令和６年度（第47回）

研究・調査助成について

令和６年４月１日から５月31日にわたり公募を行い、選考委員会において慎重なる審議の結果、下記の５編が採用された。（１編あたり50～80万円、総額320万円）

１．太田　美里（オオタ　ミサト）……80万円

【所属】名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野研究員

【題目】酸棗仁（サンソウニン）の加熱による効能変化の史的考察およびその鎮静活性成分探索

２．江崎　伸一（エサキ　シンイチ）……80万円

【所属】名古屋市立大学病院睡眠医療センター副センター長

【題目】腫瘍溶解ウイルス療法における十全大補湯の増強効果

３．日比野　絵美（ヒビノ　エミ）……60万円

【所属】名古屋大学大学院創薬科学研究科助教

【題目】がん抑制タンパク質p53の生薬成分誘導凝集体のがん抑制効果検証

４．能勢　充彦（ノセ　ミツヒコ）……50万円

【所属】名城大学薬学部薬学研究科教授

【題目】麻黄配合漢方方剤の安全使用に向けた薬物動態データベースの構築

５．鈴木　進（スズキ　ススム）……50万円

【所属】愛知医科大学研究創出支援センター医学部特任教授

【題目】和漢薬のがん免疫療法に対する補強効果

〔助成金対象研究報告〕①

題目：酸棗仁の加熱による効能変化の史的考察およびその鎮静活性成分探索

研究代表者：名古屋市立大学大学院薬学研究科　研究員　太田美里
研究協力者：名古屋市立大学大学院薬学研究科　教授　牧野利明

緒言

「酸棗仁」はサネブトナツメ *Ziziphus jujuba* Miller *var. spinosa* Hu ex H. F. Chow（Rhamnaceae）の種子由来品として『第十八改正日本薬局方』に収載される鎮静、催眠作用を有する代表的な生薬である。中国では古来、「炒酸棗仁」（酸棗仁を炒ったもの）が使用され、現代の『中華人民共和国薬典2020』にも収載されている。炒酸棗仁は不眠への効果が向上するとされる。このような生薬の薬効の向上や副作用の軽減を期待した加工処理を、日本では「修治」、中国では「炮製」と称している。

一方、日本では、吉益東洞が『薬徴』（1771）にて修治による効能変化を否定し、その後、修治品は使っていない。しかし、酸棗仁の炒製による変化の科学的解明は不十分であり、薬効向上が期待できるなら、日本でも治療効果が高まる可能性がある。

我々はこれまでに脳内の$GABA_A$受容体への結合能を指標とした鎮静作用を評価するin vitro実験系を構築し、酸棗仁の作用を検討した。その結果、酸棗仁エキス添加により、濃度依存的に$GABA_A$受容体への結合活性が増加した。また、180℃で40分加熱した酸棗仁エキスは未加熱酸棗仁エキスよりも低濃度で活性を示し、$GABA_A$受容体を介した鎮静作用が向上することを明らかにした。

そこで本研究では、酸棗仁を加熱加工する意義を解明することを目的に、中国の歴代の古典の記述を調査し、先人の知恵から効能変化を考証した。また、酸棗仁の加熱加工による鎮静作用向上のメカニズムを科学的に解明することを目的とし、加熱温度および時間を変えて加工した各種酸棗仁エキスの$GABA_A$受容体結合活性を評価して加熱の至適温度と時間を決定すると同時に活性成分の解明を試みた。

方法

〈本草考証〉

中国の本草書（薬物書）ならびに医方書（処方集）のデータベースの歴代名著選（https://www.theqi.com/cmed/oldbook/oldbook_top.html）または中醫笈成（https://jicheng.tw/tcm/book/index.html）から、酸棗仁に関する記述を抽出した。本草書では薬能、性味の変化について表にまとめ、医方書では酸棗仁が使われる各種処方数をカウントした。

〈酸棗仁各種サンプルの調製〉

日本薬局方に規定される酸棗仁（大晃生薬）を粉砕し、20倍量の水で30分間、熱水抽出をした。ガーゼで濾した溶液を凍結乾燥し、エキスを実験に使用した。酸棗仁を120℃で2時間、150℃で1、2または3時間、180℃で0.5、1または2時間加熱し、同様に熱水抽出エキスを得た。また、180℃で1時間加熱した酸棗仁熱水抽出エキスを水で再溶解後に等量の酢酸エチル、ブタノールを順に加えて分画し、酢酸エチル、ブタノール画分を得た。また、ブタノール不溶部にエタノールを添加して30分間、超音波抽出後に遠心分離（15,000rpm, 5分）し、エタノール可溶部と不溶部に分画した。

〈GABAA受容体結合実験〉

名古屋市立大学実験動物使用ガイドラインおよび動物倫理委員会により承認された実験計画に基づいて行った（承認番号23-012）。先行研究[1]に従っ

て、Wistar/ STラット（7週齢オス）から大脳皮質を採取し、トリス・クエン酸緩衝液（50 mM, pH 7.1）でホモジナイズした。懸濁液を2.7 x 10^4 x g（4℃）で15分間遠心し、沈殿物をトリス・クエン酸緩衝液で3回洗浄した。沈殿物をトリス・クエン酸緩衝液で再懸濁し、37℃で30分間インキュベートした後、再度2.7 x 10^4 x g（4℃）で10分間遠心した。最終沈殿物をトリス・クエン酸緩衝液に懸濁させ、−80℃で保存した。

Poly-L-lysine（Sigma）でコートした96穴プレートにラット大脳皮質ホモジネートを50μL/wellで添加し、37℃で乾固させた。0.05% Tween 20リン酸緩衝生理食塩水（0.15 M, pH 7.2）で洗い、トリス・クエン酸緩衝液で溶解したブロックエース®（ケーエーシー）を加え、4℃で一晩インキュベートした。50μLのサンプルを各wellに添加した後、[^{3}H]-flunitrazepam（Revvity）を50μLずつ入れ、4℃で一晩インキュベートした。陽性対照とバックグランドとしてジアゼパム（富士フイルム和光）と過剰量のクロナゼパム（富士フイルム和光）を使用した。0.1 M水酸化ナトリウム／0.5% ジメチルスルホキシド溶液を添加して30分後に0.1 M 塩酸を加え、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定することでGABAA受容体への結合能を評価した。

加熱温度の異なる各サンプルについて、R version 4.2.3を使用し、加熱時間と活性の相関を4パラメーターまたは3パラメーターロジスティックモデル化した。モデル選択は、赤池情報量規準（AIC）を基準とした。得られたモデルの逆関数を使用し、活性が50%となる濃度を求めた。そのうち、Smirnov-Grubbs検定で$p<0.05$の場合は異常値としてデータを除去した。次いで、一元配置分散分析（ANOVA）とTukeyの多重検定により群間比較を行った。

結果および考察

〈本草書に記載される酸棗仁の睡眠改善作用〉

酸棗仁の睡眠に関する薬能の初出は、後漢代の『名医別録』（205-220）に不安などで心が煩くて眠れない時に使うとある。一方で『新修本草』（659）には「東人乃啖之以醒睡（東の地域の人は眠りを醒ます目的で酸棗仁を使う）」とあり、不眠とは全く逆の効果を期待している。宋代の『本草図経』（1061）には「今医家両用之、睡多生使、不得睡炒熟（医家は多眠には未修治品、不眠には炒製品を用いている）」とあり、酸棗仁は炒製の有無で多眠と不眠の異なる作用が期待されていた。『湯液本草』（1298）では「胆虚不眠、寒也。酸棗仁炒香、…胆実多睡、熱也。酸棗仁生用」とあり、炒酸棗仁が適合する不眠を寒性の胆虚、未修治酸棗仁が適合する多眠を熱性の胆実によるものと分類した。胆虚は不安、恐怖症状等があり、『名医別録』に記された酸棗仁の適応と一致する。明代になると、薬鑑（1598）では「血不帰脾、而睡臥不寧者（血が脾に入らず、寝ても安らかに眠れない）」、『本草徴要』（1673）では「徹夜無眠（一晩中眠れない）」と酸棗仁が適合する不眠の状態が具体化された。清代では、『本草新編』（1689）に「惟夜不能眠者、必須生用…若日夜不寐、正宜用炒」とあり、夜に眠れない時には未修治品、日中と夜に眠れない時は炒製を使うとされ、未修治品も不眠に使うと記載された。『本草従新』（1757）には「生用…専補肝胆。炒熟…亦能醒脾（未修治品は肝胆を補い、炒熟品は脾を醒ます）」、『得配本草』（1761）には「棗仁止汗、能治不眠（酸棗仁は止汗作用により不眠を解消する）」とあり、酸棗仁の薬能について記載されるものの、多眠について言及されることがなくなった。『本経疏証』（1832）、『本草便読』（1887）では酸棗仁が不眠と多眠の両者を改善することに対する疑問点を述べられた。『本草思辨録』（1904）では「其治不得眠、尚有何疑（不眠を治すことに疑いがない）」とあり、酸棗仁は不眠改善作用があることを強調した。以上、一部の地域で酸棗仁を多眠にも使用したとされるが、時代が下るにつれて、不眠のみに統一された。

多眠について、『本草約言』（1550）には「蓋棗仁秋成者也、生則全得金気、而能制肝木、肝木有制、則脾不受侮、而運行不睡矣（酸棗仁は金気が旺盛な秋になり、生のものは完全な金気を得て、肝木を制御し、脾の運行を改善し、睡眠をとらなくなる）」

とある。「生」は本来、未修治品を表すが、この場合、採集仕立ての新鮮なものを指している。すなわち、多眠に良いとされたのは乾燥種子ではなく、新鮮な果実そのものを意味していた可能性もある。これらのことから、未修治品が多眠に効くという根拠は見いだせなかった。

〈医方書に収載される睡眠改善に使用する酸棗仁配合処方数〉

調査した医方書の中では宋代の『太平聖恵方』(992) で初めて226処方に酸棗仁に炒製を施していた。本文献に収載される全炒酸棗仁配合処方のうち、不眠改善を目的に使用した処方は19%しかなかったが、不眠に適応する全酸棗仁配合処方中で炒酸棗仁を規定した処方の割合は80%を占めた。このことから、不眠改善目的で酸棗仁を使う場合、大半は炒製を用いているが、炒酸棗仁は不眠だけではなく多彩な用途で使用していたと考えられる。明代の医方書では炒酸棗仁配合処方数が最大30程度であったが、清代では12以下に減少した。明代までの炒酸棗仁配合処方が10以上の医方書では、不眠改善目的のとき、50%以上が酸棗仁を炒製していたが、清代になるとその数は減少した（**表1**）。一方、大半の医方書中で敢えて酸棗仁の未修治品を規定した処方は２個以内だが、そのほとんどが多眠に使っていた（**表2**）。このことから、医家の間では酸棗仁を不眠には多用していたが、多眠に使用するケースは非常に稀であったことが窺える。

