植物薬の原材料と伝統的加工の品質及び安全性を担当し、中国が幹事(コンビナー)国です。WG2 は工業的 TCM 製品(仮称)の品質と安全性を担当し、幹事国はドイツです。WG3 は鍼、WG4 はそれ以外の医療機器の品質と安全性を担当しています。WG5 は用語と情報科学で、幹事国は中国と韓国です。WG5 の内容は TC215 (保健医療情報) と重なるところがありますので TC215 と JWG を作っています。残念ながら日本は TC249 の中では WG の幹事国を取っていません。幹事国を取ると議論をリードできるため、非常に有利なのですが、日本にはこ

れができない状況にあります。

WG1 のもともとのスコープは、原材料(生薬) だけであり、植物を収穫するまでを担当する、というのが当初の解釈でした。しかし、2011 年 12 月に北京で開催された WG1 会議において「植物・生薬の加工(修治)は、生産工程の一部であり WG1 が担当する」と決議されてしまいました。翌年 4 月にベルリンで開催された WG2 会議においては、この WG1 の勝手な決議に対し、多くの反対意見が出ました。植物・生薬の加工は、薬品としての生薬の性質を変化させる行為であり、医薬品の生産工程の一部であることから、当然、WG2 メンバーは WG2 の領域と考えていたからです。

WG1, WG2 の考えは相いれないものでしたので、2012 年 5 月に韓国のテジョンで開催された第 3 回全体会議の前日、WG1 の幹事(中国)、WG2 の幹事(ドイツ)、及び、TC249 の事務局(中国)とで会談が持たれ、加工のうち、生産地の農家で行う簡単なもの(伝統的加工)は WG1 が担当し、工場で行う大量の加工(工業的加工)は WG2 が担当するとの結論にしました。このように、WG1 と WG2 の境界ひとつとっても、駆け引きがおこなわれています。これは、自分が幹事を務める WG で議論した方が、有利に進められるからです。

2.6 国際標準化の一般的構図 (Fig. 4)

電気製品のように、日本に国内規格があり、その優秀な規格を世界に広めたいと考えているとします。ところが競合国が類似の別の技術を持っていて、それを国際標準にし

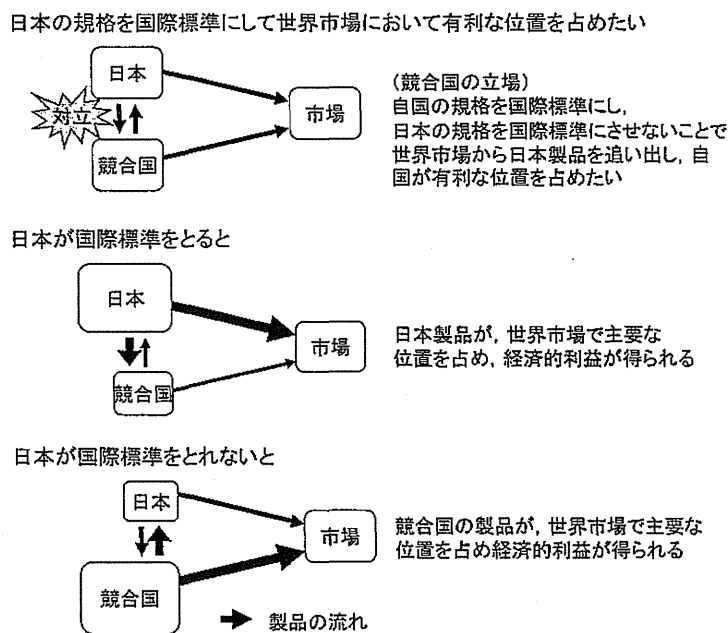


Fig. 4 国際標準化の一般的構図

Table 5 中国と日本で基原種が異なる生薬の例

日本薬局方	中国薬典
当帰 <i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels
防己 <i>Sinomenium acutum</i> Rehder et Wilson	<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore
独活 <i>Aralia cordata</i> Thunberg	<i>Angelica pubescens</i> Maxim. f. <i>biserrata</i> Shan et Yuan
川芎 <i>Cnidium officinale</i> Makino	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.
山椒 <i>Zanthoxylum</i> <i>iperitum</i> De Candole	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> Sieb. et Zucc. <i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maxim. (花椒)

たいと思っている場合、両者の利害がぶつかります。このような場合にはISOの場で、どちらの規格を国際標準として認めさせるかという戦いが行われることになります。

日本の規格が国際標準になりますと、競合国の製品は市場に供給しにくくなり、市場から淘汰されますので、日本が経済的利益を得ることになります。逆の場合は日本が経済的利益を失うことになります。

2.7 日中韓の伝統医学の標準化の難しさ

先ほど述べたように、日中韓の伝統医学は似て非なるものという微妙な関係にあります。そのため標準化は非常に難しいことになります。

日本薬局方と中国の薬局方である中国薬典において、基原種が異なる生薬の例をTable 5に示します。例えば当帰は、中国では*Angelica sinensis*が使われるのに対し、日本では*Angelica acutiloba*が用いられています。このような場合、我々は両論併記を中国に望みますが、中国は自国の製品の方が世界に広まっているとの思いがありますの

で、当帰としては*Angelica sinensis*だけで標準化すれば良いとの考えになります。他の生薬や処方、医学の部分でも同じ事が起こり、日中韓は常にぶつかることになります。

2.8 ISO/TC249における国際標準化の構図

鍼の場合は、国際標準化の構図は、先ほどの工業製品などの一般的構図と非常に近いものです(Fig. 5)。日本の鍼は非常に優秀で、細くて使い捨てになっています。細いので打つときに曲がりますが、曲がらないように細い筒が付いていて、目的とするところに正確に刺すことができます。患者の侵襲も少なく、非常に優れたものです。中国にはこのような鍼はほとんどありません。既に日本が使い捨ての滅菌済み鍼を欧米に輸出し、ある程度シェアを持っています。欧米人にとっては日本の鍼は馴染みがあり、品質が良いと評価していますので、日本としては非常に有利な立場で標準化できることになります。

しかし、植物製品に関する標準化は全く様相が異なります(Fig. 6)。まず、日本で使われている漢方薬の原料である生薬は、8割以上は中国産です。中国産が使用されるのは、値段が安いことが主な理由ですが、気候や風土などの理由で日本では栽培できない植物もあります。このことが、日本が中国に意見を言いにくい理由の一つになっています。

また、漢方薬や生薬製剤は日本では医薬品ですので、多くの日本企業は、もし、海外に輸出する場合でも、その国の正規の医薬品としての承認を取って輸出したいと考えています。一般的には、植物薬の承認のハードルは欧米では非常に高く、一部を除いては、日本の漢方薬や生薬製剤はほとんど輸出されていません。また、生薬は、もともと、日本では、ほとんど作っていませんので外国への輸出はわ

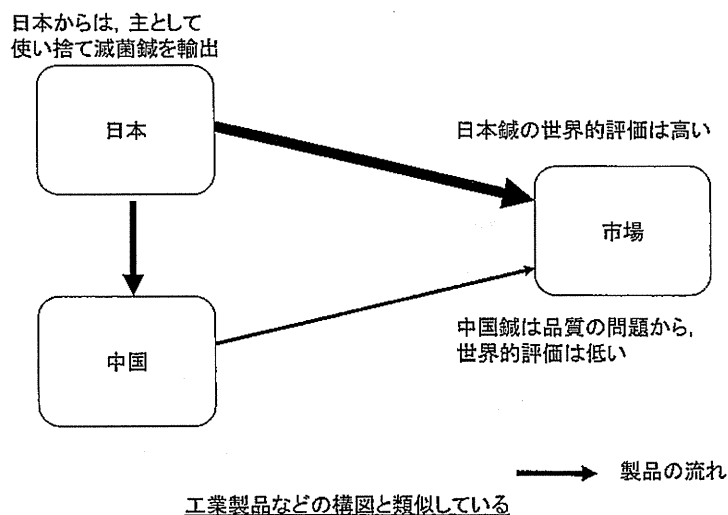
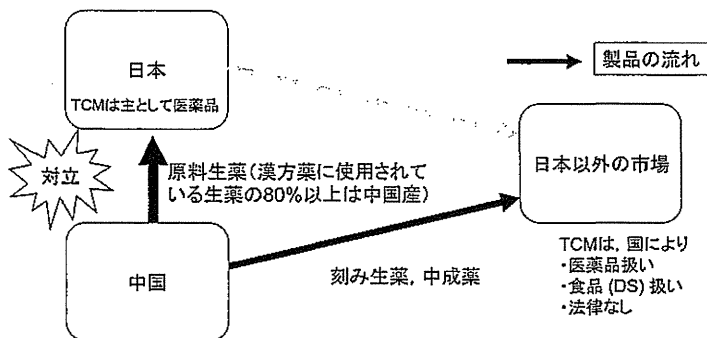


Fig. 5 ISO/TC249における国際標準化の構図(鍼)

日本からは、漢方薬、生薬はほとんど外国には輸出されておらず、また、(現時点においては)日本は国際市場への進出は望んでいない。ただ、中国から、現在と異なる規格の製品が入ってくるのは困る。



中国の規格を国際標準にし、世界市場において有利な位置を占めたい。
中国国内において西洋医学に比し劣勢な中国伝統医学の地位を上昇させたい。

Fig.6 ISO/TC249 における国際標準化の構図(植物製品)

—他の ISO/TC とは構図が異なる—

ずかです。したがって、TC249の対象となるモノは日本から外国へはほとんど出ていないというのが現状です。

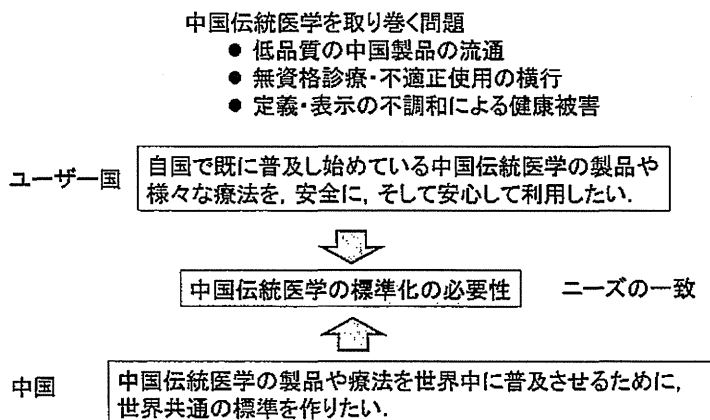
一方、中国は、中国からの移民が、各地で中国人コミュニティを作っています。そのようなところでは、まず鍼が広まります。鍼は一つあれば、繰り返して何度でも使えることが一因です。アメリカ、ヨーロッパも TCM としては、まず鍼が広がりました。その後、鍼治療を行っていた人(中醫師)が、本国から生薬や中成薬を取り寄せて、植物薬治療をはじめようになります。そのときに正規な医薬品としての手続を踏んでいる場合はほとんどありません。

TCM 製品は、アメリカにおいては Dietary Supplement (DS) として、効能(機能)をうたって販売されているものはありますが、正規の医薬品の承認を受けているものはありません。アメリカの DS は登録制度ですが、DS として登録されている TCM 製品はまだましな方で、登録

されていない TCM 製品も数多く売られています。EU でも同様に TCM 製品が流入しましたが、2013年4月の Traditional Herbal Medicine Registration Scheme (THMRS) の施行により、中成薬(Chinese patent medicine)は全て市場から排除されました。ただ刻み生薬はこの法律の範囲外ですので、まだ、使用されていると思われる。

