

表 2. オウゴン中の 5 フラボンの含有率

	Baicalin (%)	Wogonoside (%)	Baicalein (%)	Chrysin 6-C-arabinoside-8-C-glucoside (%)	Wogonin (%)
1	10.7	2.8	0.3	0.6	0.1
2	14.7	4.0	0.1	0.8	0.2
3	13.0	3.0	2.2	0.9	0.6
4	14.4	4.6	0.4	0.9	0.2
5	14.9	4.5	1.2	0.9	0.4
6	13.5	4.1	0.2	0.8	0.2
7	13.0	3.7	1.0	1.0	0.4
8	16.6	5.1	0.4	1.0	0.2
9	15.0	3.7	0.2	0.8	0.1
10	11.4	3.3	0.1	0.9	0.2
11	7.9	2.6	0.2	1.0	0.2
12	16.0	4.4	0.4	0.9	0.2
13	14.6	3.6	0.2	0.7	0.2
14	14.7	3.7	0.2	0.9	0.2
15	17.1	5.0	0.2	1.0	0.2

Data are percentage (%) of the concentration of the compounds calculated on the basis of dried material (n=2-3).

n-ヘキサン抽出物
 (希硫酸試薬噴霧後, 加熱)

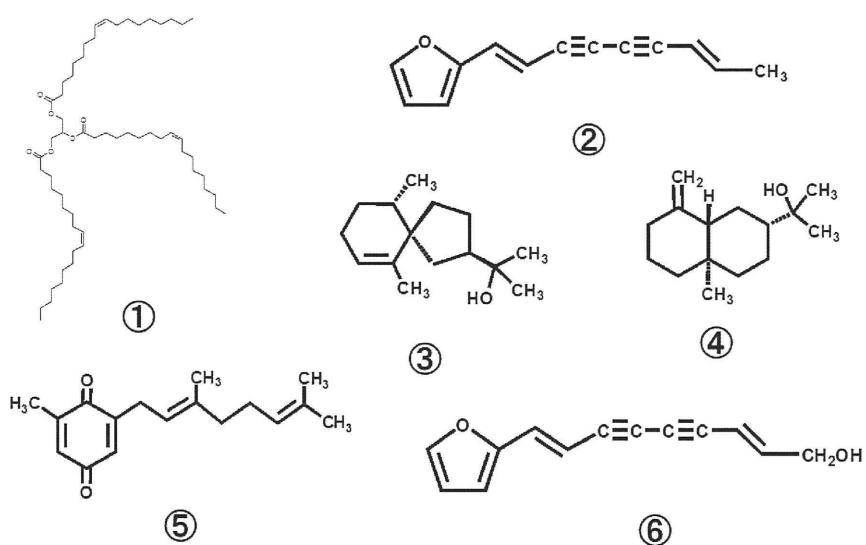
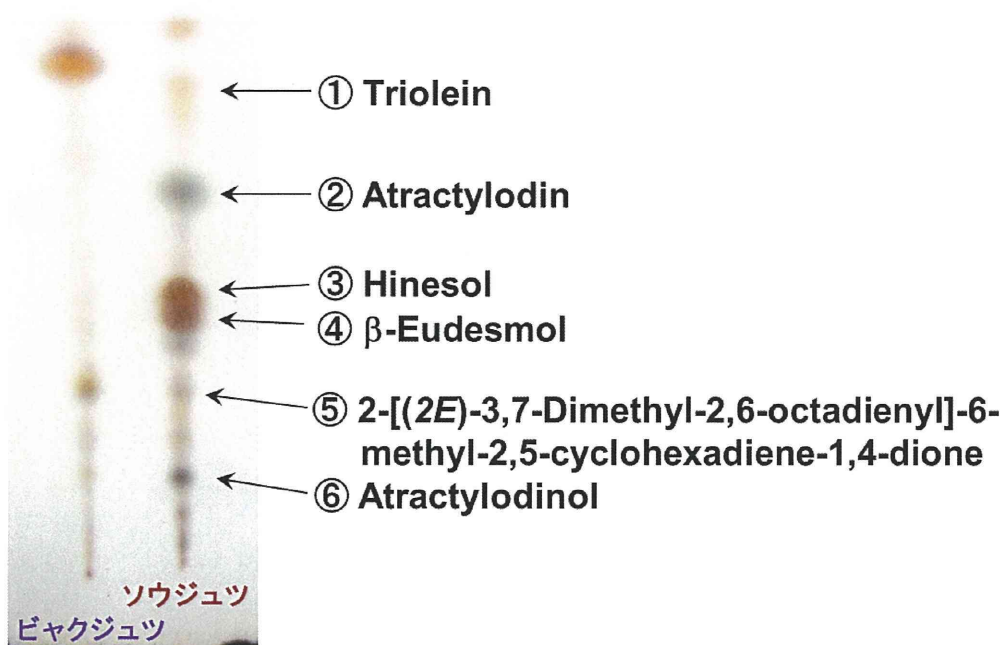