表１　中国の歴代の医方書で炒酸棗仁を使った処方と不眠に適応する処方の数

時代	成立年	書名	炒酸棗仁配合処方数（そのうち不眠に適応する処方数）	酸棗仁【修治の規定なしまたは炒製以外】配合処方数（そのうち不眠に適応する処方数）	炒酸棗仁配合処方の不眠に適応する処方の割合（%）	不眠に適応する全酸棗仁配合処方で炒製の割合（%）
漢	208	華佗神方	0(0)	3(1)	N/A	N/A
唐	652	備急千金要方	0(0)	18(3)	N/A	N/A
	682	千金翼方	0(0)	7(2)	N/A	N/A
	752	外台秘要	0(0)	18(7)	N/A	N/A
宋	992	太平聖恵方	226(43)	50(11)	19	80
	1085	太平惠民和剤局方	3(3)	2(1)	100	75
	1118	聖済総録	135(40)	51(3)	30	93
	1124	千金宝要	0(0)	1(1)	N/A	0
	1132	普済本事方	5(2)	0(0)	40	100
	1178	楊氏家蔵方	10(8)	6(0)	80	100
	1237	婦人大全良方	12(2)	10(0)	17	100
	1267	御薬院方	8(4)	3(0)	50	100
元	1337	世医得效方	19(7)	14(3)	37	70
明	1436	奇効良方	30(6)	25(3)	20	67
	1565	医学綱目	5(2)	18(7)	40	22
	1575	医学入門	1(1)	36(4)	100	20
	1577	種杏仙方	3(3)	0(0)	100	100
	1589	古今医鑑	20(10)	15(5)	50	67
	1602	証治準繩·類方	34(10)	26(9)	29	53
	1615	万病回春	30(8)	19(1)	27	89
	1637	医宗必読	9(1)	10(5)	11	17
清	1682	医方集解	9(4)	5(2)	44	67
	1742	医宗金鑑	12(2)	14(6)	17	25
	1750	幼幼集成	3(0)	1(1)	0	0
	1846	験方新編	8(1)	33(3)	13	25

N/A, Not available

表２　中国の歴代の医方書で酸棗仁の未修治を規定した処方のうち多眠に適応した処方数

時代	成立年	書　名	未修治を規定した処方数（うち多眠に適応する処方数）
南北朝	500	肘後備急方	1(1)
宋	992	太平聖恵方	2(1)
	1118	聖済総録	9(3)
	1178	楊氏家蔵方	1(1)
明	1436	奇効良方	1(0)
	1565	医学綱目	2(2)
	1589	古今医鑑	1(1)
	1615	万病回春	1(1)
清	1846	験方新編	1(0)

〈酸棗仁エキスのGABAA受容体結合作用〉

加熱温度を変えて調製した各種酸棗仁エキスは濃度依存的な$GABA_A$受容体結合作用を示した。未加熱と120℃で２時間加熱品、150℃で1、2、3時間加熱品および180℃で0.5、1、2時間加熱品はそれぞれ同様の濃度依存的な活性を示した。これらの活性が50%になる濃度は、加熱温度が高くなるにつれて、有意に低くなった（論文投稿予定につきデータは掲載できません）。すなわち、酸棗仁の活性は加熱時間ではなく、加熱温度に依存することが明らかになった。

また、180℃で１時間加熱した酸棗仁エキスを酢酸エチル、ブタノール、エタノール可溶部および不溶部に分画して、$GABA_A$受容体結合作用を比較したところ、酢酸エチルとブタノール画分に活性が移行した（データ省略）。このことから、酸棗仁の加熱による活性向上は、複数の比較的低極性成分の相加相乗作用に起因する可能性が高い。現在、活性成分の同定を進めている。

120℃での加熱では未加熱品と作用が変わらない可能性がある。しかし、酸棗仁は粘性の多糖類が多く、抽出時に低分子化合物を抱き込みやすいが、加熱することで、多糖類が分解され、低分子化合物が抽出されやすくなる可能性がある。一方、150℃以上での加熱は鎮静作用向上が期待できる可能性がある。今後、*in vivo* レベルでの作用検討をも進めていく。

謝　辞

本研究に多大なご支援をいただきました東洋医学研究財団に感謝申し上げます。

参考文献

1．Ota M, Ni H, Maki Y, et al（2021）Binding activity of *Valeriana fauriei* root extract on $GABA_A$ receptor flunitrazepam sites and distribution of its active ingredients in the brain of mice–A comparison with that of V．*officinalis* root. J Ethnopharmacol 278:114262.

〔助成金対象研究報告〕②

題目：腫瘍溶解ウイルス療法における十全大補湯の治療増強効果

研究代表者：名古屋市立大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科　江　崎　伸　一

【緒言】

腫瘍溶解ウイルス療法とは、腫瘍内に接種したウイルスが腫瘍細胞のみで増殖し、破壊すると同時に放出したウイルスが周囲の腫瘍細胞に感染して腫瘍を縮小させる治療法である [1]。放射線療法、化学療法とは異なる機序により抗腫瘍効果を示す治療法であり、新たな治療法として期待されている。2000年頃より様々なウイルスが腫瘍溶解ウイルス療法の候補として臨床試験が行われ、2015年には初の腫瘍溶解ウイルスImlygic® が悪性黒色腫を対象として米国にて承認され、2022年にはデリタクト® が悪性神経膠腫を対象として、本邦にて条件付きで承認された。

我々は名古屋大学でクローニングされた、自然発生型の単純ヘルペスウイルス１型（HSV-1）HF10が多くの癌細胞株で増殖性が非常に高く、担癌モデルマウスに優れた抗腫瘍性を示すことを報告してきた [2, 3]。また、HF10は再発頭頸部癌等の患者に対して抗腫瘍効果と安全性が確認され、悪性黒色腫、再発乳癌、再発頭頸部癌などを対象として、米国と本邦で第I/II相試験が行われた。腫瘍溶解ウイルス療法は抗腫瘍免疫を惹起することが報告されており、我々は担癌状態による免疫の異常を改善することにより腫瘍溶解ウイルス療法の効果を高める研究を行ってきた。その一つとして、ゲムシタビン投与でMDSC（骨髄由来免疫抑制細胞）を抑制しHF10を接種することにより、ウイルス接種による直接的な抗腫瘍効果だけでなく、抗腫瘍免疫を介した抗腫瘍効果が認められることを報告した [2]。

ところで十全大補湯は補剤であり、東洋医学的には気血両虚の患者に対してこれらを補うことを目的に用いられる薬剤である。臨床的には主に高齢者や病気回復期の患者の体力あるいは栄養状態の向上を目的として用いられている。また、マウスを用いた研究では免疫系の賦活や [4]、MDSCを抑制して、T細胞を活性化することが示されている [5]。ゲムシタビンは様々な細胞に対してDNA増殖を阻害する薬剤であり、全身の様々な臓器に負担を及ぼし、また腫瘍溶解ウイルスの増殖も抑制してその効果を減弱してしまう。一方、十全大補湯は全身に対する負担が極めて少ない薬剤であり、またウイルスの増殖に影響がない薬剤である。そこで、十全大補湯の投与でMDSCを抑制して腫瘍溶解ウイルス療法の効果を安全に増強することを期待し、本研究では十全大補湯と腫瘍溶解ウイルスの併用効果につき検討を行った。

【方法】

１）腫瘍細胞株、腫瘍溶解ウイルス、薬剤

腫瘍細胞株としてはマウス大腸癌細胞株であるColon26-luc細胞を用いた。腫瘍溶解ウイルスとしては、米国ハーバード大学マサチューセッツ総合病院から供与されたHSV-1 G47Δを用いた。G47Δはデリタクト® の元となった腫瘍溶解ウイルスである。十全大補湯は株式会社ツムラから供与された医療用エキス顆粒を使用した。

２）大腸癌肺転移腫瘍モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

６週齢メスのBalb/cマウスの尾静脈にColon26-luc細胞を接種した（０日）。マウスを４群に分け、偽治療群、G47Δ群、十全大補湯群、併用群にわけた。１日から７日まで十全大補湯（1 g/kg）もしくは同量の白湯（10 mL/kg）を胃内にゾンデで投与し、２、５日にG47Δ（1×107pfu）もしくは同量の細胞培養液（100μL）を尾静脈に投与した。毎日体重を測定し、副作用の有無を観察した。

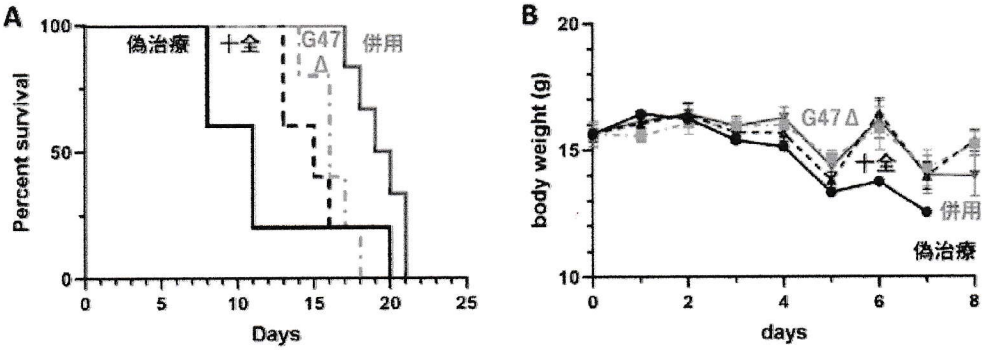

図1．大腸癌肺転移腫瘍モデル

(A) 生存解析：十全大補湯群、G47Δ群は偽治療群と比して生存延長効果が、併用群は他の3群と比して有意な生存延長効果が認められた（$p < 0.05$）。

(B) 体重の推移：治療に伴う体重減少は認めなかった。

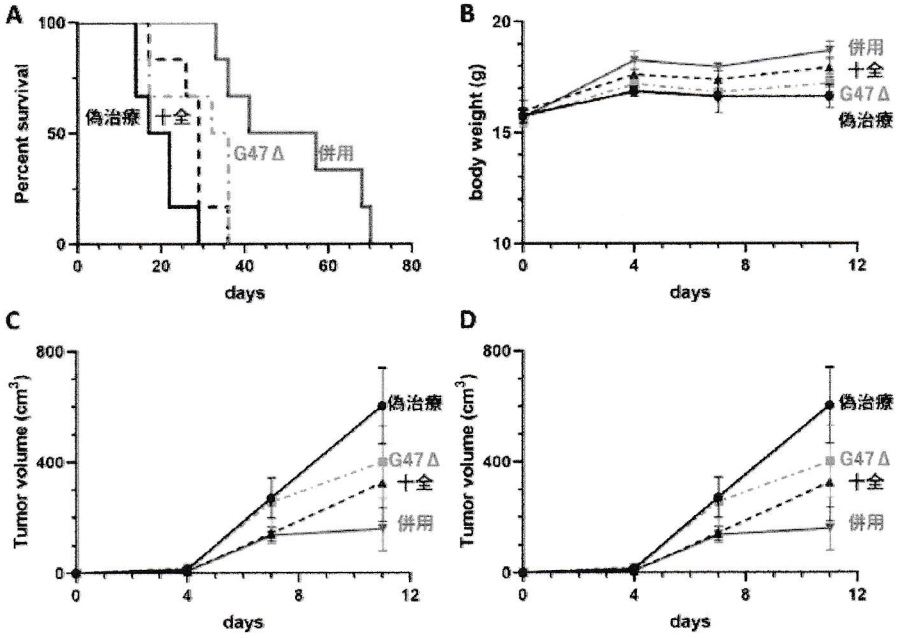

図2．大腸癌肺転移腫瘍モデル

(A) 生存解析：十全大補湯群、G47Δ群は偽治療群と比して有意な生存延長効果が、併用治療群は他の3群と比して有意な生存延長効果が認められた（$p < 0.05$）。