2.9 中国伝統医学の国際化を求めるユーザー国 (Fig. 7)

古代中国医学を改良して使用しており、自国にそれに関する産業もあるが、現代 TCM 自体は普及していないという点で、韓国は日本によく似ています。しかし、ヨーロッパ、アメリカ、アフリカなどの国々(ユーザー国)では既に TCM がある程度広まっています。これらのユーザー国



このため、現在のところ、TC249では、日本が反対した案件を含め、全ての投票案件は賛成多数で通っている。

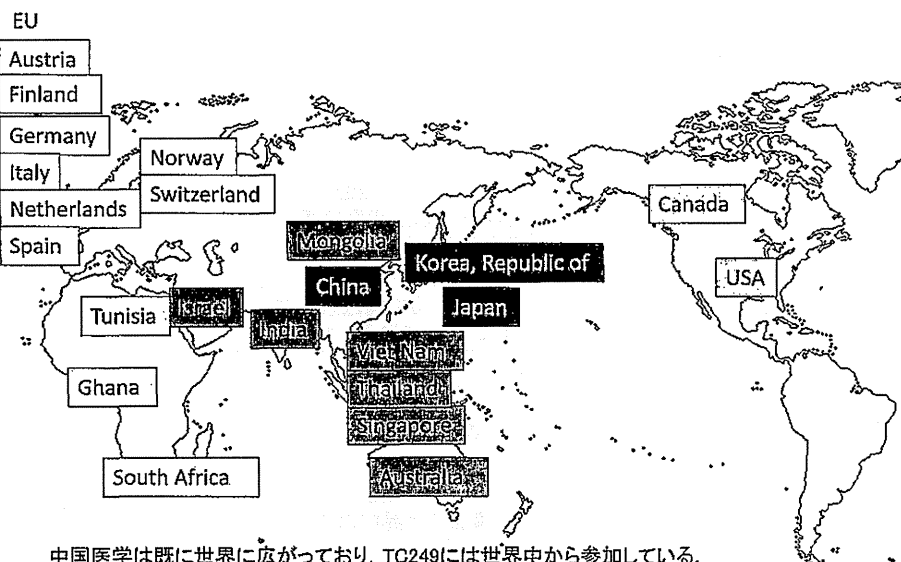
Fig.7 中国伝統医学の国際標準化を求めるユーザー国

は、既に流入しているTCMに何らかの規制をかけたいとの考えがあります。結果的に「TCMの国際標準化を積極的に進める」となり、TC249では中国と同じ立場になってしまいます。ユーザー国では、日本の漢方薬は全く広まっておらず、彼らは、東アジアの伝統薬としてはTCMしか知りません。したがって、中国規格だけを標準化することに何の問題も感じないわけです。日本としては非常に困ったことになっています。

中国としては、このユーザー国の要望を利用して、経済的な利益を得たいとの思いがありますが、中国がTCMの国際化を進めるのにはもうひとつの理由があります。現在、中国でも近代化に伴って西洋医学の地位が上がってきており、相対的に伝統医学である中国医学の地位が下がってきています。したがって、TC249は、中国医学の地位保全のための国内向けアピールという側面もあるわけです。

このように、ユーザー国と中国のニーズが一致しているため、TC249では、投票を行うと(大部分は中国提案)、賛成多数ですべて通ってしまいます。反対するのは日本、韓国、案件によってはドイツくらいです。ドイツは植物薬をEPの基準で厳密に考えていますので、反対するときは反対します。ただ、日韓独の3か国が反対をしても多数決ですから提案は通ってしまうことになります。

TC249の参加国(2013年5月現在)をFig.8に示します。中国医学はこれらTC249に参加しているEU、アフリカ諸国、カナダなどに広まり、中国移民の多いオーストラリアでは州によっては中医師のライセンスシステムまで存在しています。



中国医学は既に世界に広がっており、TC249には世界中から参加している。日中韓以外の参加者は、中国医学を学んで実践している者が多く、中国との結びつきが強い。漢方は世界には広まっておらず、漢方派の参加者はいない。

Fig.8 ISO/TC249 参加国(投票権を有する国)(2013年5月15日現在)

2.10 なぜ漢方をそのまま国際標準化しないのか

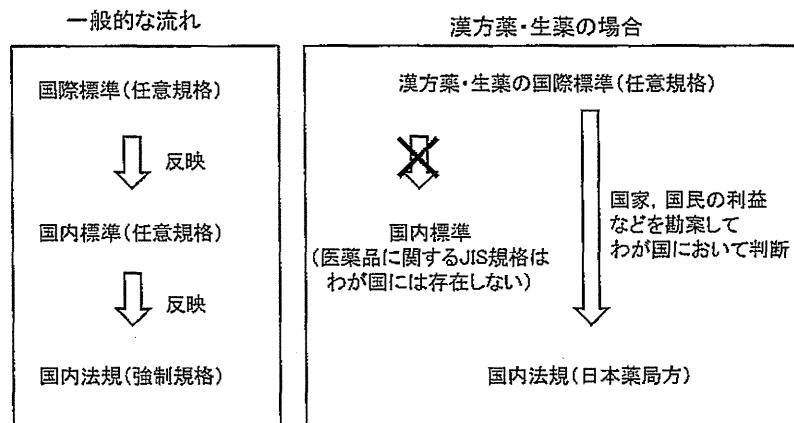
似て非なる日中韓の伝統医学や伝統薬を標準化しようとするから問題がおきるのであり、中国がTCMを標準化するのなら、日本も漢方医学をTCMとは別に標準化すればよいのではないかとよく言われます。

ISOで標準化を行う場合、まず、NP-ballotで、その提案を国際標準にする必要があることの承認を受ける必要があります。その際の評価項目のひとつに、Global Relevance(国際市場性)があります。しかし、漢方は、ほとんど、外国に出ていないため、現在のところ、漢方はGlobal Relevanceを有していません。

2012年に韓国・テジョンで開催された全体会議中のWG1において、韓国は、韓医学で用いる韓当帰(*Angelica gigas*)の種と苗の標準化の提案を行いました。しかし、韓国以外で韓当帰を使っている国はなく、国際性がないため国際標準は作る必要がないとして提案は否決されました。したがって、漢方医学だけの標準化を提案しても、韓当帰と同じ結果になると考えています。また、同様の理由で、漢方を対象とするTCを設立するのも難しいと思います。

2.11 中国が国際標準を取った場合の問題点

もし、当帰について標準化が行われ、中国の*Angelica sinensis*だけがそのまま国際標準になった場合、日本で現在使われていない当帰や、それが配合されたTCM製品が日本に入ってくる可能性があります。日本人で使用経験がない薬物が入ってくると何が起るかわかりません。また、日本の漢方医学、漢方薬が変質する可能性もあります。



国際標準を国内法規(日本薬局方)に反映させる、させないの権利は、わが国にある。ただし、反映させないことが、貿易障壁にあたりとWTOに提訴され、貿易障壁であるとWTOで判断された場合には、反映させる義務が生じる。

Fig. 9 国際標準化と日本薬局方との関係

2.12 国際標準化と日本薬局方との関係 (Fig. 9)

ISOで作成する国際標準は任意規格です、守っても守らなくてもよく、参考にして下さいというガイドラインのようなものです。先に述べた紙のサイズを例にとりますと、国際標準のA3, A4があっても、日本はB4, B5を使用してもかまいません。

ただし、ISOの加盟国はこのISO規格を国内標準に反映させなければいけません。これはほぼ義務ですが、国内標準に反映されたとしても、依然として、任意規格です。この国内標準が国内法規に反映されたときに、初めて強制規格になるわけです。

ただ、漢方、生薬の場合は国内標準であるJIS規格がありませんので、ISOで国際標準が作られた場合、いきなり日本薬局方(強制規格である一種の法律)に反映させるかどうかを判断しなければなりません。国際標準を薬局方に反映させることが日本の不利益(例えば、健康被害の可能性)につながると判断された場合には、国際標準を薬局方に反映させなくてもかまいません。ここまででしたら、植物薬がTCMに標準化されたとしても、輸出企業を除いては、国内への影響はないと言えます。

しかし、日本が生薬の日局規格に国際標準を反映させなかった場合、例えば中国の*Angelica sinensis*を日局当帰の基原種として記載しなかった場合、「*Angelica sinensis*が日局に記載されないのは、日本国内の*Angelica acutiloba*生産者を保護するために日本が設けている貿易障壁である」と中国から抗議される可能性があります。

WTO(世界貿易機関)のTBT(Technical Barriers to Trade)協定には、貿易相手国によって差別的に国内規格を適用してはならないと書かれています(Table 6)。日本はWTOに加盟していますので、この協定を守らなけれ

ばなりません。国際標準を日本の国内標準(医薬品の場合、日本薬局方)に反映させなかったら、WTOに訴えられる可能性もあるということです。それが貿易障壁にあたるかどうかの裁定はWTOが行うことになります。

国際標準を日本が用いなかったために、WTOに訴えられたケースをご紹介します。皆様が使用されている非接触式ICカードであるSuicaは、ソニーが発明したものです。しかし、このSuicaのシステムは国際標準化されませんでした。そのうちにアメリカのモトローラ社が類似のシステムを国際標準にしました。2000年にJR東日本が交通系カードとしてソニー方式を採用しようとして準備を始めましたところ、モトローラ社は「JR東日本がソニー方式を採用することはWTOの政府調達違反である」と異議申し立てを行いました。日本はこのとき慌てて、ソニー方式の非接触

Table 6 WTO TBT 協定 (世界貿易機関：貿易の技術的障壁に関する協定)

WTO協定の一部を構成するTBT協定は、途上国を含むすべてのWTO加盟国に関し、以下の義務を課している

- ①貿易相手国によって差別的に国内規格を適用してはならない(A国からの輸入品にはa規格、B国からの輸入品にはb規格といった適用はできない。)
- ②国内規格は、国家安全保障上の必要性など正当な理由が無い限り、国際貿易上の不必要な障害をもたらす目的で作られてはならない
- ③国内規格は、気候上の理由など正当な理由が無い限り、国際規格を基礎として作成しなければならない

このように、TBT協定は、各国の規制等で用いられる強制規格や任意規格を国際規格に整合化していくことで、規格による不必要な国際貿易上の障害を排除し、公正で円滑な国際貿易の実現を目的としている

WTO: World Trade Organization, TBT: Technical Barriers to Trade

式ICカードを別の標準カテゴリである汎用近距離無線の通信規格として国際標準化し、難を逃れました。もしこの時、うまくいっていなかったら、本日、皆さんがここへ来るのに使われた、SuicaやPiTaPa、ICOCAなどは全てモトローラ方式になっていた可能性があります。このようなことが医薬品の分野で絶対に起こらないという保証はありません。

2.13 TC249における標準化の現状(植物薬関係) (Table 7)

2.13.1 DIS ballotを通過した提案

植物薬関係で、現在、最も標準化が進んでいるのはWG1における中国提案の“Ginseng Seeds and Seedlings – Part 1: *Panax ginseng* CA Meyer”(オタネニンジンの種と苗)です。既に、国際規格原案(DIS: Draft International Standard)が作成され、あと1回の投票を通過すれば国際標準になります。この標準はニンジンの種を、その大きさや発芽度などにより、1級品、2級品のようなグレードにわけられるものです。苗についても同様のグレード分けを行うものです。

日本では限られた一部の地域のみでニンジン栽培していますが、栽培したニンジンからとれた種を、そのまま蒔いて栽培するというを繰り返しています。日本から種や苗を外国に輸出することもしていませんので、この国際標準は国内産業にはほとんど影響はないと考えられます。

す。日本は、標準に栽培方法を含ませないことを最初の段階で提案して、それが取り入れられた後は、この提案に対しては投票ではずっと賛成してきました。このような提案にまで反対すると、日本は何にでも反対する国であるとの印象を持たれてしまうとの懸念から、本標準については、中国に恩を売ると言う意味でも賛成してきたということです。中国もこの人参の種と苗の標準は、反対が少なく通りやすいだろうと考え、これを先行して提案することで早期の実績を作ろうとしているようです。

2.13.2 NP ballotを通過した提案

作業項目として正式に取り上げられ、委員会原案(CD: Committee Draft)を作成中の提案としては、WG1における中国提案の“Heavy metals in natural materials of Traditional Chinese Medicine”(生薬の重金属限度値)があります。この提案では、日本の現在の規制とは異なる限度値が設定される可能性があり、国内への影響が懸念されます。

また、生薬の呼び名を規定する“Traditional Chinese medicine – Vocabulary – Part 1: Chinese Materia Medica”(中国)、刻み生薬のコード化ルールを決める“Coding System of Chinese Medicine – Part 1: Coding Rules for Decoction Pieces”(中国)もWG5で進められています。これらは、似て非なる日中韓の伝統医学をTCMに標準化させようとするものであり、日本にとっては非常に危険なものです。

医療機関で使用する煎じ薬製造装置の“Herbal decoc-

Table 7 ISO/TC249での植物薬に関する標準化の現状(2013年9月現在)

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ● DIS ballot 通過—国際規格原案が作成されており、あと1回の投票で国際標準になる <ul style="list-style-type: none"> - Ginseng Seeds and Seedlings—Part 1: <i>Panax ginseng</i> CA Meyer (China) ● NP ballot 通過—作業項目として正式に取り上げられ、委員会原案を作成中 <ul style="list-style-type: none"> ○ Heavy metals in natural materials of Traditional Chinese Medicine (China) ○ Traditional Chinese medicine - Vocabulary—Part 1: Chinese Materia Medica (China) ○ Coding System of Chinese Medicine—Part 1: Coding Rules for Decoction Pieces (China) - Herbal decoction apparatus (China) ● NP ballot 準備中—作業項目として取り上げるかどうかの投票準備中 <ul style="list-style-type: none"> - Quality and Safety of natural materials and manufacturing products made with natural materials used in and as traditional Chinese medicine (TCM) (Germany) - Quality and Safety of natural materials and manufacturing products in Traditional Chinese Medicine (provisional)*: General requirements for manufacturing process of finished products (Japan) - General requirements of manufacturing process for Red Ginseng (Korea) ○ Coding System of Chinese Medicine : Part 2: Codes of Decoction Pieces (China) ○ Coding System of Chinese Medicine : Part 3: Coding Rules for Chinese Medicines in Supply Chain Management (China) ○ Coding System of CMs: Part 4: Coding Rules for Formulas and their Codes (China) ○ Traditional Chinese Medicine—Categories of TCM Clinical Terminological System (China) ● PWI 段階—提案がなされただけで、まだ作業項目にはなっていない <ul style="list-style-type: none"> - Therapeutic equivalence of single herb products for herbal decoction/preparation (Korea) - Geo-herbs (China) - Safety standards for the processed lateral root of <i>Aconitum carmichaelii</i> (“zhi fu zi” 制附子) (USA) - Guidelines for manufacturing safe and regular herb preparations in individual clinics (Korea) |
|--|

() : 提案国, ○ : 日本にとって問題あり

tion apparatus” (中国) は WG4 で委員会原案が作成されつつあります。

2.13.3 NP ballot 準備中

作業項目として取り上げるかどうかの NP ballot をおこなうことが全体会議において承認されているものには、ドイツが WG2 に提案している “Quality and Safety of natural materials and manufacturing products made with natural materials used in and as traditional Chinese medicine (TCM)” (TCM 製品 (仮) の出発物質と最終製品の品質と安全性)、日本が WG2 に提案している “Quality and Safety of natural materials and manufacturing products in Traditional Chinese Medicine (provisional): General requirements for manufacturing process of finished products” (TCM 製品 (仮) の製造工程における一般的要求事項)、韓国が WG2 に提案している “General requirements of manufacturing process for Red Ginseng” (コウジンの製造工程における一般的要求事項) があります。ドイツと日本の提案のタイトルにある TCM 製品 (仮) には漢方製品も含まれるという前提で作業を進めています。

また、Part 1 が既に作業項目として認められている中国薬のコード化 (WG5, 中国提案) の Part 2 から Part 4 も NP-ballot を待っています。Part 4 は処方に関するものですので、この標準が成立すると、日中韓の葛根湯に同じコードを付与するということになるかもしれません。また

WG5 では、中国提案である TCM の臨床用語の標準化も NP-ballot を待っているところです。

2.14 日本薬局方への影響が懸念される標準化提案 (Table 8)

2.14.1 Heavy metals in natural materials at Traditional Chinese Medicine (China)

既に、少し述べましたが、WG1 において、中国が中心となって生薬の重金属限度値の委員会原案を作成中です。日本は NP-ballot の時は反対しましたが、賛成多数で通過してしまいました。

本提案の内容は、四つの重金属 (Pb, As, Cd, Hg) に関して、ICP-MS による個別定量を行い、生薬ごとではなく全生薬共通の緩い限度値を設定しようとするものです。

日局では、生薬の重金属定量は、ICP-MS ではなく、比色法による鉛換算値であらわし、かつ生薬ごとに規格値を決めています。方法も全く異なりますし規格値の決め方も異なります。

ICP-MS による生薬の重金属の個別定量は、わが国の小規模な会社ではすぐに対応できることではありませんが、ICP-MS による定量の方が正確であることは確かです。将来的には、この方法に替えざるをえないと考えています。

ただし、限度値を緩めにすることは日本国民の健康と安

Table 8 日本薬局方への影響が懸念される標準化提案

<Heavy metals in natural materials of Traditional Chinese Medicine (China)>

標準案作成中 (日本は作業項目にするかどうかの投票では反対)

- 中国提案: Pb, As, Cd, Hg に関し、ICP-MS による個別定量を行い、全生薬均一の緩い限度値 (高い目の限度値) を設ける。
- 日局の現状: 鉛換算値で、生薬ごとに限度値を設定 (重金属の個別定量は規定されていない)
- 日本の主張: ICP-MS による個別定量は、科学的であり、将来的には受け入れざるをえない。(緩い) 限度値の設定には反対。(ドイツなども、限度値の設定は、各国の権利であるとのことから同意見)
- 中国案で標準が設定された場合の日本への影響 (可能性): 日本薬局方の生薬の重金属の限度値が変更され、重金属量の高い生薬が使用されるようになり、国民の健康への影響がでる。

<Traditional Chinese medicine - Vocabulary—Part 1: Chinese Materia Medica (China)>

標準案作成中 (日本は作業項目にするかどうかの投票では反対)

- 中国提案: 500 以上の生薬について、中国薬局方のままの、中国正名 (中国の簡体字)、ピンイン名、ラテン名、英名、基原植物/動物/鉱物の名称、活性成分、使用部位、採集時期、採集地での基本的処理 (修治の一部) を規定する
- 日局の現状: 日本薬局方の生薬の規格は、日本の状況を基に設定されているため中国薬局方とは、かなり異なっている
- 日本の主張: 特定の国の薬局方をそのまま標準にするのは反対。日中韓の局方の統一はできないので、日中韓などの薬局方の生薬の並列記載を行うべき。
- 中国案で標準が設定された場合の日本への影響 (可能性): 日本薬局方の生薬の記載・規格が全面的に改訂され、中国薬局方と同じになる。日本で使用経験のない生薬がわが国で使用されるようになり、国民の健康への影響がでる。

<Coding System of Chinese Medicine—Part 1: Coding Rules for Decoction Pieces (China)>

標準案作成中 (日本は作業項目にするかどうかの投票では反対)

- 中国提案: 中国薬局方、中国の状況のみを考えて、コードを設定。
- 日本の現状: 中国提案ほど細かな刻み生薬のコードは存在しない。
- 日本の主張: コードの上位概念に CJK (日中韓) を入れ、その下位概念は、各国でコード化する。
- 中国案で標準が設定された場合の日本への影響 (可能性): 中国のコード化の提案は、日本の現状にあわないため、刻み生薬自体を中国提案のものにあわせる必要がある。そのためには、日本薬局方を改訂する必要がある。

全に影響を及ぼしますので到底受け入れられず、反対しています。全生薬均一の規格を設けることについても、生薬によっては長期間服用するものとそうでないものがあることから反対です。また、日本人は米中心の食生活の中で、諸外国より比較的多めの重金属を日常的に摂取しており、重金属のベース摂取量は比較的高めです。そのため、世界一律の生薬の重金属限度値を設定することは科学的ではなく、それは国により異なるべきであると考えています。

2.14.2 Traditional Chinese Medicine-Vocabulary-Part 1 : Chinese Material Medica (China)

日本はNP-ballotでは反対しましたが、賛成多数で作業項目になりました。本提案は、生薬の名前を標準化しようというのですが、中国が提案している標準書の内容は、中国の薬局方(中国薬典)の記載そのままです。つまり、当帰のところには、*Angelica sinensis*と書かれてあり、中国発音も添えられています。この内容は、日局とかなり異なりますので、日中韓のものを並列して載せるように主張していますが、現在のところ認められていません。現実には、中国薬典に載っている生薬が世界で出回っていますので、日韓以外の国々は、中国薬典の生薬だけを標準化すればよいと考えています。

2.14.3 Coding System of Chinese Medicine-Part 1 : Coding Rules for Decoction Pieces (China)

この提案はTable 9に示したように生薬を10項目15ケタの数字でコード化しようというものです。コード化という考え方自体は問題ないものの、生薬名の標準化と同様、中国の現状だけをもとにコードが作成されますので、日本

Table 9 Coding System of Chinese Medicine-Part 1: Coding Rules for Decoction Pieces (NWIP from WG5)

I layers:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
II digits:	0	6	X	XXX	X	X	XX	XX	XX	X

- Layer 1: Main category of agriculture, forestry, animal husbandry, fishery, and Chinese medicine
- Layer 2: Product code of Chinese medicine
- Layer 3: Main code of medical source
- Layer 4: Subdivided code of medical source
- Layer 5: Main code of medical part
- Layer 6: Subdivided code of medical part
- Layer 7: Species code of Chinese medicine
- Layer 8: Specification code of Chinese medicine
- Layer 9: Processing and variety code of Chinese medicine
- Layer 10: Check code

の現状と合いません。このまま標準化されると、日本への影響がある可能性があります。

3. わが国の課題 (Table 10)

中医学と漢方医学は明確に異なるので、ISO/TC249でTCMが標準化されても、日本には影響が及ばないはずと考えられておられる方がよくおられますが、影響は必ずあります。

また、わが社は国内だけで事業を行っているのに、国際標準は関係ないといわれることも多いですが、近い将来、必ず関係が出てきます。

国内法に抵触するような国際標準が成立することはあり得ないとも言われますが、これは、WTOの仕組みをご存知でないからです。

このような誤解が、わが国のTC249への対応に明らかに影響を与えています。

日本のTC249への対応体制は、関係者のボランティアで成り立っており、砂上の楼閣のようなものです。基礎が築かれていませんので、何かあると、あっという間に崩れてしまいます。その中で関係者の負担は非常に大きいもの