(B) 体重の推移：治療に伴う体重減少は認めなかった。

(C) 右側の皮下腫瘍の体積：十全大補湯群、G47Δ群は偽治療群と比して縮小効果が、併用治療群は他の3群と比して縮小効果が認められた。

(D) 左側の皮下腫瘍の体積：十全大補湯群、G47Δ群は偽治療群と比して縮小効果が、併用治療群は他の3群と比して縮小効果が認められた。

3）大腸癌多発皮下転移腫瘍モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

6週齢メスのBalb/cマウスの両背部にColon26-luc細胞を接種して両側に皮下腫瘍を作成した（0日）。マウスを同様に4群に分け、4日から11日に十全大補湯もしくは白湯を胃内に投与し、5、8日目にG47Δもしくは細胞培養液を右側のみに腫瘍内接種した。週2回、腫瘍の大きさと体重を測定し、腫瘍径が2cmを超えた段階で実験終了とした。

【結果】

1）大腸癌肺転移腫瘍モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

Colon26-luc細胞で転移性肺腫瘍を作成し、十

全大補湯、G47Δを全身投与した。十全大補湯群、G47Δ群は偽治療群と比して生存延長効果が、併用群は他の３群と比して有意な生存延長効果が認められた（図１A）。また。治療に伴う体重減少、合併症は認めなかった（図１B）。

２）大腸癌多発皮下転移腫瘍モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

Colon26-luc細胞で両側に皮下腫瘍を作成し、十全大補湯は全身投与し、G47Δは右側の腫瘍に接種した。十全大補湯群、G47Δ群は偽治療群と比して有意な生存延長効果が、併用群は他の３群と比して有意な生存延長効果が認められた（図２A）。治療に伴う体重減少は認めなかった（図２B）。また、十全大補湯を投与した２群は体重が増加する傾向にあった。右側の皮下腫瘍の体積は十全大補湯群、G47Δ群では偽治療群と比して縮小効果が、併用群は他の３群と比して有意な縮小効果が認められた（図２C）。左側の皮下腫瘍の体積は、十全大補湯群、G47Δ群では偽治療群と比して縮小効果が、併用群は他の３群と比して縮小効果が認められた（図２D）。

【考察】

本研究では、複数の担癌モデルマウスを用いて、G47Δ、十全大補湯の投与による治療効果を検討した。G47Δは感染した腫瘍を縮小させるウイルスであるが、抗腫瘍免疫を惹起することにより腫瘍縮小効果を示すことも知られている[6]。肺転移腫瘍モデルでは血中を介して腫瘍に感染したと考えられるが、抗腫瘍免疫を惹起されて生存が延長した可能性も考えられる。今後、抗腫瘍免疫の惹起の有無について検討を行う予定である。

多発皮下腫瘍モデルは、右側は腫瘍溶解ウイルスによる直接的な腫瘍縮小作用を期待し、左側は抗腫瘍免疫を介した腫瘍縮小効果を検討するモデルである。本検討では両側とも各治療により皮下腫瘍の縮小効果が認められた。過去の検討では、腫瘍溶解ウイルス等で治療を行うことにより、脾臓内の白血球分画が変化すること、CD4陽性T細胞を中心とした抗腫瘍免疫が惹起されることが明らかになっている[2, 3]。今後、全身性の免疫に対する影響の有無について検討を行う予定である。

十全大補湯は、気を補い脾胃を補う四君子湯（人参、白朮、茯苓、甘草）、血を補い血燥を潤す四物湯（当帰、川芎、芍薬、地黄）に、気を補う黄耆と気を巡らす桂皮を加えた処方である。マウスモデルにおいて抗腫瘍効果が示されているが、十全大補湯には殺細胞効果を示す成分は含まれないため、直接的な抗腫瘍効果ではなく、免疫を介した抗腫瘍効果を示すと推測されている[5, 7]。今後、全身の免疫細胞への影響や抗腫瘍免疫の誘導能につき検討を行う予定である。また、十全大補湯を投与したマウスでは体重減少の抑制が認められたため、補剤としての効果も検討予定である。

【まとめ】

本研究では十全大補湯とG47Δの併用効果について、二種類のモデルマウスを用いて示した。各治療による組織学的変化や抗腫瘍免疫については今後検討予定である。十全大補湯は臨床で広く用いられている薬剤である。甘草等の副作用に配慮する必要はあるが、基本的には安全に投与可能な薬剤である。一方、G47Δは悪性脳膠芽腫を治療対象として認可されたウイルスであるが、抗腫瘍効果の機序からは様々な種類の腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことができる。G47Δの治療対象が増えてきた際には、十全大補湯と併用することで抗腫瘍効果を高めることが期待できる。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり公益財団法人東洋医学研究財団より助成を賜りましたことを心より感謝します。

【参考文献】

[1] *Varghese S. Cancer Gene Ther.* 2002. 9（12）:967-78.

[2] Esaki S. *Int J Cancer.* 2013. 132（7）:1592-601.

[3] Esaki S. *Cancer Gene Ther.* 2020 27（7-8）:585-

598.

[4] Matsumoto T. *Phytomedicine.* 2000. 6 (6) :425-30.

[5] Takaku S. *Integr Cancer Ther.* 2020. 19: 1 -13.

[6] Toda M. *Hum Gene Ther.* 1999. 10 (3) :385-93.

[7] Takaku S. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022. 6122955.

〔助成金対象研究報告〕③

題目：がん抑制タンパク質p53の生薬成分誘導凝集体のがん抑制効果検証

研究代表者：名古屋大学大学院　創薬科学研究科　日比野　絵　美

背景

p53タンパク質はがん化抑制に重要な転写因子である。DNAダメージをきっかけにp53が活性化され、下流遺伝子の転写を促進し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導することでがん化を防ぐ。また、p53はそのDNA結合ドメイン (p53-DBD) の変性に起因するアミロイド凝集体およびアモルファス凝集体の形成により失活する。そこで、p53の凝集抑制化合物の同定を目指し研究を進めてきた。これまでに、漢方薬の小柴胡湯に含まれる天然由来成分バイカレインが、p53-DBDをアミロイド凝集もアモルファス凝集も抑制することを見出した。一方で、いずれの凝集体でもないまた別の構造体形成に導くことを発見した。バイカレインはアルツハイマー病を改善する効果やがんを抑制する効果も報告されている[1]。

本研究では、バイカレイン誘導p53構造体について、生物物理学的アプローチならびに細胞生物学的アプローチにより解析し、バイカレインの示すがん抑制効果との関連を調べる。

(1)　生物物理学アプローチ

(1)-1　バイカレイン誘導p53-DBD構造体の分析

濃度4μMのp53-DBDを濃度20μM、60μM、100μMのバイカレイン存在下で37℃、60分間インキュベートした試料中の、粒子の粒子径および粒子濃度をナノ粒子トラッキング解析により測定した（図１）。濃度20μMのバイカレイン存在下でインキュベートした試料ではコントロールと比べて小さい粒子が形成されている様子が見られ、濃度60μMのバイカレイン存在下でインキュベートした試料では粒子数の大幅な増加が見られた。濃度100μMのバイカレイン存在下でインキュベートした試料ではコントロールの試料と比べ大きな粒子が多く形成されている様子が見られた。

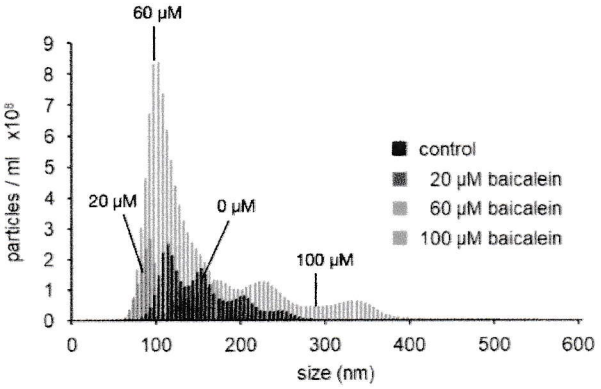

図１　ナノ粒子トラッキング解析によるp53-DBD凝集体粒子の粒子径および粒子径の測定

4 μM p53-DBD, 0 -100 μM バイカレインの条件で調製し、37℃、60分間インキュベートした試料のナノ粒子トラッキング解析の結果。縦軸は粒子濃度、横軸は粒子の直径を示す。

続いて、バイカレイン誘導多量体の形態を直接観察するため、透過型電子顕微鏡観察を行った（図２）。コントロール（バイカレイン非含有試料）では球状の凝集体と思われる粒子が見られた。濃度20μMのバイカレイン存在下でインキュベートした試料では、コントロールと見られたものと同様の球状粒子と、桿状の小さな粒子が混合していた。濃度60μMのバイカレイン存在下でインキュベートした試料では、球状の粒子はほとんど確認されず、小さな桿状粒子が大部分を占めていた。濃度100μMのバイカレイン存在下でインキュベートした試料では、桿状の大きな構造物が確認された。以上の結果より、p53-DBDの凝集にバイカレインが濃度依存的に影響を与えることが可視化された。

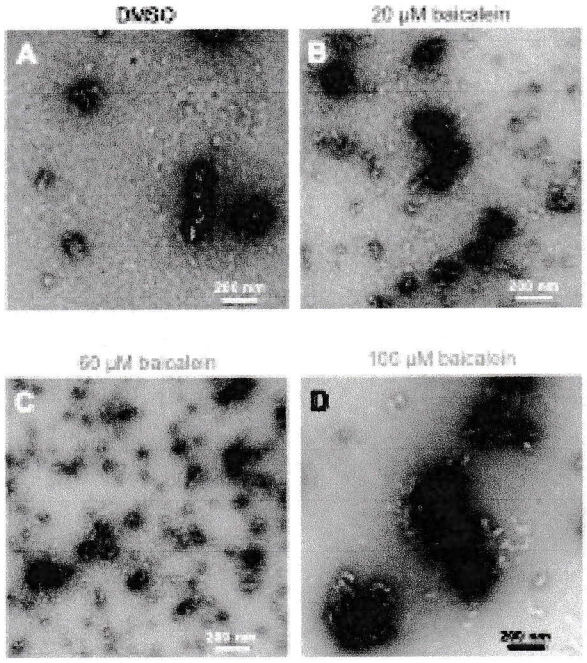

図２　baicaleinが誘導するp53-DBD多量体の電子顕微鏡観察

4 μM p53-DBD, 0 μM (A), 20 μM (B), 60 μM (C), 100 μM (D) バイカレインの条件で調製し、37℃、60分間インキュベートした試料を酢酸ウランで染色し、透過型電子顕微鏡観察を行った。

(1)-2　バイカレイン誘導構造体の構成タンパク質の構造特性の分析

未変性のp53-DBDは、波長280 nmの励起光により励起されると、チロシン残基に由来する蛍光を発し、その極大波長は305 nmで観測される。しかし、構造が変性するに従って、チロシン由来の蛍光は消光し、代わりにトリプトファン残基に起因する蛍光が現れ、極大波長は333 nmへシフトすることが知られている。先行研究では、この極大波長のシフトを指標としてp53-DBDの変性状態の変化をモニターしている[2–5]。そこで、バイカレインがp53-DBDの立体構造や変性状態にどのような影響を与えるかをチロシン・トリプトファン蛍光により調べた（図３）。コントロールでは極大波長のシフトが観測されたが、バイカレイン濃度依存的に消失した。さらに、チロシンに起因する波長305nm付近の蛍光はバイカレイン濃度依存的に減弱していき、100μMバイカレインを添加した試料ではほぼ完全に消光した。