Table 10 わが国の課題

<国内学会・業界の雰囲気>

- 国内で事業を展開する限り国際標準は関係ないはず。
- 中医学と漢方医学は明確に異なるので、日本には影響が及ばないはず。
- 国内法に抵触するような国際標準が成立することはないはず。

• WTO (世界貿易機関) / TBT (貿易の技術的障害) 協定を盾に、ISOブランド製品の受け入れを求められる可能性がある。
 • 生薬価格の高騰、生薬の供給不足が助長されたとき、漢方医療及び漢方業界は大きな影響を受ける。

伝統医学の国際標準化に対する国内理解の促進

<日本の国際対応の現状>

- TC249日本チームはTC249国内審議団体のJLOMから派遣されているが、その実態は、病院、大学、研究所、メーカー等からボランティアで集結した寄り合い所帯である。
- 日本の国際対応は、経済産業省からや、厚労科学研究費での旅費・会議費の援助を受けているが、その内容について国の関与はほとんどない。
- 国際対応の趣旨が理解されていない。

• 中国と韓国は国家としてISO/TC249に取り組んでいる。

TC249日本チームの活動に関して、国家としての対策へ

があります。国家として ISO/TC249 に取り組んでいる中国や韓国に比較しますと質量とも明らかに劣っています。

4. 中国の欧米の薬局方に対する戦略

ヨーロッパ薬局方 (EP) 6.0 (2008 年) の前書き (Table 11) に、EP の専門家が中国薬典 (Chinese Pharmacopoeia: CP) の専門家と有意義なコラボレーションをして最初のモノグラフが EP 6.0 に載ったことが書いています。

EP 7.0 (2011 年) における黄耆 (オウギ) の性状記載をここに示しますが、この記載は、CP 2010 と全く同じ文章になっています (Table 12)。EP は明らかに CP を写しています。これが CP と EP の関係です。他の生薬でもこのようなものができつつあると考えられます。

薬局方は、通常化学薬品などの場合、JP, EP, USP の 3 薬局方による PDG (Pharmacopoeial Discussion Group) において調和されますが、伝統医学の分野ではこの構図が成り立っていません。CP は EP に非常に影響を与えていますが、JP は EP に全く影響を与えていません。

また、CP と USP は CP と EP 以上に密接な関係で情報交換を行っています。アメリカでは TCM 製品は医薬品ではなく、DS ですので、現時点では、USP にはなじまないのかもしれませんが、アメリカも自主的な規格のみの DS として TCM 製品をそのまま放置しておくことはないと思います。CP の条文がそのまま EP に載ったような事態が、

いずれ USP にもおきる時代が来るのかもしれませんが。

このように中国は ISO における標準化以外にも、様々なところで自国の産品である TCM や生薬を世界に広げる活動を、手を替え品を替え行っています。我々は、ISO/TC249 はもちろんですが、その他のところでも、TCM の動向に注意を払っておく必要があると思います。

5. おわりに

最近の中国の新聞 (中国中医薬報 2013. 8. 2) に BRICs 諸国 (ブラジル, ロシア, インド, 南アフリカ) に中国の薬局方をそのまま入れてしまうという記事があり、その記事の最後には中医ライセンスをその国で認めさせるとも書いてありました。中国がこのように動いている現状があることもご理解いただきたいと思います。

6. 質疑応答

質問 1 ほかの医薬品と違って特殊な状況にあると思いますが、日本にとって切り札というようなものはないのでしょうか。

回答 切り札があったら、もう使っています。先ほど述

Table 11 生薬の記載に関し、中国薬局方 (CP) は欧州薬局方 (EP) に既に影響を与えている

European Pharmacopoeia 6.0 (2008)
I. PREFACE
During 2005, the EDQM* held a very useful symposium on traditional Chinese (and other ethnic) medicines, which was set up to consider the possibility of preparing quality standards to deal with such substances and to develop a new role for the European Pharmacopoeia in this area. Based on some very useful suggestions from the seminar, it was agreed that the two herbal medicinal products Groups of Experts (Group 13A and 13B) would be asked to prepare draft monograph based on the information that was already available in some Member States where national monographs on such substances were available or under preparation, and also <u>taking into consideration the very useful collaboration that had been established with the Chinese Pharmacopoeia authorities</u> . The first of these TCM monographs are published in the 6th Edition, and it is hoped that many more will follow to supplement the growing importance of regulation of such substances and the products on European market.

*EDQM: The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare

Table 12 黄耆 (オウギ) の性状記載

CP 2010
Astragali Radix (Milkvetch Root)
Description
Cylindrical, some branched, upper part relatively thick, 30-90 cm long, 1-3.5 cm in diameter. Externally pale brownish-yellow or pale brown, with irregular, longitudinal wrinkles or furrows. Texture hard and tenacious, uneasily broken, fracture highly fibrous and starchy, bark yellowish-white, wood pale yellow, with radiate striations and fissures, the centre part of old root occasionally rotten-wood shaped, blackish-brown or hollowed. Odour, weak; taste, slightly sweet and slightly bean-like on chewing.
EP 7.0 (2011)
Astragali Mongholici Radix (Astragalus Mongholicus Root)
IDENTIFICATION
A. Cylindrical, often with branches, upper part relatively thick, 30-90 cm long and 1-3.5cm in diameter. Externally pale brownish-yellow or pale brown, with irregular, longitudinal wrinkles or furrows. Texture hard and tenacious; uneasily broken, fracture highly fibrous and weakly (cultivated origin) or strongly starchy (wide origin), bark yellowish-white, wood pale yellow, with radiate striation and fissures; the central region in dark brown and in older roots may be broken down to form a hollow surrounded by fragments of disintegrating tissue.

べたように、ISO標準は、数回の投票で決まりますが、初期の投票ではTC249のメンバー国だけで投票がなされず、一方、後期の投票では、ISOの加盟国すべてが投票します。我々、TC249に参加している者の意見が通りやすいのは、初期の段階であると考えています。

日本ができることは、投票で賛成/反対することではなく、投票になる前のface to faceミーティングの場で「あなたが知っていることはおかしいでしょう」ということを中国だけでなく、欧米の方にもわかるように示すことです。この前の南アフリカ会議でもドイツの参加者がしきりにISOはコンセンサス会議であるといっていました。形としては投票をとっていますが、コンセンサスをとらなければ投票にいけないシステムになっています。したがって、我々ができることは、投票にかけるかどうかのコンセンサスをとるときに科学的に正しいことを言うということです。日本の都合だけをいっても通りません。アフリカのあなたの国でもこうなったほうが良いでしょう、ヨーロッパのあなたの国もこうなったほうが良いでしょうなどのいい方で、日局に影響を及ぼさないようにする努力をしています。今のところそのような方法しかありません。

[追記：その後の状況]

2013年9月に開催された第11回日本薬局方に関する説明会において、本稿の内容をお話しましたが、それから、1年近くの時間が経過しました。ここでは、本説明会以後、2014年7月までの状況について、簡単に追記します。

まず、2013年10月に北京において、WG1会議が開催されました。この際、懸念されていた生薬の重金属限度値に関する標準に関して、日本からの提案により、「限度値は、各国で決める」という文章を追加させることに成功しました。このままいけば、日本への大きな影響はなくなったと思います。なお、本提案は、2014年5月にCD-ballotを通過しました。

2013年12月には、韓国・ソウルにおいて、日本、韓国、インドの3カ国によりTC249にインド医学であるアユルベータを入れるかどうかに関する非公式会議が行われまし

た。その後、2014年1月に、TC249としてアユルベータに関する各国への調査及び意見聴取が行われましたが、アユルベータをTC249に入れるのには否定的な結果となりました。

また、同2013年12月に、WG5のTCM臨床用語、coding systemのPart 2からPart 4がNP-ballotを通過しました。

WG2では、2013年2月に電話会議を行い、その直後に、前述の3件の提案についてNP-ballotを行い、全て、通過しました。日本提案の「TCM製品(仮)の製造工程における一般的要求事項」は、日本の単独提案として、初めてのNPになったこととなります。

同月には、「人参の種と苗の標準」が最終のIS-ballotを通り、2014年4月に国際標準として発行されました。植物薬関係の初めての国際標準です。

2014年5月26～29日には、京都においてISO/TC249の第5回全体会議が、はじめて日本で開催されました。タイトル問題に関しては、アユルベータを入れるかどうかについての議論がありましたが(アユルベータを入れると、TCMというタイトルは成立しなくなる)、その場では結論は出ず、後日、TC内投票が行われることになりました。中国はスコープを教育サービスに広げることが提案しましたが、日独の反対で阻止できました。また、各WGにおいて、数々の新規提案がなされました。日本は、WG2において、TCM製品(仮)のラベル表示の標準化の提案を行いました。

2014年6月には、五味子の種と苗(中国、韓国共同提案)がNP-ballotを、Herbal decoction apparatus及びCoding system part 1がCD-ballotを通過しました。

最後になりますが、京都会議の2日前に、本会議を日本に誘致された元・TC249日本代表団長の鳥居塚和夫先生(昭和大学薬学部教授)がお亡くなりになりました。ISO/TC249活動による激務が少なからず影響を与えたと私は考えています。この場を借りまして、鳥居塚先生のISO/TC249に対する今までのご尽力に対し、改めて、敬意と感謝の念を表すものであります。



Journal Homepage:
www.jcimjournal.com/jim
www.elsevier.com/locate/issn/20954964
 Available also online at www.sciencedirect.com.
 Copyright © 2014, Journal of Integrative Medicine Editorial office.
 E-edition published by Elsevier (Singapore) Pte Ltd. All rights reserved.

● Research Article

Effect of Saikokeishito, a Kampo medicine, on hydrogen peroxide-induced premature senescence of normal human dermal fibroblasts

Takanobu Takata¹, Yoshiharu Motoo^{1,2}, Naohisa Tomosugi^{1,3}

1. Medical Research Institute of Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan

2. Department of Medical Oncology, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan

3. Department of Nephrology, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan

OBJECTIVE: Saikokeishito (TJ-10) is a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, clinically used for hundreds of years in East Asia. Among its various mechanisms elucidated so far, TJ-10 inhibits the production of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and development of pancreatic fibrosis *in vivo*. Oxidative damage of normal human dermal fibroblasts (NHDFs) in the corium is a cause of human dermal senescence. Our aim was to determine whether TJ-10 protects NHDFs from premature senescence by hydrogen peroxide (H₂O₂).

METHODS: Premature senescence was induced in NHDFs by 200 μ mol/L H₂O₂ for 4 h. Cell viability and the expressions of p53, AMP-activated protein kinase α 1 (AMPK α 1), AMPK α 2, and 14-3-3 protein sigma (14-3-3 σ) were measured in NHDFs treated with TJ-10 for 48 h before exposure to H₂O₂ for 4 h.

RESULTS: Cell viability after treatment with 200 μ mol/L H₂O₂ for 4 h was similar (about 80%) to after pre-treatment with TJ-10. Ascorbic acid as a control did not protect NHDFs from damage by 200 μ mol/L H₂O₂. Treatment with 200 μ mol/L H₂O₂ tended to up-regulate p53 and to down-regulate SIRT1 and AMPK α 1, but had no effect on AMPK α 2 and 14-3-3 σ expression. Pretreatment with TJ-10 inhibited H₂O₂-induced up-regulation of p53 and enhanced AMPK α 1 expression.

CONCLUSION: It is suggested that Saikokeishito has a protective effect on oxidative stress-induced senescence of NHDFs.

KEYWORDS: Saikokeishito; medicine, Kampo; premature senescence; p53; fibroblasts

[http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4964\(14\)60052-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60052-2)

Takata T, Motoo Y, Tomosugi N. Effect of Saikokeishito, a Kampo medicine, on hydrogen peroxide-induced premature senescence of normal human dermal fibroblasts. *J Integr Med*. 2014; 12(6): 495–503.

Received March 27, 2014; accepted July 18, 2014.

Correspondence: Yoshiharu Motoo, MD, PhD, Professor; Tel: +81-76-8284; E-mail: motoo@kanazawa-med.ac.jp

1 Introduction

Saikokeishito (TJ-10; ref: KCONSORT <http://kconsort.umin.jp>) is one of the most popular Kampo medicines. TJ-10 has been used for hundreds of years and is mainly against acute infectious diseases. It contains *Radix Bupleuri* (Saiko), *Tuber Pinelliae* (Hange), *Radix Glycyrrhizae* (Kanzo),

Radix Ginseng (Ninjin), *Radix Scutellariae* (Ogon), *Corex Cinnamomi* (Keihi), *Radix Paenoniae* (Shakuyaku), *Fructus Zizphi* (Taiso), and *Rhizoma Zingiberis* (Syokyo)^[1], and is also used for chronic pancreatitis, covered by health insurance in Japan. Previously, we reported that TJ-10 suppressed the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and other mediators, elucidating its anti-inflammatory, anti-fibrotic, anti-apoptotic, and



antioxidative properties in pancreatic tissues of chronic pancreatitis model rats (WBN/Kob rats)¹¹. TJ-10 delayed the onset of chronic pancreatitis, and also suppressed the expression of pancreatitis-associated protein (PAP)²¹.

Although there are various mechanisms in dermal senescence, the main cause is oxidative stress³⁻⁵. *In vitro*, reactive oxygen species induce the expression of senescence-associated proteins (including p53) in cytoplasm. There is no obvious morphological change. This phenomenon is called 'premature senescence'^{16,7}.

In these studies, premature senescence of normal human dermal fibroblasts (NHDFs) was induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). Substances that control the expressions of senescence-associated proteins in NHDFs have been previously assessed¹⁸. The expressions of senescence-associated proteins are mutually regulated. A decreased expression of AMP-activated protein kinase (AMPK) has been shown to increase the expression and phosphorylation of p53¹⁹. Moreover, the expression of silent information regulator T1 (SIRT1) is required for activation of AMPK¹¹⁰. SIRT1 inhibits TGF-induced renal fibrosis in rats via deacetylation of mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3)¹¹¹. SIRT1 also inhibits TGF-induced apoptosis via degradation of Smad7 in glomerular mesangial cells¹¹². The tumor suppressor protein p53 is deacetylated (inactivated) by SIRT1^{113,14}. The 14-3-3 protein sigma (14-3-3 σ) is a well-known downstream target of p53. Activation of p53 leads to the up-regulation of 14-3-3 σ ¹¹⁵, while 14-3-3 σ stabilizes p53¹¹⁶.

TGF- β 1 is associated with fibrosis, senescence and apoptosis^{117,18}. Crosstalk between TGF- β 1 and p53 affects apoptosis¹¹⁹. Oxidative stress induces changes in the expressions of AMPK, SIRT1, p53, 14-3-3 σ and TGF- β 1.

In this study, we investigated the effects of TJ-10 on premature senescence in NHDFs by analyzing changes in the expressions of above mentioned proteins. Ascorbic acid was used as a control.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and samples

NHDFs (CC-2511) were obtained from Takara Bio Inc. (Otsu, Japan). The TACS MTT Cell Proliferation Assay Kit (catalog# 4890-25-K; Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) was used to measure cell growth. This assay kit contained "Reagent A (catalog: 4890-25-01)" and "Reagent B (catalog: 4890-25-02)". The FGM-2 Bullet Kit (CC-3132; Takara Bio Inc.) was used for incubation of NHDFs, and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin was used during the 'pretreatment period'.

H₂O₂ solution (30% w/v) was obtained from Waco Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). TJ-10 was obtained from Tsumura & Co. (Tokyo, Japan). Primary antibodies including anti-p53 (ab26), anti-14-3-3 σ (ab87209), anti-SIRT1 (ab110304), anti-AMPK α 1 (ab110036), and anti-AMPK α 2 (ab3760) were purchased from Abcam Plc (Cambridge, UK). Secondary antibodies were obtained from Thermo Scientific (Yokohama, Japan), including goat anti-mouse IgG (H+L), min x HnBvHs Sr Prot, peroxidase conjugated (product number: 31432) and donkey anti-rabbit IgG H+L, min x v ChGtGuHaHs-HnMsRtSh Sr Prot, peroxidase conjugated (product number: 31458).

2.2 Cell culture

NHDFs were maintained in FGM-2 medium with 2.0% FCS, 0.05% human fibroblast growth factor (hFGF), and 0.05% insulin (FGM-2 Bullet Kit [CC-3132]). For the present experiments, the cell passage number was not more than 5, and the doubling time was within 10 d.

2.3 Saikokeishito and ascorbic acid samples for assay

TJ-10 (10 g) was dissolved in serum free DMEM (35.2 mL) and sterilized¹²⁰. After sterilization, FCS (4.0 mL, final 10%), 200 mmol/L glutamine (400 μ L, final 2.0 mmol/L), penicillin and streptomycin solution (400 μ L, final 100 U/mL and 100 mg/mL) were added to make Pre-TJ-10-DMEM (250 mg/mL of TJ-10). Separately, sterilized DMEM (88 mL) was supplemented with FCS (10 mL, final 10%), 200 mmol/L glutamine (1.0 mL, final 2.0 mmol/L), penicillin, and streptomycin solution (1.0 mL, final 100 U/mL and 100 mg/mL). Each concentration of pre-TJ-10-DMEM (125, 60, 30, 15, 5, 2.5, 1.0, 0.5, and 0.1 mg/mL) were prepared by dilution of pre-TJ-10-DMEM (250 mg/mL of TJ-10) with the sterilized DMEM. Last, all samples of pre-TJ-10-DMEM were centrifuged (7 000 \times g, 10 min), and the supernatants were named as TJ-10-DMEM¹²¹.

Ascorbic acid was dissolved in sterilized DMEM to final concentrations of 100 and 200 μ mol/L. Then, the solution was filtered (pore size: 0.22 μ m)¹²²⁻²⁴.

2.4 MTT assay

NHDFs (4.2 \times 10³ cells/well) were cultured in 96-well microplates. This cell number was calculated based on the standard number of cells seeded in a 75-cm² culture flask (1.0 \times 10⁵ NHDFs)¹⁸. The area at the bottom of one well of a 96-well plate is 0.31 cm². These cells were maintained in FGM-2 medium.

After 72 h, the medium was removed and replaced after washing the cells with phosphate-buffer saline (PBS) three times. Reagent A (10 μ L) was added to the medium and the cells were incubated at 37 °C for 4 h; reagent B (100 μ L) was added to the medium and the cells were incubated for 16 h at room temperature (in the dark). The absorbance (ABS) at 570 nm minus the ABS at 650 nm

(the absorbance of impurities) was calculated and used to determine the cell number from a standard curve. The percent viability of cells exposed to H₂O₂ was measured relative to a control (100%).

2.5 H₂O₂ exposure and preparation of cell lysate

NHDFs (2.9×10^5) were cultured in 60-mm dishes (area of the base: 21.5 cm²; medium volume: 5.0 mL; 2.9×10^5 NHDFs, calculated from the number of cells per unit area on the bottom of the dish). After culture of the cells in FGM-2 medium for 72 h, the medium was changed to serum free DMEM, and 14.2 μ L of H₂O₂ solution diluted in PBS (final concentration: 0, 100, 150, 200, and 250 μ mol/L) was added. After H₂O₂ exposure for 4 h, cells were washed three times in PBS and solubilized in 25 mmol/L-Tris HCl containing EDTA-free protease inhibitor cocktail, 150 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium lauryl sulfate (SLS). The solution was sonicated for 20 min and centrifuged (10 000 \times g, 10 min) to collect the supernatant (cell lysate). Protein concentration was measured using the bicinchoninic acid (BCA) method.

2.6 Analysis of the effects of TJ-10 and ascorbic acid

NHDFs (4.2×10^3 cells/well) were seeded, cultured in 96-well microplates (area of each well, 0.31 cm²; medium volume, 100 μ L), and maintained in autoclaved DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin for 72 h before MTT assay. For the assay, NHDFs were incubated in sterilized DMEM, washed with PBS (3 times), and incubated with DMEM containing ascorbic acid or TJ-10-DMEM (125, 60, 30, 15, 5, 2.5, 1.0, 0.5, and 0.1 mg/mL) for 48 h. The medium was changed, cells were washed, and the medium was replaced with serum-free DMEM. MTT assay was performed according to the same protocol above (2.4).

Effect of pretreatment with TJ-10 or ascorbic acid: NHDFs (4.2×10^3 cells/well) were seeded and cultured before the MTT assay (as described above). NHDFs were incubated with autoclaved DMEM for 24 h, washed with PBS, pretreated with autoclaved DMEM containing ascorbic acid or TJ-10-DMEM (125, 60, 30, 15, 5, 2.5, 1.0, 0.5, and 0.1 mg/mL) for 48 h, and washed with PBS (3 times). Serum-free DMEM was added followed by H₂O₂ (in 2.8 μ L of PBS; final concentration, 200 μ mol/L). After 4 h of incubation, the medium was changed, and the cells were washed with PBS (3 times), and the MTT assay was performed.

2.7 Preparation of cell lysate after pretreatment with TJ-10 or ascorbic acid

NHDFs (2.9×10^5) were seeded, cultured in 60-mm dishes (area of the base: 21.5 cm²; medium volume: 5.0 mL), and maintained in autoclaved DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL

penicillin, and 100 mg/mL streptomycin for 48 h. Then, the medium was removed, and the cells were washed with PBS three times and incubated with various amounts of TJ-10-DMEM or ascorbic acid (200 μ mol/L) in autoclaved DMEM for 48 h. Cell lysates were prepared as described above and protein concentrations were measured as described above.

2.8 Western blot analysis

Protein concentrations were determined by the Bradford assay using bovine serum albumin as a standard (Protein Assay kit; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Lysates (12.5 μ g protein/lysate) were mixed with SDS sample buffer (6.25 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue) and resolved by SDS-PAGE on 10%–20% gradient polyacrylamide gels. Proteins were detected immunologically following semidry electrotransfer (Trans-Blot SD semidry electrotransfer system, Bio-Rad) onto PVDF membranes (Millipore). The membranes were treated with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with Tween 100 for 20 min at room temperature to block nonspecific immunoglobulin binding, incubated with primary antibodies including anti-p53 (1:500, mouse monoclonal antibody), anti-14-3-3 σ (1:1 000, rabbit polyclonal antibody), anti-SIRT1 (1:1 000, mouse monoclonal antibody), anti-AMPK α 1 (1:1 000, mouse monoclonal antibody), anti-AMPK α 2 (1:1 000, rabbit polyclonal antibody), and anti-actin (1:1 000, mouse monoclonal antibody) for 2 h at room temperature, washed three times with 0.5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with Tween 100, incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody to mouse immunoglobulin (diluted 1:1 000) and to rabbit immunoglobulin (diluted 1:5 000) for 2 h at room temperature, and incubated using the HRP-DAB detection kit (Wako) to visualize the bands. Band densities were measured using the LAS-4000 fluorescence imager (Fujifilm, Tokyo, Japan) and expressed in arbitrary units.