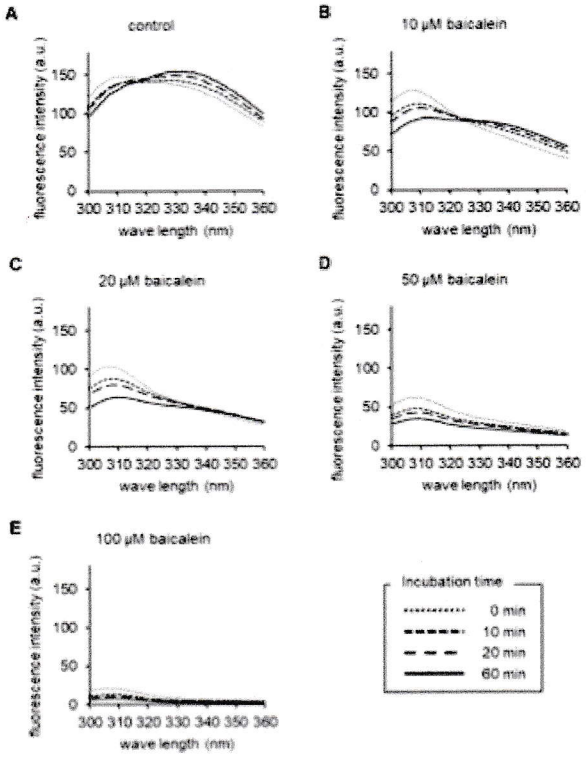

図３　baicalein存在下でのp53-DBD内在性蛍光測定

4 μM p53-DBD, 0-100 μM バイカレインの条件で調製した試料を光路長1 mmのセルに入れ、37℃にて、2分毎に合計60分間波長280 nmの励起光による波長300-360 nmの蛍光スペクトルを測定した。グラフでは測定開始0, 10, 20, 60分後の蛍光スペクトルを示した。0 μM (A)、10 μM (B)、20 μM (C)、50 μM (D)、100 μM (E) baicalein存在下での結果を示した。

さらに、バイカレインとp53-DBD単量体との相互作用を評価するため、NMR化学シフト摂動実験を行った（図４）。コントロールとバイカレイン存在下での1H-15N HSQCスペクトルにおいて、各アミノ酸の主鎖アミドプロトンに対応するピークの化学シフトはほとんど変化しなかった（図4B）。一方で、バイカレイン添加によりほとんど全てのピークにおいてシグナル強度が低下していた（図4C）。

(2)　細胞生物学的アプローチ

(2)-1　RNA-seq解析

バイカレインによるMCF-7細胞内p53量の増加と、細胞増殖抑制との関連をRNAシークエンスによって調べた。各遺伝子のカウントデータにおいて、標準偏差の大きかった上位2000遺伝子についてヒートマップにまとめたところ、各条件の複製試料同士

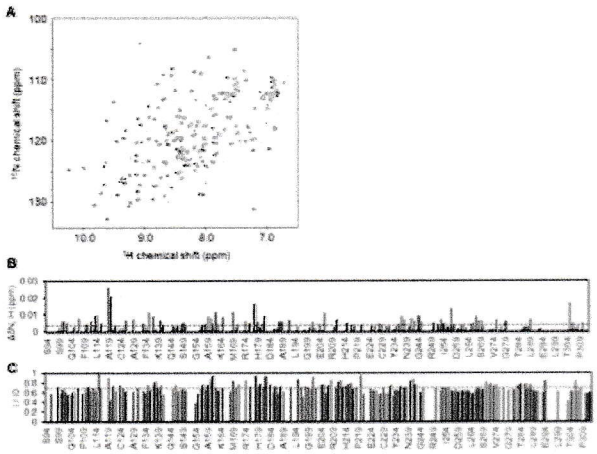

図4　ＮＭＲ測定によるバイカレインとｐ53－ＤＢＤの相互作用の評価

(A) バイカレイン存在下(グレー)・非存在下(黒)における^{15}N-p53-DBDの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルの重ね合わせ50 μM 15N-p53-DBDの1H-15N HSQCスペクトル測定を900MHz NMR装置を用いて、25℃、5時間行った。

(B) 各残基の化学シフトの差のグラフ。縦軸はピーク移動度Δδ、横軸はアミノ酸残基番号を示す。グラフ中の点線は平均値を示す。

(C) 各残基のシグナル強度の比較。縦軸はシグナル強度の割合 (I (baicalein) / I0 (control))、横軸はアミノ酸残基番号を示す。グラフ中の点線は平均値を示す。

で発現変動の傾向が一致していた（図５）。群間の発現変動解析の結果、顕著に発現変動した遺伝子(Differentially Expressed Genes; DEGs / |$\log_2$(Fold Change)>1.0かつ、多重比較補正後ｐ値<0.01)の数は512遺伝子であった。ここに含まれるp53の転写表的遺伝子[6]を調べた結果、発現が減少したのは１遺伝子のみであり、残り10遺伝子は増加していることが判明した。

続いて、バイカレイン曝露による作用の中でp53経路がどの程度寄与しているかを評価するため、パスウェイ解析を実施した（図６）。その結果、フェロトーシス、p53シグナリング経路、がんにおける経路、MAPKシグナル伝達経路が上位に見られた。

さらにバイカレイン曝露によって活性化される生物学的プロセスをGO解析によって調べた（図７）。細胞集団増殖の負の調節、プログラムされた細胞死の正の調節、細胞内シグナル伝達の負の調節、アポトーシスシグナル経路、異物刺激への応答、細胞外刺激への応答、脂質への細胞応答、上皮細胞分化の調節、神経系発生の調節、細胞構成要素の組織化の

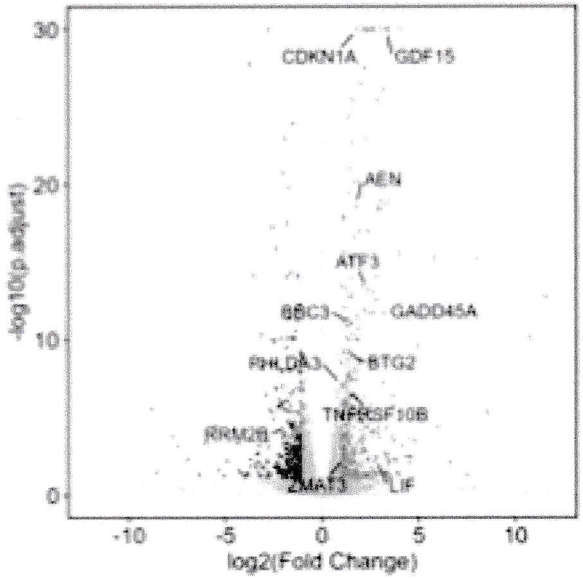

図５　ボルケーノプロット

顕著に発現が増減した遺伝子を黒で示した。また顕著に発現が変動していたp53の下流遺伝子をラベルした。

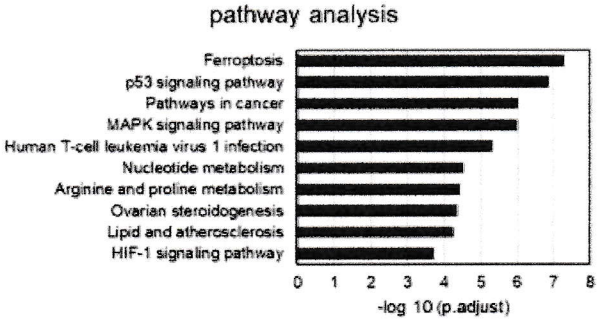

図６　RNA-seq；Pathway解析の結果

変動が大きかった上位10パスウェイ。横軸は多重比較補正後のｐ値の対数値を示す。

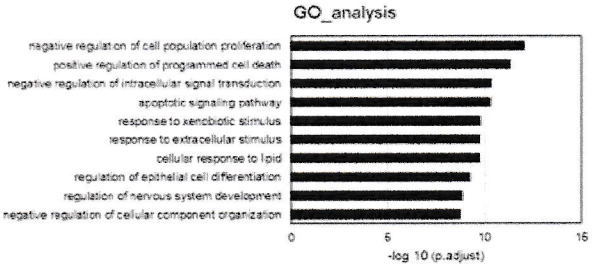

図７　RNA-seq；GO解析 (biological process) の結果

変動が大きかった上位10ターム。横軸は多重比較補正後のｐ値の対数値を示す。

負の調節といったタームが上位に見られた。

(2)-2 抗がん薬とバイカレインの共曝露実験

p53に作用するバイカレインと、p53経路を介してがん細胞毒性を示すシスプラチンの共曝露により、p53を介したがん細胞増殖抑制効果が相乗的に強まると考えた。そこで、バイカレインとシスプラチン

の併用効果を評価することとした。バイカレインとシスプラチンを共曝露してWST-8アッセイを行った（図８）。シスプラチン単体では濃度依存的な増殖抑制効果が見られた。バイカレイン単体では、濃度50μMまでは濃度依存的な増殖抑制効果が確認されたが、それ以上の濃度では効果は見られなかった。シスプラチンとバイカレインを同時に曝露した場合、バイカレインの濃度を一定にした条件では、シスプラチン濃度の増加に伴い増殖抑制効果が増強された。

バイカレインとシスプラチンを共曝露した細胞増殖アッセイの結果より得られた細胞生存率から、薬剤併用効果について相加的か相乗的か示す指標であるCombination Index (CI) を算出した[7,8]。WST-8アッセイにより得られたデータから、コントロールに対する細胞増殖阻害率であるfa (fraction affected) を算出した。算出したfaより式 (1) に従いCIを求めた。

$$\text{Combination Index} = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} = \frac{(D)_1}{(Dm)_1\left[\frac{fa}{1-fa}\right]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2\left[\frac{fa}{1-fa}\right]^{1/m_2}} \quad \text{式 (1)}$$

ここで、Dmおよびmは各薬剤単体で処理した際の濃度とそのfaより算出される定数であり、(D)1、(D)2 は共曝露した際のシスプラチンとbaicalein濃度である。$(Dx)_1$は$(Dm)_1 * \left[\frac{fa}{(1\text{-}fa)}\right]^{1/m^1}$より算出され、$(Dx)_2$は$(Dm)_2 * \left[\frac{fa}{(1\text{-}fa)}\right]^{1/m^1}$より算出される。

CIは数値によって表され、0.9未満 は相乗的、0.9-1.1 は相加的、1.1より大きい場合は拮抗的な併

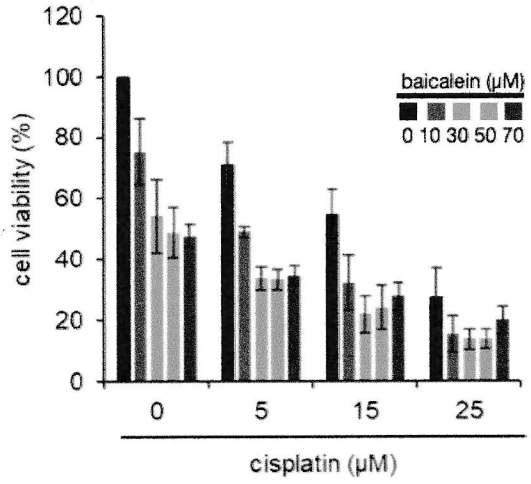

図８　バイカレインとシスプラチンを共曝露した際の細胞生存率。

バイカレイン、シスプラチンを単体もしくは共にMCF-7細胞に48時間曝露した試料のWST-8アッセイの結果。縦軸はコントロールを100%として、相対値を示した。エラーバーは標準偏差を

表１　バイカレインとシスプラチンの共曝露試験の結果のまとめ

entry	シスプラチン (μM)	baicalein (μM)	fraction affected (fa)	Combination Index
1	0	0	0.000	—
2	0	10	0.247	—
3	0	30	0.458	—
4	0	50	0.513	—
5	0	70	0.522	—
6	5	0	0.289	—
7	5	10	0.509	0.568
8	5	30	0.663	0.422
9	5	50	0.668	0.546
10	5	70	0.654	0.742
11	15	0	0.453	—
12	15	10	0.678	0.652
13	15	30	0.781	0.447
14	15	50	0.758	0.579
15	15	70	0.721	0.810
16	25	0	0.726	—
17	25	10	0.847	0.418
18	25	30	0.864	0.388
19	25	50	0.863	0.414
20	25	70	0.800	0.710