2.9 Statistical analysis

Stat Flex (ver. 6) software was used for statistical analysis of the cytotoxicity and protein expression. Data are expressed as mean \pm standard deviation. The significance of difference in mean cell viability between groups was determined by one-way analysis of variance. Then we used the Dunnett's *t*-test for analysis of variance. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3 Results

3.1 Premature senescence induced by H₂O₂ and analysis of cell viability

We investigated the effects of H₂O₂ on NHDF viability (used here as an index of premature senescence). H₂O₂ (final concentration: 100, 150, 200, and 250 μ mol/L)

was added to the media of NHDFs in 96-well plates (4.2×10^3 cells/well) and the cells were incubated for 4 h. Cytotoxicity was detected throughout the concentration range, but viability remained above 80% (Figure 1).

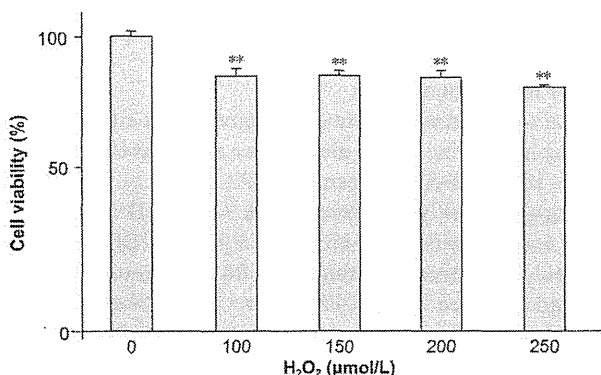


Figure 1 Premature senescence induced by hydrogen peroxide and analysis of cell viability
The MTT assay was done in 8 wells. Data are presented as mean \pm standard deviation, $n=8$, ** $P < 0.01$, vs control.

3.2 Effects of H₂O₂ on the expressions of senescence-associated proteins

Senescence-associated proteins were assayed. Cell lysates of NHDFs in 60-mm dishes (2.9×10^5 cells/dish) were obtained after exposure of the cells to 100–250 μmol/L H₂O₂. When lysates from cells exposed to 200 μmol/L H₂O₂ for 4 h were analyzed for p53, 14-3-3 σ, SIRT1, AMPKα1, AMPKα2, and β-actin expressions (Figure 2), p53 expression increased to about 120%–140% of the

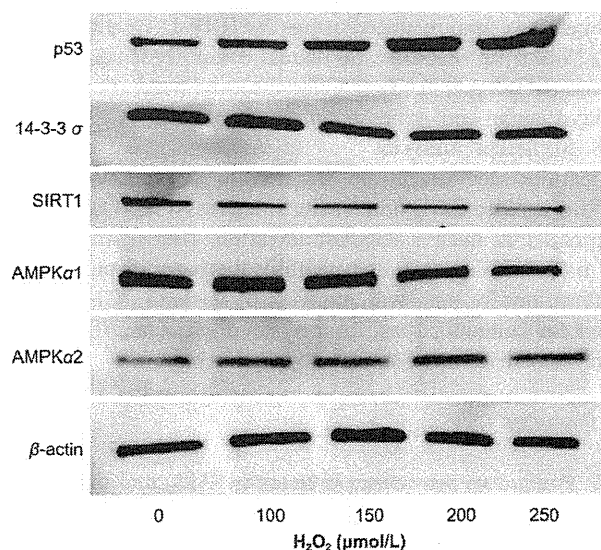


Figure 2 Western blot analysis on the effects of H₂O₂ on the expressions of senescence-associated proteins

baseline level, SIRT1 and AMPKα1 expression decreased to 60%–70% of the baseline level, but 14-3-3 σ and AMPKα2 expression remained unchanged (Figure 3).

3.3 Cell viability of NHDFs treated with ascorbic acid and TJ-10

Then, we investigated whether pretreatment with TJ-10-DMEM or ascorbic acid DMEM protected NHDFs from 200 μmol/L H₂O₂ exposure (TJ-10-DMEM was labeled as “TJ-10”, and the sterilized DMEM containing ascorbic acid was labeled “ascorbic acid”). Before testing the anti-senescence effect of TJ-10 and ascorbic acid, the MTT method was used to determine the viability of TJ-10-treated and ascorbic acid-treated NHDFs. The treated NHDFs were incubated 72 h before MTT assay. At 100 and 200 μmol/L, ascorbic acid was not cytotoxic. On the other hand, at more than 2.5 mg/mL, TJ-10 was very cytotoxic. Therefore, viability of NHDFs treated with 0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL of TJ-10 was indicated (Figure 4). Viability at 0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL of TJ-10 was 90% to 95% without significant difference between concentrations.

3.4 Cell viability of NHDFs treated with ascorbic acid and TJ-10 before H₂O₂ exposure

We investigated the viability of NHDFs pretreated with ascorbic acid (200 μmol/L) and TJ-10 (0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL) for 48 h. The medium was removed and the cells were washed with PBS and treated with serum-free medium containing 200 μmol/L H₂O₂ (final concentration). The MTT assay confirmed that ascorbic acid (200 μmol/L) and TJ-10-DMEM (0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL) had no toxicity on cell viability, which remained at the control level (Figure 4), and pretreatment with TJ-10 at only 0.1 mg/mL protected NHDFs against H₂O₂ stress (Figure 5).

3.5 Effects of ascorbic acid and TJ-10 on H₂O₂ stress-induced changes in the expressions of senescence-associated proteins

We investigated the effects of TJ-10 and ascorbic acid on premature senescence markers such as p53, SIRT1 and AMPKα1. NHDFs were pretreated with TJ-10 and ascorbic acid for 48 h, incubated with serum-free DMEM containing H₂O₂ (final concentration 200 μmol/L) for 4 h, and lysed as above. The markers were assayed by Western blotting (Figure 6). Though ascorbic acid could not inhibit the expression of p53, TJ-10 (0.5 and 1.0 μg/mL) indicated the inhibition of p53 (Figure 7).

Pretreatment with ascorbic acid and TJ-10 (0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL) up-regulated AMPKα1 expression that was inhibited by H₂O₂ exposure (Figure 7). TJ-10 when compared with the control (H₂O₂ exposure alone) was especially effective. It significantly increased AMPKα1 expression of H₂O₂-treated cells by 60%–70%. On the other hand, neither ascorbic acid nor TJ-10 pre-treatment affected SIRT1 expression (Figure 7).

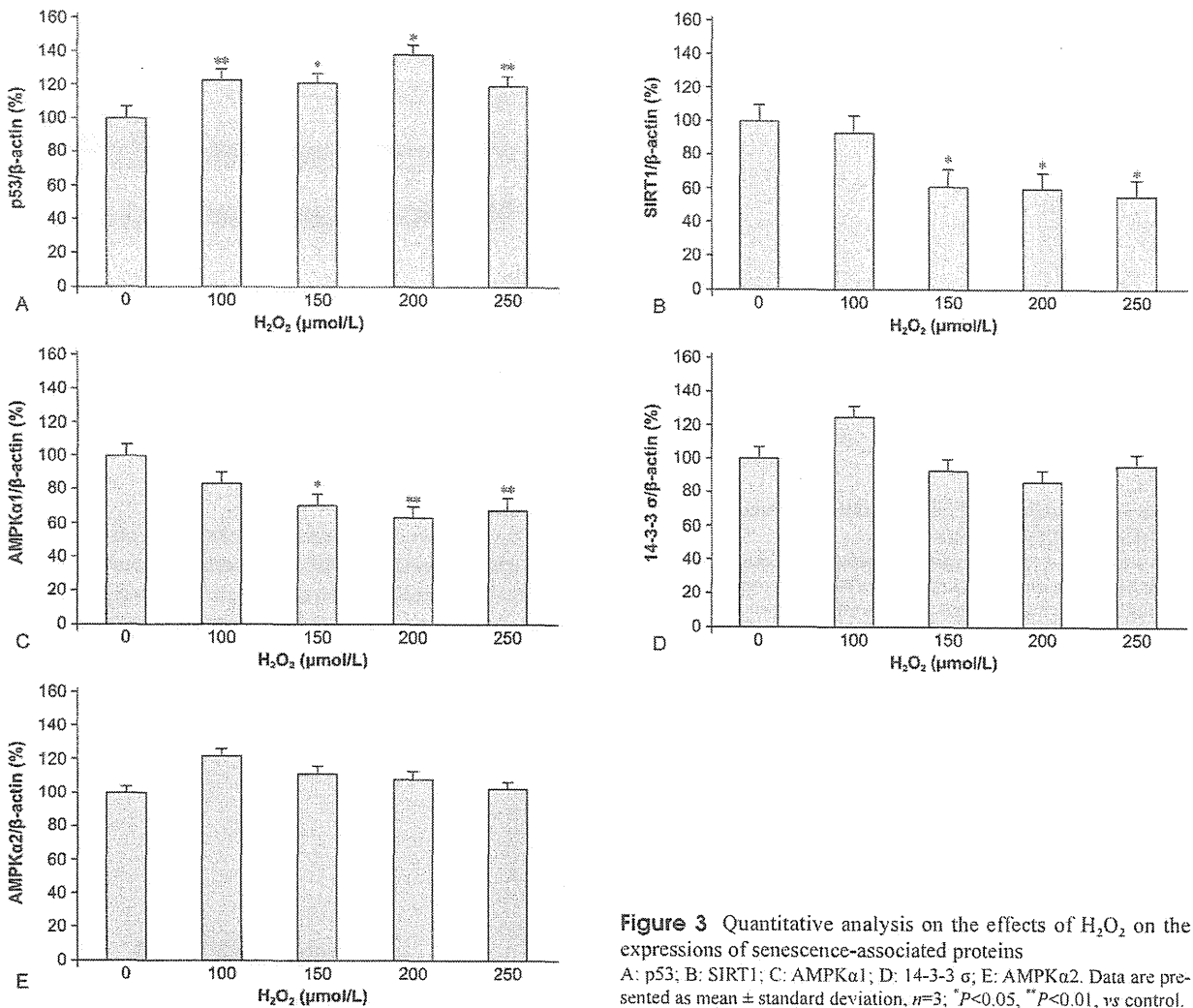


Figure 3 Quantitative analysis on the effects of H₂O₂ on the expressions of senescence-associated proteins A: p53; B: SIRT1; C: AMPKα1; D: 14-3-3 σ; E: AMPKα2. Data are presented as mean ± standard deviation, n=3; *P<0.05, **P<0.01, vs control.

4 Discussion

First, we confirmed that H₂O₂ induces premature senescence of NHDFs. More than 80% of NHDFs survived after exposure to 100–250 μmol/L H₂O₂. In the previous study on premature senescence in keratinocytes, the selected concentration of H₂O₂ was 50 μmol/L^[9]. This difference may be due to a difference in the resistance of cell types to H₂O₂ damage.

We cannot confirm that there is a difference in morphology between normal mature cells and senescent cells after treatment with H₂O₂ for 4 h. Although a previous study determined the p53 expression in NHDFs treated with 150 μmol/L H₂O₂ for 4 h^[8] and cell viability of NHDFs treated with 250 μmol/L H₂O₂ for 24 h^[8], the authors did not address changes in morphology therein. An observation of cells after 24 or 48 h of H₂O₂ exposure might reveal a

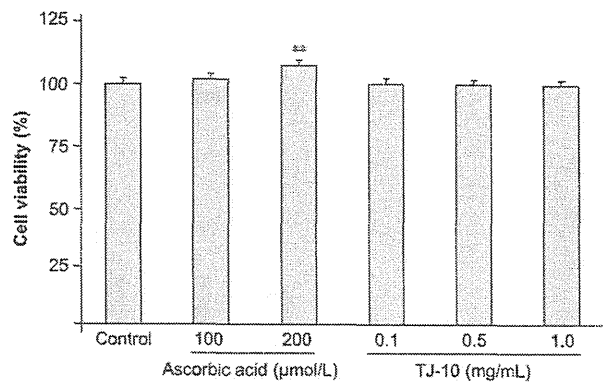


Figure 4 Cell viability of NHDFs treated with ascorbic acid and TJ-10 Cells were incubated for 24 h and the medium was changed to new medium containing ascorbic acid or TJ-10. Then cells were incubated for 48 h. The MTT assay was done in 8 wells. Data are presented as mean ± standard deviation, n=8; **P<0.01, vs control.

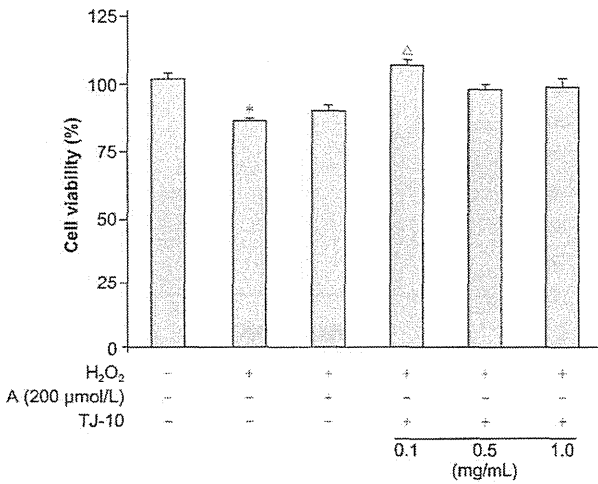


Figure 5 Cell viability of NHDFs treated with ascorbic acid and TJ-10 before H₂O₂ exposure. Cells were incubated for 24 h and the medium was changed to new medium containing ascorbic acid or TJ-10. Then, cells were incubated for 48 h, the medium was changed to serum-free medium, and the cells were exposed to 200 μmol/L H₂O₂ stress. 'A' indicates ascorbic acid. The MTT assay was done in 8 wells. Data are presented as mean ± standard deviation, n=8; *P<0.05, vs blank control; [△]P<0.05, vs H₂O₂ control.

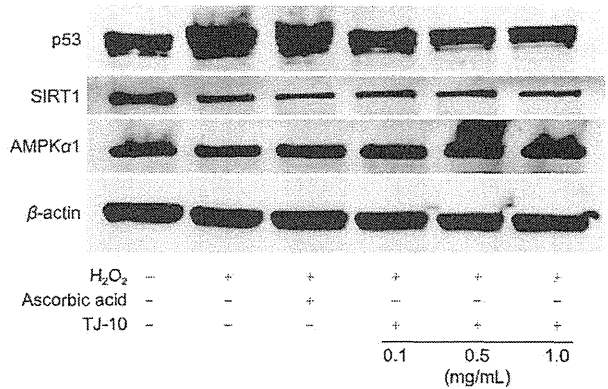


Figure 6 Effects of ascorbic acid and TJ-10 on H₂O₂ stress-induced changes in the expressions of senescence-associated proteins

morphological difference.

In this study, we researched the expression of the proteins that associated with the premature senescence under 100–250 μmol/L H₂O₂ exposure. The up-regulation or down-regulation of proteins did not indicate the dose dependence of H₂O₂. The expression of p53 was the maximum at a dose of 200 μmol/L of H₂O₂ exposure, and

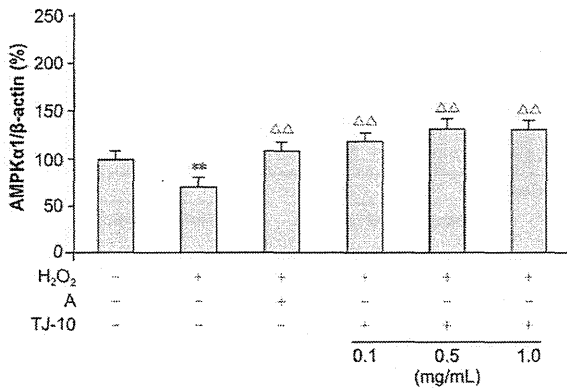
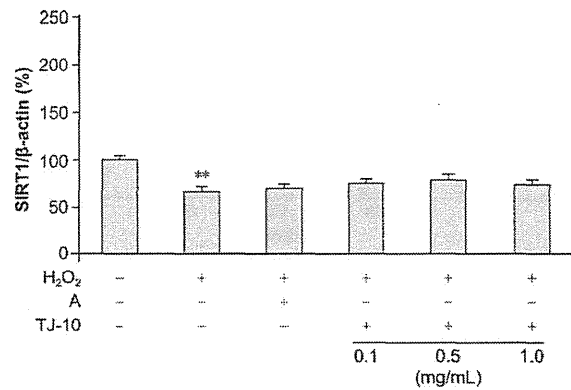
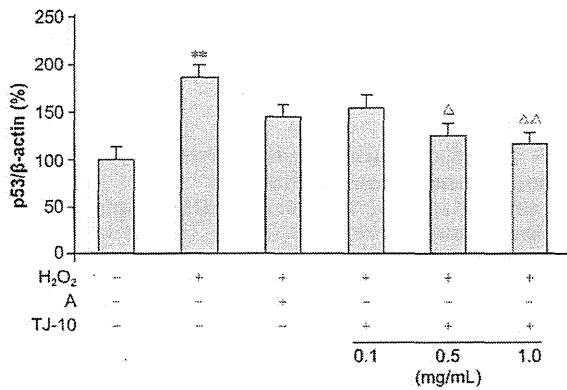


Figure 7 Effects of ascorbic acid and TJ-10 on H₂O₂-induced changes in the expression of p53, SIRT1, and AMPKα1. Cells were incubated for 48 h and the medium was changed. Then cells were exposed to 200 μmol/L H₂O₂ for 4 h. 'A' indicates ascorbic acid at 200 μmol/L. The data are presented as mean ± standard deviation, n=3; **P<0.01, vs blank control; [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01, vs H₂O₂ control.

the up-regulation was 38% (Figure 3A). Levels of p53 are elevated in premature senescent cells¹⁸¹. It has been reported that p53 induces 14-3-3 σ expression and 14-3-3 σ activates p53^{115,251}. Therefore, we predicted that up-regulation of p53 would be associated with 14-3-3 σ . However, the exposure to H₂O₂ did not up-regulate 14-3-3 σ expression. In H₂O₂-induced senescence, p53 might be induced by some other pathways. Also, 14-3-3 σ induction might need more than 4 h exposure to induce p53.

Crosstalk between p53 and TGF- β 1 has been reported¹⁹¹. Wild-type p53 and TGF- β 1 are key tumor suppressors which regulate an array of cellular responses. TGF- β 1 acts in part via the Smad3 signal transcription pathway. Wild-type p53 and Smads interact and coordinately induce transcription of a number of key tumor suppressive genes. So p53 might support the role of TGF- β 1.

Treatment with H₂O₂ (200 μ mol/L) decreased the expression of SIRT1 and AMPK α 1. The down-regulation of AMPK α 1 may induce the suppression of SIRT1. TGF- β 1 induces renal fibrosis in rats via deacetylation of Smad3¹¹¹. SIRT1 inhibits TGF- β 1-induced apoptosis via degradation of Smad7 in glomerular mesangial cells¹¹². Down-regulation of SIRT1 cannot protect NHDFs from TGF- β 1-induced fibrosis. Also, SIRT1 binds and deacetylates p53^{113,114}. In this study, up-regulation of p53 and down-regulation of SIRT1 indicated that SIRT1 protects p53. As a result, SIRT1 acts as an anti-senescence protein. We thought that one of the reasons for premature senescence was reduction of SIRT1. On the other hand, AMPK is upstream of the SIRT pathway¹⁰¹. SIRT1 is required for AMPK activation. The down-regulation of AMPK may induce down-regulation of SIRT1 and up-regulation of p53. AMPK inhibits TGF- β -induced fibrosis¹²⁶. However, there is no evidence that AMPK directly inhibits TGF- β expression or activation of TGF- β . AMPK α 1 and AMPK α 2 belong to the AMPK family of kinases. H₂O₂ stress has different effects on expression of AMPK α 1 and AMPK α 2. In keratinocytes, AMPK α 2 is resistant to 50 μ mol/L H₂O₂ and AMPK α 1 is down-regulated⁹¹. The function of AMPK α 2 may be to respond to low oxidative stress. AMPK α 1 knockdown with shAMPK RNA induces the up-regulation of p53 and increases SA- β -Gal activity¹⁹¹. However, the role of AMPK α 2 in anti-senescence has not been investigated.

TGF- β 1 is known to induce fibrosis in the pancreas and other organs^{2,271}. Furthermore, TJ-10 inhibits fibrosis and TGF- β 1 expression in the pancreas *in vivo*²¹. We hypothesized that TJ-10 inhibits premature senescence, and one of its abilities is to inhibit TGF- β 1-induced fibrosis.

H₂O₂ induces expression of TGF- β 1 and TGF- β 2 in retinal pigment epithelial cells and secretion into conditioned medium where the secreted TGF- β 1 and TGF- β 2 might induce cellular senescence¹²⁸. Moreover, TGF- β 1 is increased in the human diploid fibroblasts and induces

cellular senescence¹²⁹. However, in both investigations, the interval between TGF- β 1 or TGF- β 2 measurement and H₂O₂ exposure was long. The protein and mRNA expressions of TGF- β 1 or TGF- β 2 were measured 12, 24, 48, or 72 h from H₂O₂ exposure. Moreover, other researchers have measured 'secreted TGF- β 1 and TGF- β 2' because of the possibility that the simultaneous attachment of both to the TGF- β receptor on the cell surface is necessary for activity. In this study, TGF- β 1 might not induce the premature senescence directly because the time of H₂O₂ exposure was too short.

If TJ-10 is a candidate of anti-senescence herbal medicine, its safety should be confirmed. Indeed, pretreatment with TJ-10 inhibited up-regulation of p53 and down-regulation of AMPK α 1 in NHDFs exposed to H₂O₂. Direct suppression of TGF- β 1 and p53 by AMPK α 1 has not been reported, but these three proteins may interact in the cellular senescence pathway. Though the AMPK α 1 gene is upstream of the SIRT1 gene, TJ-10 did not alter the effect of H₂O₂ exposure on AMPK α 1 expression. Though AMPK α 1 was up-regulated by TJ-10 pretreatment, premature senescence reduced the expression of SIRT1. Because the expression of SIRT1 requires phosphorylation of AMPK α 1¹¹⁰, the level of phosphorylated AMPK α 1 induced by TJ-10 may be low. Other proteins may also be needed for SIRT1 expression.