シスプラチンとバイカレインを共曝露したWST-8アッセイの結果より、化合物を曝露していない条件 (entry 1) を基準としてfraction affected (fa) を算出した。Combination Indexは各化合物を単体で曝露した際のfa (entry 2-6, 11, 16) の値から求めた。表中では各濃度条件に対応するfaとCombination Indexの値を示した。

用効果であることを示す。その結果、全ての条件においてCIは0.9未満となり、バイカレインとシスプラチンは相乗的にMCF-7細胞に対する細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった（表1）。

まとめ

本研究では、p53-DBDのアモルファス凝集体とアミロイド凝集体の形成を同時に抑制する化合物として同定されたバイカレインが誘導する構造体について分析した。バイカレインによる処理下ではがん細胞においてp53の活性が誘起されることも判明した。バイカレインは現行の化学療法の併用薬の応用も期待される。残りの研究期間においては、細胞内におけるp53の形態を精査し、RNAシークエンス解析結果をさらに検証したのち、本成果について論文化の予定である。

参考文献

[1]C.H. Chen, T.S. Huang, C.H. Wong, C.L. Hong, Y.H. Tsai, C.C. Liang, F.J. Lu, W.H. Chang, Synergistic anti-cancer effect of baicalein and silymarin on human hepatoma HepG2 Cells, Food Chem. Toxicol. 47 (2009) 638–644. https://doi.org/10. 1016 / j.fct.2008. 12.024.

[2]D. Ishimaru, L.F. Maia, L.M. Maiolino, P.A. Quesado, P.C.M. Lopez, F.C.L. Almeida, A.P. Valente, J.L. Silva, Conversion of wild-type p53 core domain into a conformation that mimics a hot-spot mutant, J. Mol. Biol. 333 (2003) 443–451.https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.026.

[3]A.N. Bullock, J. Henckel, A.R. Fersht, Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: Definition of mutant states for rescue in cancer therapy, Oncogene 19 (2000) 1245–1256. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203434.

[4]M.M. Pedrote, G.A.P. De Oliveira, A.L. Felix, M.F. Mota, M. de A. Marques, I.N. Soares, A. Iqbal, D.R. Norberto, A.M.O. Gomes, E. Gratton, E.A. Cino, J.L. Silva, Aggregation-primed molten globule conformers of the p53 core domain provide potential tools for studying p53C aggregation in cancer, J. Biol. Chem. 293 (2018) 11374–11387. https://doi.org/10. 1074/jbc.RA118. 003285.

[5]E. Hibino, T. Tenno, H. Hiroaki, Relevance of Amorphous and Amyloid-Like Aggregates of the p53 Core Domain to Loss of its DNA-Binding Activity, 9 (2022) 1–13. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.869851.

[6]M. Fischer, Census and evaluation of p53 target genes, Oncogene 36 (2017) 3943–3956. https://doi.org/10.1038/onc.2016.502.

[7]T.C. Chou, Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method, Cancer Res. 70 (2010) 440–446. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.

[8]T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, Adv. Enzyme Regul. 22 (1984)27–55. https://doi.org/10. 1016 / 0065-2571 (84) 90007-4.

〔助成金対象研究報告〕④

題目：麻黄配合漢方方剤の安全使用に向けた薬物動態データベースの構築

研究代表者：名城大学薬学部薬学科　教授　能　勢　充　彦

1．緒　言

医療用および一般用漢方処方は294処方を数え、日本漢方生薬製剤協会が実施したアンケートによれば、ほぼ9割の医師が漢方エキス製剤を日常診療の中で使用している[1)]。また、2015年に厚生労働省が策定した「医薬品産業総合戦略」において「漢方薬が西洋薬にはない効果・効能をもち、わが国の医療において重要な役割を担っている」との認識が示され、さらに同年発表された「がん対策加速化プラン」においても「漢方薬を用いた支持療法に関する研究の推進」が謳われるなど、漢方方剤はわが国の医療の中で重要な役割を担う薬剤となっている[2)]。

一般に、医療従事者にとって、医薬品の適正使用のための情報源は添付文書やそれを補完する医薬品インタビューフォーム（IF）である。現在、医療用漢方エキス製剤は148処方を数え、13社が製造し、その製品数（販売商品数）は608製品に上る[3)]。それぞれメーカーが作成したIFが存在するものの、その記載内容は化学薬品と異なる。例えば、漢方エキス製剤の承認過程を反映するように「治験に関する項目」には多くの場合記載がなく、また「薬効薬理に関する項目」や「薬物動態に関する項目」についてもほとんどの場合において「該当資料なし」とされている。漢方方剤は複数の生薬を配合する多成分系の薬剤であり、含有する化合物は数百に上り、活性本体も複数存在すると考えられる。それら含有成分の相加・相乗作用の結果、処方としての作用が発現すると考えられるため、薬効薬理や薬物代謝に関して化学薬品のようなデータを揃えることは不可能であるとされてきた。それ故、漢方方剤の薬理学的基盤を整備するには、まず各処方をそれぞれ「一つの薬物」と見なし、個体動物を用いた薬理試験を通じて、その薬能（効能・効果）を数値化し、薬理作用という科学の概念に落とし込むという方略がとられており、化合物レベルでの作用機序についてはまだまだ不明な点が多い。

一方で、漢方方剤による副作用については、処方レベルより構成生薬に由来するものとして注意喚起されることが多く、経験的に知られるもののほか、主成分の薬理作用の延長線上に生じるとされるものがいくつか知られている。その代表的なものが甘草による偽アルドステロン症であり、原因となる成分はグリチルリチンである。われわれは、効能・効果ではなく、副作用に注目してみれば、漢方方剤を成分レベルで解析し、適正使用に資するデータを分子レベルで集積することができると考え、当該生薬配合処方における成分含量・抽出率、血中濃度などを測定し、各処方における特徴を明らかにする試みを続けている。すなわち、甘草に起因する偽アルドステロン症についてはアグリコンであるグリチルレチン酸が関わるとされていたものの、近年ではその代謝物が関わることも報告され[4)]、結論はまだ導き出されていない状況ではあるが、われわれは甘草配合処方におけるグリチルリチンの抽出率[5)]やマウス盲腸内容物を用いた加水分解効率、さらには主代謝物であるグリチルレチン酸の血中濃度に及ぼす構成生薬の影響を検討し、他の配合生薬による影響を明らかにしようとしている。その中で、抽出時の液性を酸性に傾ける生薬との配合によりグリチルリチンの抽出率が低下すること、またグルクロン酸を糖部にもつ配糖体による加水分解阻害などを明らかにしており、さらに現在各エキスの消化管輸送能などに

ついても検討を重ねている。

さらに、副作用が懸念されるもう一つの生薬として麻黄を取り上げ、本研究を開始した。麻黄は、マオウ科 *Ephedra sinica* や *E. intermedia*、*E. equisetina* の地上茎を用いる生薬で、フェネチルアミンアルカロイドのエフェドリンやプソイドエフェドリンなどを含有し、発汗、解熱、止咳、利尿、鎮痛などに用いられる。主成分であるエフェドリンは、交感神経興奮作用をもち、アドレナリン作動薬として作用するため、過量により興奮、心悸亢進、発汗過多、不眠などの副作用を生じる。そのため、循環器系に既往歴のある患者や重症高血圧、甲状腺機能亢進症の患者においては頻脈などの症状がでることや悪化することが知られている。

麻黄は医療用および一般用漢方エキス294処方のうち、JAPIC医療用医薬品収載処方を加えた34処方（朮の種類の違いを加味して38品目）に配合されており、エフェドリン・プソイドエフェドリンの含量や抽出率、経口投与時の血中濃度などに及ぼす構成生薬の影響をすべて検証することとした。本研究課題においては、とくにマウスに経口投与した際のエフェドリン・プソイドエフェドリンの血中濃度推移の解析を進めることとした。

2. 実験方法

2−1. 材料

麻黄をはじめとする生薬については、（株）ツムラおよびその他名古屋市場品として（有）大幸生薬より購入し、ロットを揃えて一連の検討を行った。標準品としてのプソイドエフェドリン塩酸塩は東京化学工業株式会社より購入し、エフェドリン塩酸塩は（1R,2S）−ノルエフェドリン（東京化学工業株式会社）より誘導して用いた。その他、分析に用いた試薬は特級およびHPLC用を用いた。

2−2. 麻黄配合漢方エキスの調製とエフェドリン・プソイドエフェドリン含量の測定

麻黄配合漢方処方については、「日本薬剤師会編漢方業務指針（じほう社）」に準拠して調製した。すなわち、各処方の構成生薬を量り取り、600mLの精製水を加えて電気煎じ器（HMJ-1000N、ハリオ社）を用いて60分間加熱抽出した。得られたエキスを凍結乾燥し、得られた乾燥エキスは使用するまで冷凍保存した（−35℃）。

各エキスのエフェドリン・プソイドエフェドリン含量は日本薬局方に準拠してpaired-ion法によるHPLC分析にて定量した。凍結乾燥エキス（50 mg）を正確に秤量し、精製水（50 mL）に溶解させ、0.45μmメンブランフィルター処理してHPLCサンプルとした。分析に用いたHPLCはShimadzu LC-10Avp（島津製作所）であり、検出器はUV-VIS検出器SPD-10Avpを、カラムはInertsil-ODS-3（5μm、4.6 mm I.D.×150 mm、ジーエルサイエンス株式会社）を用いた。移動相は0.5% SDS−アセトニトリル−リン酸（65：35：0.1）を用い、流速は1.0 mL/min、検出波長は210 nm、カラム温度は40℃とした。

2−3. 経口投与後の血中濃度推移の測定

実験動物として雌性BALB/cマウス（7〜8週齢、日本SLC）を用いた。18時間絶食し、それぞれ麻黄配合漢方エキスをヒト常用量の10倍量として単回経口投与し、その0.25、0.5、1、2、4時間後に1.5%イソフルラン麻酔下で下行大静脈より採血し、得られた全血を室温で30分以上放置した後、1,710×g、15分の遠心処理を行って血清とした（−35℃保存）。得られた血清0.1 mLに内部標準としてジフェンヒドラミン（1ng）を添加し、アセトニトリル（1.4mL）を加えて除タンパク処理をした。4℃、19,900×g、10分間の遠心処理を行い、上清1.35 mLをとって減圧乾固した後、残渣を50%メタノール（0.1mL）に溶解し、その5 μLをLC-MS/MS分析に供した。LC-MS/MSはShimadzu prominence/SCIEX API4000を用い、カラムはZORBAX SB-C18（3.5μm、2.1 mm I.D.×100mm）を用いた。移動相は（A液）0.1% ギ酸と（B液）アセトニトリルのグラジエント溶媒を用い、0−4 minはB液1%、4−9 minでB液30%、9−10 minでB液60%、10−13minでB液5%となるように設定した。流速は0.4 ml/min、カラム温度は40℃、イオン化法はESI

(positive ion mode) でイオン源温度は600℃とした。

2－4. 統計処理

麻黄配合漢方エキスの麻黄配合量やエフェドリン・プソイドエフェドリン含量と薬物動態パラメータ（Cmax、$AUC_{0\text{-}4}$）との相関解析にはPeasonの相関解析を用いた。