AMPK α 2 was not down-regulated or up-regulated by H₂O₂ exposure before TJ-10 treatment. So no relationship between AMPK α 2 and premature senescence was shown. TJ-10 down-regulated p53 and up-regulated AMPK α 1 but had no effect on SIRT1 and AMPK α 2. Also, ascorbic acid pretreatment (the positive control for anti-oxidative stress and anti-premature senescence) did not protect against damage by 200 μ mol/L H₂O₂, and NHDF viability decreased. However, pretreatment with 0.1 mg/mL of TJ-10 (but not 0.5 and 1.0 mg/mL of TJ-10) did protect NHDFs against stress induced by exposure to 200 μ mol/L H₂O₂ (Figure 5). Possible stress induced by 0.5 and 1.0 mg/mL of TJ-10 might account for our inability to detect NHDF protection at these higher TJ-10 concentrations under the conditions of the experiment. We used the MTT method to measure cell survival. The MTT method measures mitochondrial enzyme activity. The activation and expression of AMPK α 1 depend on the mitochondria³⁰⁻³³. Up-regulation of AMPK α 1 might account for TJ-10 treatment-induced protection of cells against premature senescence (H₂O₂ exposure for 4 h).

These results suggest that Saikokeishito has a protective effect on oxidative stress-induced senescence of NHDFs.

5 Acknowledgements

This work was supported by the Grant for Research Promotion from Kanazawa Medical University (S2011-11).



6 Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

- Motoo Y, Xie MJ, Su SB, Sawabu N. Molecular mechanisms of therapeutic effects of Saikokeishito on spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *J Tradit Med.* 2003; 20(4): 143–149.
- Motoo Y, Su SB, Xie MJ, Taga H, Sawabu N. Effect of herbal medicine Saiko-keishi-to (TJ-10) on rat spontaneous chronic pancreatitis: comparison with other herbal medicines. *Int J Pancreatol.* 2000; 27(2): 123–129.
- Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation — a review. *Int J Cosmet Sci.* 2005; 27(1): 17–34.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med.* 1987; 107(4): 526–545.
- Rai P, Onder TT, Young JJ, McFaline JL, Pang B, Dedon PC, Weinberg RA. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(1): 169–174.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585–621.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(20): 9363–9367.
- Taniguchi M, Arai N, Kohno K, Ushio S, Fukuda S. Anti-oxidative and anti-aging activities of 2-O- α -glucopyranosyl-L-ascorbic acid on human dermal fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2012; 674(2–3): 126–131.
- Ido Y, Duranton A, Lan F, Cacicedo JM, Chen TC, Breton L, Ruderman NB. Acute activation of AMP-activated protein kinase prevents H₂O₂-induced premature senescence in primary human keratinocytes. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35092.
- Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* 2012; 15(5): 675–690.
- Li J, Qu X, Ricardo SD, Bertram JF, Nikolic-Paterson DJ. Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney: potential role in deacetylation of Smad3. *Am J Pathol.* 2010; 177(3): 1065–1071.
- Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isshiki K, Isono M, Uzu T, Guarente L, Kashiwagi A, Koya D. SIRT1 inhibits transforming growth factor β -induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem.* 2007; 282(1): 151–158.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004; 303(5666): 2011–2015.
- Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 2002; 21(10): 2383–2396.
- Mhawech P, Greloz V, Assaly M, Herrmann F. Immunohistochemical expression of 14-3-3 σ protein in human urological and gynecological tumors using a multi-tumor microarray analysis. *Pathol Int.* 2005; 55(2): 77–82.
- Rajagopalan S, Sade RS, Townsley FM, Fersht AR. Mechanistic differences in the transcriptional activation of p53 by 14-3-3 isoforms. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(3): 893–906.
- Yu AL, Fuchshofer R, Kook D, Kampik A, Bloemendal H, Welge-Lüssen U. Subtoxic oxidative stress induces senescence in retinal pigment epithelial cells via TGF- β release. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(2): 926–935.
- Yasuda K, Aoshiba K, Nagai A. Transforming growth factor- β promotes fibroblast apoptosis induced by H₂O₂. *Exp Lung Res.* 2003; 29(3): 123–134.
- Elston R, Inman GJ. Crosstalk between p53 and TGF- β signalling. *J Signal Transduct.* 2012; 2012: 294097.
- Kubota A, Okamura S, Shimoda K, Harada N, Omori F, Niho Y. A traditional Chinese herbal medicine, Juzen-Taiho-To, augments the production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor from human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Int J Immunother.* 1992; 8(4): 191–195.
- Ito K, Satoh T, Watanabe Y, Ikarashi N, Asano T, Morita T, Sugiyama K. Effects of Kampo medicines on CYP and P-gp activity *in vitro*. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(5): 893–896.
- Yasui T, Matsuzaki T, Ogata R, Kiyokawa M, Ushigoe K, Uemura H, Kuwahara A, Ikawa H, Maegawa M, Furumoto H, Aono T, Irahara M. The herbal medicine Unkei-to stimulates the secretion of a cytokine-induced neutrophil chemoattractant, CINC/gro, in the rat ovarian cell culture. *Am J Reprod Immunol.* 2003; 49(1): 14–20.
- Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M. The herbal medicine sho-saikoto inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G₀/G₁ phase. *Cancer Res.* 1994; 54(2): 448–454.
- Ando H, Asanuma Y, Sato Y, Koyama K. The effect of TJ-9, TJ-41, and TJ-114 against the proliferation of HepG2. *Kanzo.* 1995; 36(3): 171–172. Japanese.
- Kirschner M, Montazem A, Hilaire HS, Radu A. Long-term culture of human gingival keratinocyte progenitor cells by down-regulation of 14-3-3 σ . *Stem Cells Dev.* 2006; 15(4): 556–565.
- Lim JY, Oh MA, Kim WH, Sohn HY, Park SI. AMP-activated protein kinase inhibits TGF- β -induced fibrogenic responses of hepatic stellate cells by targeting transcriptional coactivator p300. *J Cell Physiol.* 2012; 227(3): 1081–1089.
- Kim KH, Park GT, Lim YB, Rue SW, Jung JC, Sonn JK, Bae YS, Park JW, Lee YS. Expression of connective tissue

- growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor- β -mediated signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 318(4): 819–825.
- 28 Yu AL, Fuchshofer R, Kook D, Kampik A, Bloemendal H, Welge-Lüssen U. Subtoxic oxidative stress induces senescence in retinal pigment epithelial cells via TGF- β release. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(2): 926–935.
- 29 Frippiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor- β 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001; 276(4): 2531–2537.
- 30 Jiang S, Park DW, Stigler WS, Creighton J, Ravi S, Darley-Usmar V, Zmijewski JW. Mitochondria and AMP-activated protein kinase-dependent mechanism of efferocytosis. *J Biol Chem.* 2013; 288(36): 26013–26026.
- 31 Hu R, Yan H, Hao X, Liu H, Wu J, Shizukaol D isolated from *Chloranthus japonicas* inhibits AMPK-dependent lipid content in hepatic cells by inducing mitochondrial dysfunction. *PLoS One.* 2013; 8(8): e73527.
- 32 Dugan LL, You YH, Ali SS, Diamond-Stanic M, Miyamoto S, DeClevés AE, Andreyev A, Quach T, Ly S, Shekhtman G, Nguyen W, Chepetan A, Le TP, Wang L, Xu M, Paik KP, Fogo A, Viollet B, Murphy A, Brosius F, Naviaux RK, Sharma K. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *J Clin Invest.* 2013; 123(11): 4888–4899.
- 33 Filomeni G, Piccirillo S, Graziani I, Cardaci S, Da Costa Ferreira AM, Rotilio G, Ciriolo MR. The isatin-Schiff base copper(II) complex Cu(isaepy), acts as delocalized lipophilic cation, yields widespread mitochondrial oxidative damage and induces AMP-activated protein kinase-dependent apoptosis. *Carcinogenesis.* 2009; 30(7): 1115–1124.



Submission Guide

Journal of Integrative Medicine (JIM) is an international, peer-reviewed, PubMed-indexed journal, publishing papers on all aspects of integrative medicine, such as acupuncture and traditional Chinese medicine, Ayurvedic medicine, herbal medicine, homeopathy, nutrition, chiropractic, mind-body medicine, Taichi, Qigong, meditation, and any other modalities of complementary and alternative medicine (CAM). Article

types include reviews, systematic reviews and meta-analyses, randomized controlled and pragmatic trials, translational and patient-centered effectiveness outcome studies, case series and reports, clinical trial protocols, preclinical and basic science studies, papers on methodology and CAM history or education, editorials, global views, commentaries, short communications, book reviews, conference proceedings, and letters to the editor.

- No submission and page charges
- Quick decision and online first publication

For information on manuscript preparation and submission, please visit JIM website. Send your postal address by e-mail to jcim@163.com, we will send you a complimentary print issue upon receipt.

Editorial

Acupuncture and Herbal Medicine for Cancer Patients 2014

Thomas Efferth,¹ Sookyung Lee,² Yoshiharu Motoo,³ and Sven Schröder⁴

¹ Department of Pharmaceutical Biology, Institute of Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg University, Staudinger Weg 5, 55128 Mainz, Germany

² Department of Clinical Oncology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 149 Sangil-dong, Gangdong-gu, Seoul 134-727, Republic of Korea

³ Department of Medical Oncology, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan

⁴ HanseMercur Center for Traditional Chinese Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, House O55, University Clinic Campus, Martinistraße 52, 22303 Hamburg, Germany

Correspondence should be addressed to Thomas Efferth; efferth@uni-mainz.de

Received 6 August 2014; Accepted 6 August 2014; Published 27 August 2014

Copyright © 2014 Thomas Efferth et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Traditional medicine is a popular option for patients to get medical information and care with various reasons worldwide. Developing countries depend on it because of the affordable prices, while a large portion of patients of developed or industrialized countries have a continuing interest induced by the reluctance towards chemical drugs and mechanical approaches to disease. CAM offers a multitude of advantages for patients, especially in the chronic and life-threatening severe ailments such as cancer. The global demand for CAM makes it mandatory to investigate its scientific evidence basis.

Among the different facets of CAM, acupuncture and herbal medicine raised special interest not only for treatment of patients but also for research of medicine. As can be seen in Figure 1, acupuncture and herbal medicines have become thriving fields of research during the past half century. A comprehensive survey of published papers from 1960 to 2013 shows the number of annually published papers dealing with acupuncture or herbal medicines for all medical fields (Figure 1(a)) and in the context of cancer treatment (Figure 1(b)). Since a tremendous interest in acupuncture and herbal medicine was observed in 2000, the increasing numbers of published papers per year are apparent. In 2013, more than 90 papers on acupuncture and more than 450 papers on herbal medicines appeared in the area of cancer prevention and therapy. The increase rate of published papers concerning cancer over the years indicates that this small research field

took a booming development. These facts and figures illustrate that the present special issue focuses on a hot topic in cancer research.

For this year's special issue, we were able to gather a panel of scientists from different fields working on innovative topics. The papers of this special issue include the following: "The effects of herbs and fruits on leukemia" by T. A. Saedi et al., "Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer" by L. S. Monteiro et al., "Pharmacopuncture for cancer care: a systemic review" by S. Cheon et al., "Acupuncture for preventing complications after radical hysterectomy: a randomized controlled clinical trial" by W. Yi et al., "Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells" by H. Xuan et al., and "Apoptosis induction by the total flavonoids from *Arachnoides exilis* in HepG2 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction involving MAPK activation" by H. Li et al.

We, the editors, believe this issue may be of particular interest to the readers. Hopefully, this issue will give helpful insights to researchers, physicians, and patients and will also be able to make a progress in the field of cancer CAM.

Thomas Efferth
 Sookyung Lee
 Yoshiharu Motoo
 Sven Schröder