3. 結果および考察

3－1. 麻黄配合漢方エキス中のエフェドリンおよびプソイドエフェドリン含量について

作製した麻黄配合漢方エキス34種（38品目）のエフェドリンおよびプソイドエフェドリン含量は概ね配合生薬量とよい相関を示し、構成生薬による各成分の抽出率に及ぼす影響はほとんどないことが示唆された。これまでに、代表的な甘草配合漢方エキス25種のグリチルリチン含量について測定した結果[5]から、エキスのpHによる抽出率への影響が認められており、アルカロイドであるエフェドリンやプソイドエフェドリンの抽出においてもpHの影響があるかもしれないと想像していたものの、ほとんど影響は観察されなかった[6]。

3－2. 麻黄配合漢方エキスのマウスへの経口投与後の血中エフェドリンおよびプソイドエフェドリン濃度推移について

われわれは麻黄附子細辛湯や小青竜湯のアレルギー性鼻炎におけるくしゃみ行動の抑制を雌性BALB/cマウスを用いて検討しており、それぞれ抗アレルギー作用を報告している。エフェドリンやプソイドエフェドリンの血中濃度とそれぞれの血中濃度推移を考察するためにも、血中濃度推移の測定に雌性BALB/cマウスを用いることとした。尚、予備的に雌雄による性差を検討してみたが、血中濃度推移において有意な差は認められていない。

これまでに19処方の血中濃度を検討しており、今回は6処方追加することができた。先に定量していた19処方についても検量線を精査し、一部精度を欠くポイントがあることが判明したことから、その再測定も本年度の実験の中で行うことができ、計25処方の血中濃度推移を明らかにすることができた。すべての処方において、両化合物は投与後0.25から1時間にCmaxを迎え、その後4時間には血中から消失した。また、両化合物ともにCmaxと$AUC_{0\text{-}4}$の間に高い直線性が認められ、胃もしくは小腸から速やかに吸収され、肝臓などでの代謝を受けることなく、速やかに排泄されることが推定される。一方、麻黄配合量と両化合物のCmaxや$AUC_{0\text{-}4}$との間の相関分析においては、概ね配合麻黄量に応じた血中濃度が示されたが、もっとも処方数が多い麻黄4 g配合処方ではCmaxにおいて最大約4倍、$AUC_{0\text{-}4}$において最大約8倍の差が観察されており、処方による吸収率に差が生じていることが明らかとなった。この差異については、共存する他の構成生薬の影響であると考えられることから、現在25処方まで進んできた解析を34処方まで拡大するとともに、エフェドリンやプソイドエフェドリンの吸収に影響を与える生薬を同定していきたいと考えている。

4. 参考文献

1）漢方薬処方実態調査（定量）、日本漢方生薬製剤協会（2011年9月18日）、https://www.nikkankyo.org.serv/pdf/jittaichousa2011. pdf

2）医薬品産業強化戦略～グローバル展開を見据えた創薬～、厚生労働省（2015年9月4日）、https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10801000-IseikyokuSoumuka /0000110794. pdf

3）医療用漢方製剤2024－148処方の添付文書情報－、日本漢方生薬製剤協会医療用漢方製剤委員会有用性研究部会、(2024年8月8日)、https://www.nikkankyo.org/seihin/seihin1.htm

4）Ryota Sakoda, Kan'ichiro Ishiuchi, Tetsuhiro Yoshino, Yuna Tsunoo, Takao Namiki, Keiko Ogawa-Ochiai, Kiyoshi Minamizawa, Koichi Fukunaga, Kenji Watanabe, Toshiaki Makino, 3-epi-18 β-Glycyrrhetinic Acid or Its Glucuronide, the Metabolites of Glycyrrhizinic Acid with Individual Differences, Correlated with Diagnostic Marker for Licorice-Induced Pseudoaldosteronism in Humans. Drug Metab

Dispos, 52:1407 – 1416 (2024).

5) Mitsuhiko Nose, Momoka Tada, Rika Kojima, Kumiko Nagata, Shinsuke Hisaka, Sayaka Masada, Masato Homma, Takashi Hakamatsuka, Comparison of glycyrrhizin content in 25 major kinds of Kampo extracts containing Glycyrrhizae Radix used clinically in Japan, J Nat Med, 71:711 – 722 (2017).

6) Mitsuhiko Nose, Risa Kobayashi, Momoka Tada, Shinsuke Hisaka, Sayaka Masada, Masato Homma, Takashi Hakamatsuka, Comparison of ephedrine and pseudoephedrine contents in 34 Kampo extracts containing Ephedrae Herba used clinically in Japan, J Nat Med, 77:476 – 488 (2023).

〔助成金対象研究報告〕⑤

題目：和漢薬のがん免疫療法に対する補強効果

研究代表者：愛知医科大学　研究創出支援センター　教授（特任）鈴木　進

研究協力者：愛知医科大学　医学部　耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座　教授（特任）小川徹也

【背景と目的】

がん免疫療法は、ニボルマブ（抗PD-1抗体）、イピリムマブ（抗CTLA4抗体）をはじめとする、免疫チェックポイント阻害抗体医薬の登場により、飛躍的に臨床開発がすすみ、がん治療において不可欠となっている。しかしながら、臨床効果は、適用症例に対して20-30%であり、様々な化学療法剤、分子標的薬との併用が試みられたが、治療効果の目立った改善には至っていないのが現状である。免疫チェックポイント阻害薬の他に、がん免疫治療法として、抗体医薬、CAR-T療法が標準治療として一般化しており、いずれも、不応答症例も多く、効果的な併用薬の探索には関心が高い。

十全大補湯や補中益気湯，人参養栄湯といった和漢薬は、様々な免疫調整作用があり、がん、感染症、慢性炎症などに対して効能を示す。これまでに、多くの作用機序に関わる研究が行われ、主に、マクロファージ、NK細胞を活性化することや、免疫抑制性細胞のひとつである骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）に対して機能阻害作用が示されている他、様々な免疫学的効能が報告されている（1-3）。また、分子生物学的な作用機序に対する研究も盛んとなっている。このように和漢薬は、免疫を賦活化する作用を有すると考えられており、様々な疾患に対する治療の補剤として需要が高い。

しかしながら、上述の免疫療法との併用ついての研究報告は限られており、当面の課題である。これまでに我々は、免疫療法においてエフェクター細胞として直接腫瘍細胞の傷害にかかわる細胞傷害性T細胞（CTL）、NK細胞の傷害活性に影響を与える化学療法剤、分子標的薬の検討を行い、細胞傷害活性に対して増強効果をもたらすことをin vitro培養系を用いて明らかとしてきた（4-8）。そこで今回、がん細胞に対して直接エフェクター細胞として作用するCTLの細胞傷害活性を増強する効能を和漢薬（十全大補湯，補中益気湯，人参養栄湯）が有するかどうか上述の研究実績を得たin vitro細胞傷害測定系を用いて検討した。和漢薬は、様々な効能を持つ物質の集合体であり、その効能は、他の免疫細胞など様々な体内の細胞、組織に作用して初めて生ずる可能性もあるが、作用機序を明確にするため今回はエフェクター細胞に対する直接的影響にフォーカスした。

【材料および方法】

1．標的細胞の調製

口腔癌由来細胞株HSC-2, HSC-3, HSC-4にレンチウイルスベクター（pLVSIN-CMV Neo_pp65-TMT）を用いて、サイトメガロウイルスpp65抗原（CMVpp65）を疑似がん抗原として強制発現させたHSC-2pp65, HSC-3pp65, HSC-4pp65をそれぞれ調製した（4）。

2．CMVpp65特異的CTL（pp65-CTL）の調製

健常人由来末梢血から、フィコールを用いた比重遠心法により末梢血単核球（PBMC）を分離した後、pp65エピトープペプチド（HLA-A24; QYDPVAALF aa 341-349）を加えた培地で二週間培養し、pp65-CTLを誘導した。さらに、HSC-3pp65と共培養後、活性化の結果pp65-CTL上に特異的に発現するCD137を指標とし、磁気ビーズを用いてpp65-CTLを選択的に単離した。単離したpp65-CTLの純度をAPC-Cy7標識CD8モノクローナル抗体とAPC標識HLA-A24 pp65 tetramerで染色し確認した。

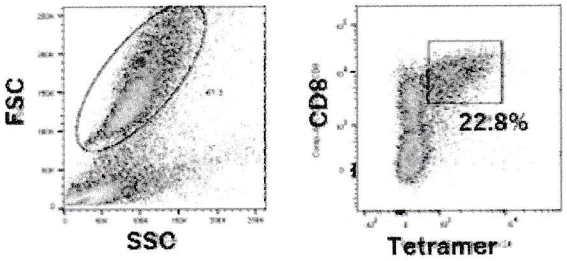

図1 調製したpp65-CTL

CD8+teramer+細胞率 22.8% と比較的純度の高いpp65-CTLを調製できた（図1）。（培養前のPBMCにおけるCD8+teramer+細胞率は0.01％以下であった[data not shown]）。

3．和漢薬のCTL傷害活性に対する増強効果

十全大補湯，補中益気湯，人参養栄湯（ツムラ順天堂）を10mg/ml から10倍段階希釈した濃度となるように添加したウシ胎児血清を含む培地（RPMI1640[Gibco], AlyS505N[細胞科学研究所]）中で、調製した標的細胞を1週間培養し、細胞毒性を示す限界の濃度を最初に決定した。次に細胞傷害を示さない最上限の濃度から段階希釈した培地中でpp65-CTLと、標的細胞をエフェクター：ターゲット比を1：5とし５日間96穴プレートにて共培養した。細胞傷害活性によりプレート表面から剥離した死細胞とpp65-CTLをリン酸緩衝液（PBS）で洗い流した後、残った生細胞相対数をWST-1アッセイにて測定し、間接的に細胞傷害活性を評価した。さらに、同様の共培養系を用いて、CTLにおいて産生されるIFN γ量に対する和漢薬の影響についても検討した。

4．和漢薬のCTL誘導、増殖に対する増強効果

健常人由来PBMCに、pp65エピトープペプチド（HLA-A24; QYDPVAALF aa 341-349）及び和漢薬を加えた培地で二週間培養し、pp65-CTLを誘導した。また、誘導したpp65-CTLと、HSC3pp65 を共培養し、pp65-CTLを増殖させた、これらの検討により、和漢薬の、CTL誘導、増殖に与える影響について評価した。

【結果と考察】

1．和漢薬のCTL傷害活性に対する増強効果

まず、標的細胞 HSC3pp65 に対する、和漢薬の直接的毒性について検討した。96ウェルプレートに、HSC3pp65をウェルあたり、10e6/ml の細胞濃度で100 uLずつ巻き込み、各和漢薬を１mg/mLから5倍段階希釈濃度で加え、１週間培養後、WST-1 assayにて、二重測定で生細胞数を相対的に測定した。３回同様に測定した結果を図２に示した。いずれの和漢薬においても、0.1mg/mLを越えると、生細胞率が著しく低下する傾向にあった。

次に、96ウェルプレート1ウェル（100uL）あたり、調整したpp65-CTL 4X10e3と標的細胞HSC3pp65 2X10e4をで混和し（E/T=0.25)、標的細胞HSC3pp65に対して直接的な毒性を認めないぎりぎりの濃度である100ug/mL から２倍段階希釈濃度で各和漢薬を添加後、５日後にHSC3pp65 の生細胞率を測定した。同じ測定を２回行い、図３に結果を示した。pp65-CTLとHSC3pp65を共培養したとき（CTL+）の生細胞率と、HSC3pp65のみ培養したとき（CTL-）の生細胞率の差が、CTLの細胞傷害活性として示されている。もし和漢薬にCTL

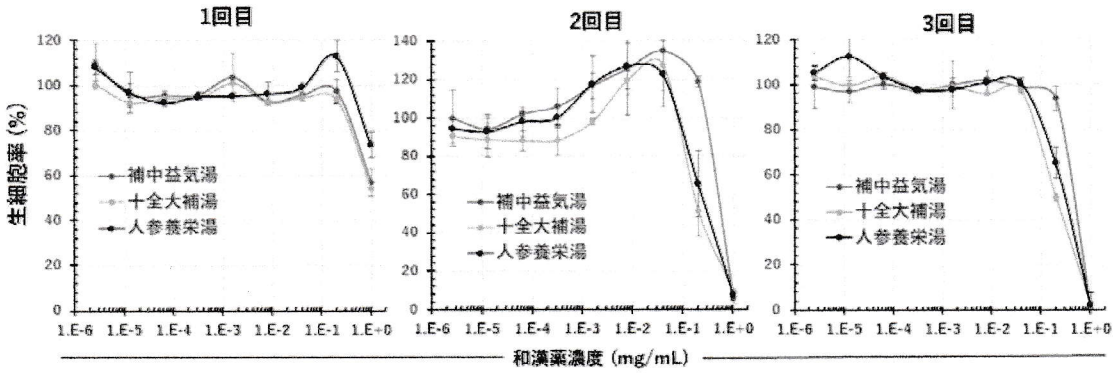

図2 各和漢薬の標的細胞HSC3pp65に対する毒性

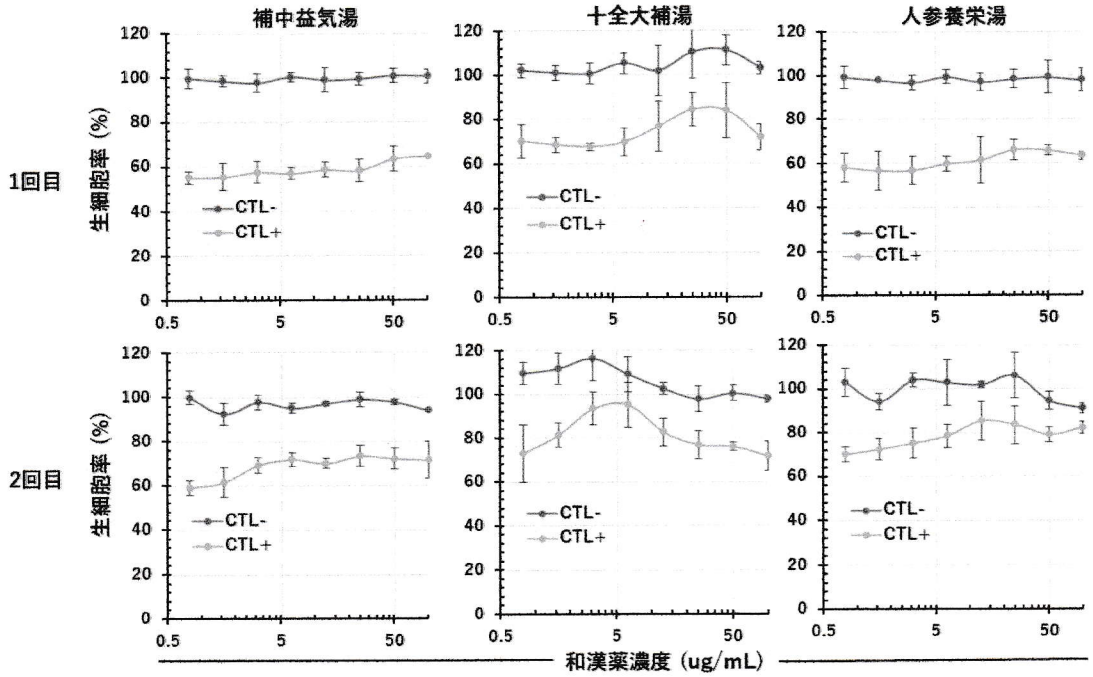

図3 各和漢薬のpp65-CTL細胞傷害活性に与える影響

の傷害活性に対する増強効果があれば、濃度依存的にこの差が拡大することが想定されるが、にいずれの和漢薬においても、差が拡大することはなく、傷害活性に対する増強効果は認められなかった。CTLの細胞傷害活性に関連して、CTLのIFN-γ産生能に与える影響ついても検討した。pp65-CTLと、HSC3pp65を共培養した後、pp65-CTL中IFN-γ陽性細胞率を測定した。和漢薬未添加のとき、pp65-CTL中IFN-γ 陽性細胞率は39.4%であったが、いずれの和漢薬においても、添加濃度依存的に陽性率が低下した、特に100ug/mL 添加により、著しく低下した（図４）。以上の結果から今回検討した和

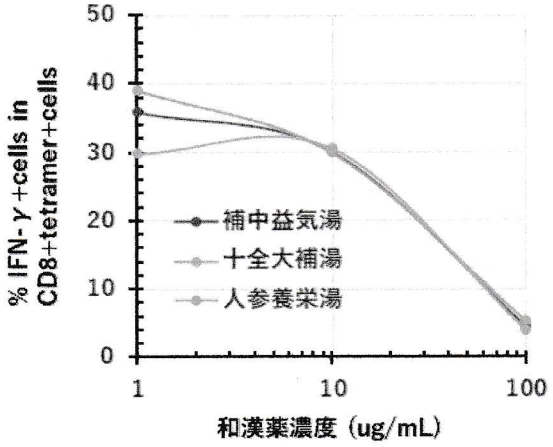

図4 各和漢薬のCTL IFN-γ産生に与える影響

漢薬のCTL細胞傷害活性に対する直接的増強効果は乏しいものと考えられた。

和漢薬のCTL誘導、増殖に対する増強効果

健常人由来PBMC 2X10e5とHLA-A24 pp65 エピトープペプチドを混合培養し、２週間後にAPC-Cy7標識CD8モノクローナル抗体と、PE標識HLA-A24 pp65 tetramer で染色した後、フローサイトメトリーにてCD8+tetramer+細胞率を測定した。同じ実験を2回行い、その結果を図５A,Bに示した。２回とも、いずれの和漢薬においても、100ug/mL添加では、リンパ球の生育が著しく抑制され全くpp65-CTLが誘導されなかった。１回目２週間後のフローサイトメトリーのサイトグラム像を見ると、補中益気湯１ug/mL, 10ug/mL添加well において、和漢薬未添加well に比べてCD8+tetramer+細胞率が若干高い傾向にあったが、well間差が大きく、誘導効果は明確とはいえなかった。十全大補湯、人参養栄湯についても、well間差が大きく評価が困難であったが、誘導増強効果は低いと思われた。２回目においてはCD8+tetramer+細胞率が１回目に比べて全体的に低値となった。1回目と同様、well間の差が大きく、評価が困難であったが、未添加と添加の間でそれほど大きな差がみられなかった。以上のことから、こ

れらの和漢薬によるCTL誘導増強効果は期待できないと考えられた。

また、培養２週間後の細胞数を測定したところ、100ug/mL 添加wellでは上述のように１回目、２回目とも、いずれの和漢薬においてもリンパ球の生育が著しく低下し、ほぼ生細胞がみられなかった。逆にいずれの和漢薬においても、１ug/mLまたは10ug/mL 添加したwell において、未添加well に比べて、数倍多くなった。特に10ug/mL 加えたwellで顕著であり、和漢薬中に含まれるなんらかの成分

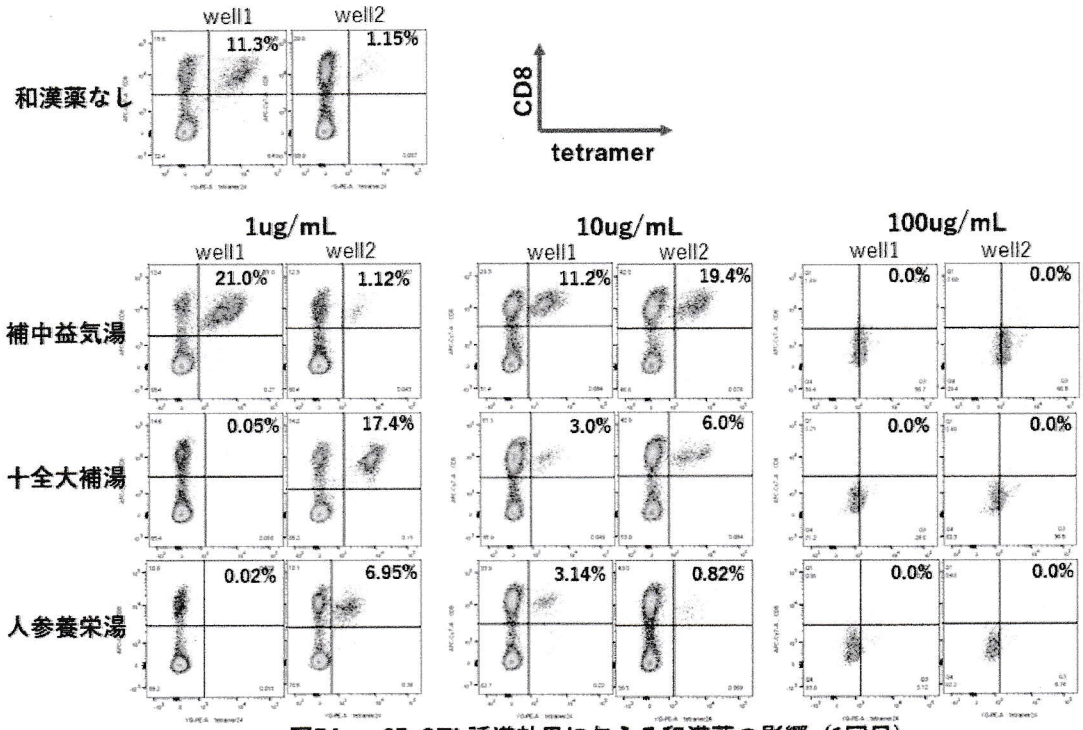

図5A pp65-CTL誘導効果に与える和漢薬の影響（1回目）

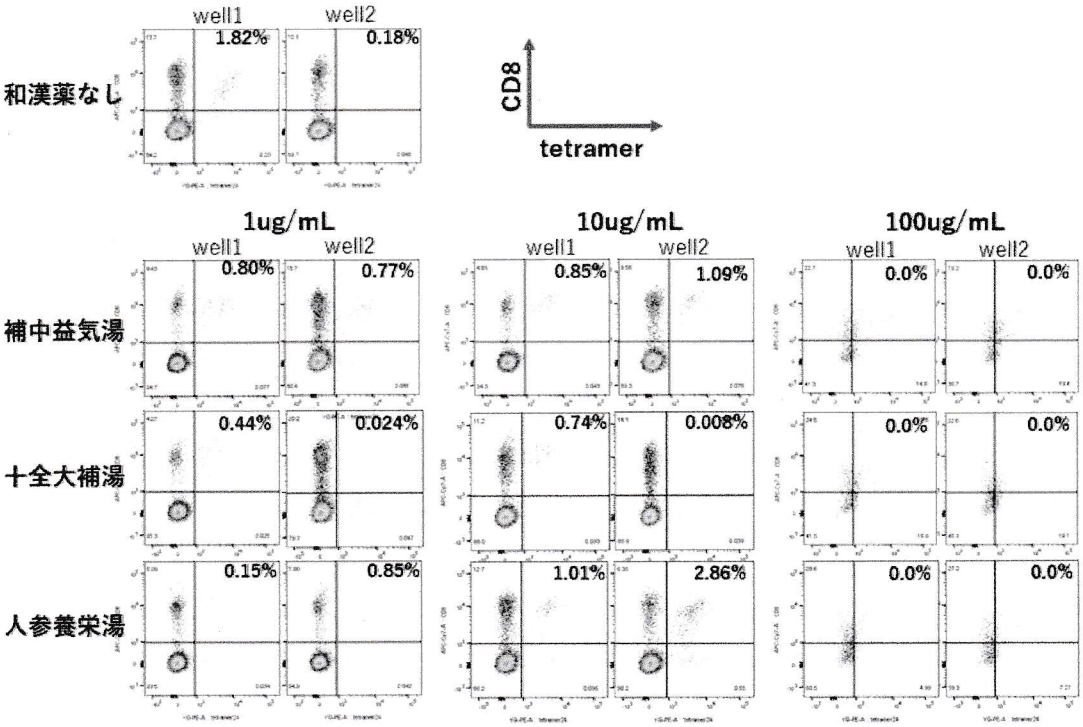

図5B pp65-CTL誘導効果に与える和漢薬の影響（2回目）

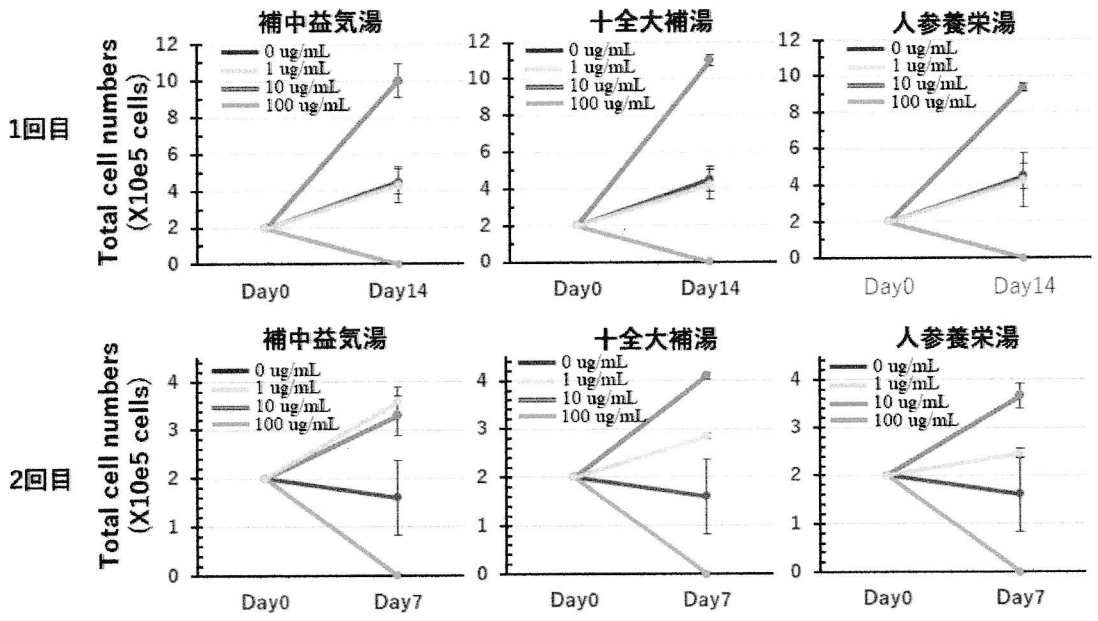

図6 リンパ球 *in vitro* 自然増殖に対する和漢薬の影響

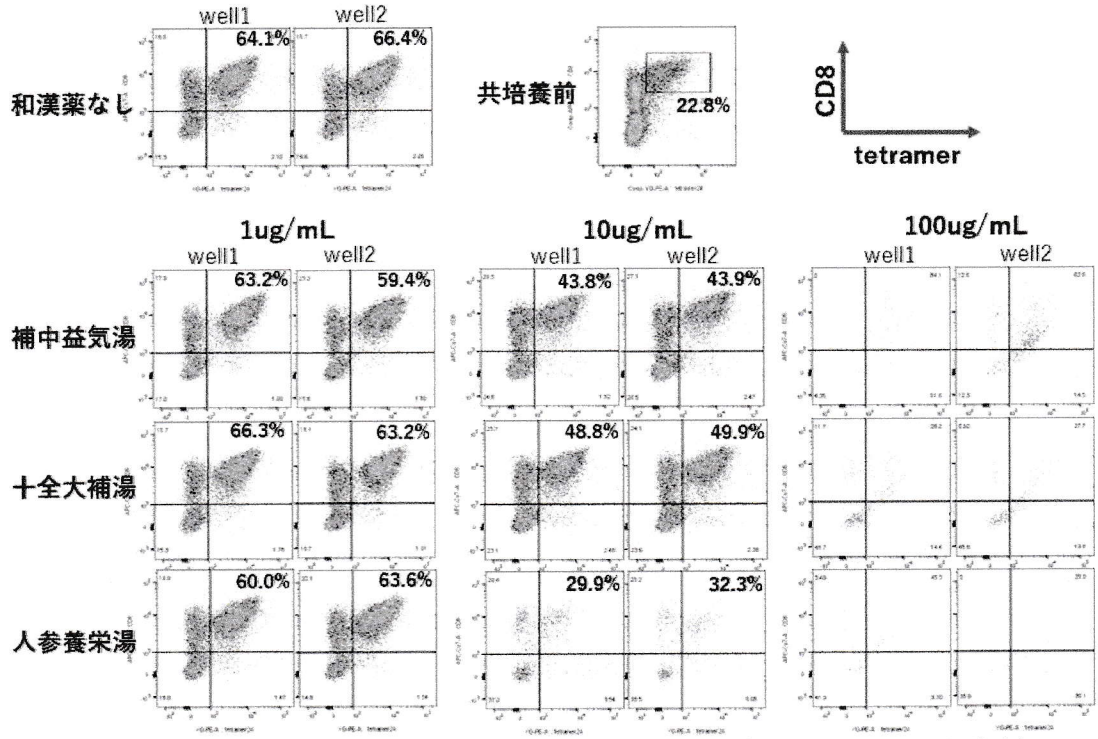

図6 pp65-CTLの増殖に与える和漢薬の影響（CD8+tetramer+細胞率）

が適量存在することで、リンパ球の非特異的な増殖効果をもたらすと考えられた（図６）。

次にin vitro調製した10e5個のpp65-CTL（CD8+tetramer+細胞率22.8）と10e5のHSC3pp65細胞を7日間共培養し、pp65-CTL特異的増殖における和漢薬の効果を検討した。図6に培養7日後のCD8/tetramer染色サイトグラム像を示した。培養前22.8%であったCD8+tetramer+細胞率は、和漢薬未添加では、65%程度に上昇し、pp65-CTLの選択的な増殖が確認された、いずれの和漢薬も、低濃度（1 ug/mL）では、未添加と同等のCD8+tetramer+細胞率を示したが、10ug/mL添加では、若干低下する傾向にあり、100ug/mLでは、強い細胞毒性を示し、CD8+tetramer+細胞率はほぼ0%となった。

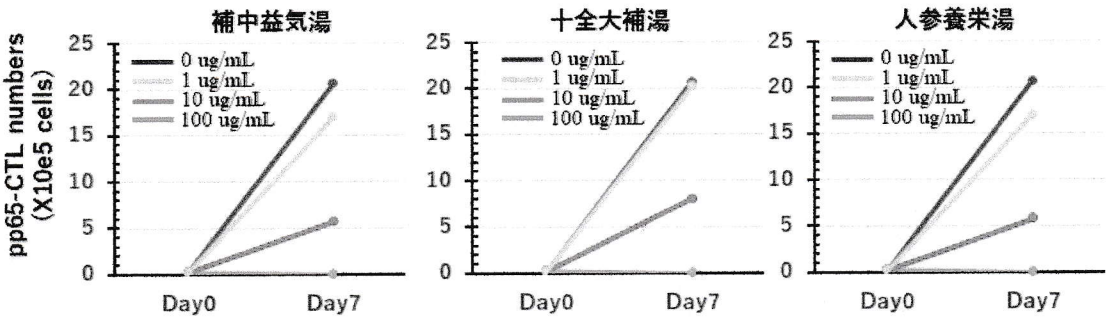

図7 pp65-CTLの増殖に与える和漢薬の影響（pp65-CTL 細胞数）

また、培養７日後のpp65-CTL細胞数を図７に示した。和漢薬未添加では、培養前2.28X10e4であったpp65-CTL細胞数は、７日後に約100倍の2X10e6個に上昇した。しかしながら、いずれの和漢薬も10ug/mL添加で、明らかな増殖低下を示し、100 ug/mLでは強い毒性を示した。

【結　語】

リンパ球に対する非特異的な増殖効果がいずれの和漢薬においても認められたが、抗原特異的な免疫機能（細胞傷害活性、増殖、IFN-γ産生、特異的CTLの誘導）に対する効果は残念ながら認められなかった。和漢薬の有効成分は体内で代謝されることにより生成されることが一般的に知られており、和漢薬エキスによる直接的な効果は乏しいものと思われた。マウスモデルを使った免疫治療との併用効果を検討するなどの試みが必要と考えられる。

【参考文献】

1．Takeno N, Inujima A, Shinohara K, Yamada M, Shibahara N et al. Immune adjuvant effect of Juzentaihoto, a Japanese traditional herbal medicine, on tumor vaccine therapy in a mouse model. Int J Oncol. 2015 Dec;47(6):2115-22.

2．Takaku S, Shimizu M, Takahashi H. Japanese Kampo medicine ninjin'yoeito synergistically enhances tumor vaccine effects mediated by CD8+ T cells. Oncol Lett. 2017 May;13(5):3471-3478.

3．Ogawa-Ochiai K, Ishikawa H, Li H, Vu Quang L, Suzuki S et al. Immunological and Preventive Effects of Hochuekkito and Kakkonto Against Coronavirus Disease in Healthcare Workers: A Retrospective Observational Study. Front Pharmacol. 2021 Nov 18;12:766402.

4．Nagai MN, Suzuki S, Yoshikawa K, Ueda R, Kazaoka Y. Adoptive immunotherapy combined with FP treatment for head and neck cancer: An in vitro study. Int J Oncol. 2017 Nov;51(5):1471-1481.

5．Murakami S, Suzuki S, Ueda R, Seto M, Takami A, et al. Combining T-cell-based immunotherapy with venetoclax elicits synergistic cytotoxicity to B-cell lines in vitro. Hematol Oncol. 2020 Dec;38(5):705-714.

6．Nakamura A, Suzuki S, Hanamura I, Ueda R, Seto M, Takami A, et al. Synergistic Effects of Venetoclax and Daratumumab on Antibody-Dependent Cell-Mediated Natural Killer Cytotoxicity in Multiple Myeloma. Int J Mol Sci. 2021 Oct 5;22(19):10761.

7．Kondo Y, Suzuki S, Ono S, Goto M, Ogawa T, Tsuzuki T, Ueda R, Nagao T, et al. Improving function of cytotoxic T-lymphocytes by transforming growth factor- β inhibitor in oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2021 Oct;112(10):4037-4049.

8．Ono S, Suzuki S, Kondo Y, Okubo I, Goto M, Ogawa T, Takahara T, Satou A, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Nagao T, Ueda R, et al. Trametinib improves Treg selectivity of anti-CCR4 antibody by regulating CCR4 expression in CTLs in oral squamous cell carcinoma. Sci Rep. 2022 Dec 15;12(1):21678.