図 1. ソウジュツの TLC 分析

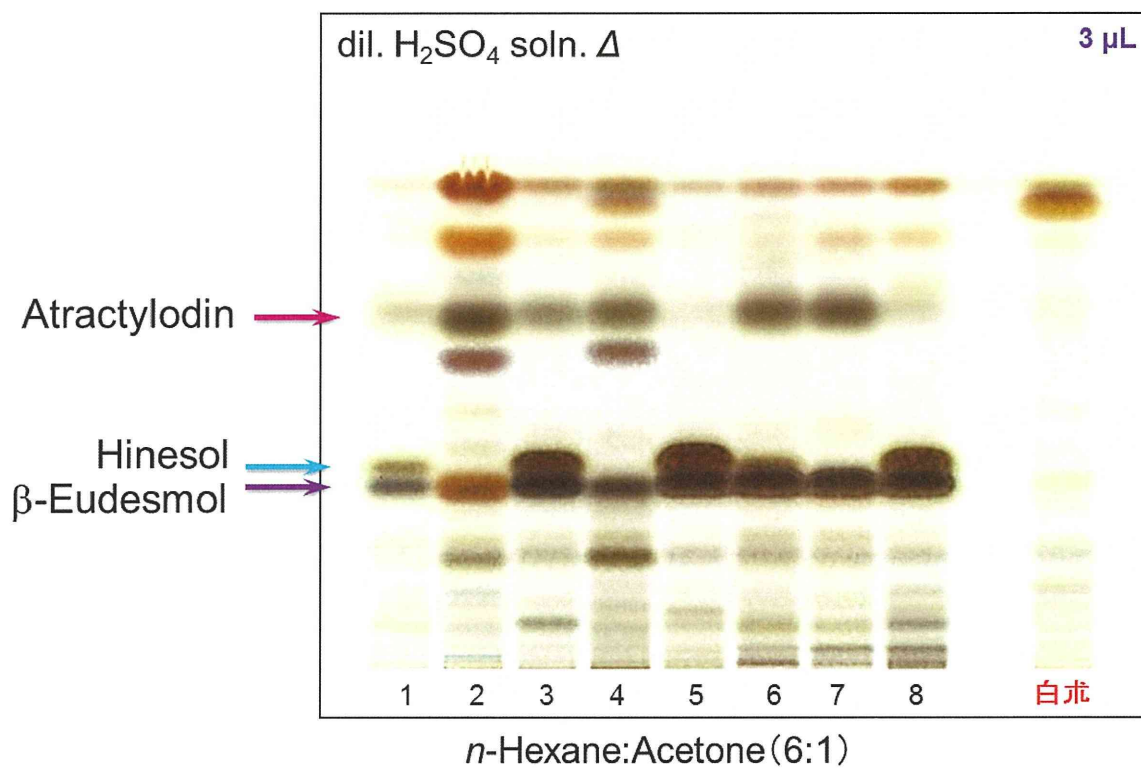


図 2. ソウジュツ市場品の HPTLC 分析

1: NIB-009, 2: NIB-010, 3: NIB-058, 4: NIB-092, 5: NIB-111, 6: NIB-148, 7: NIB-181, 8: NIB-182

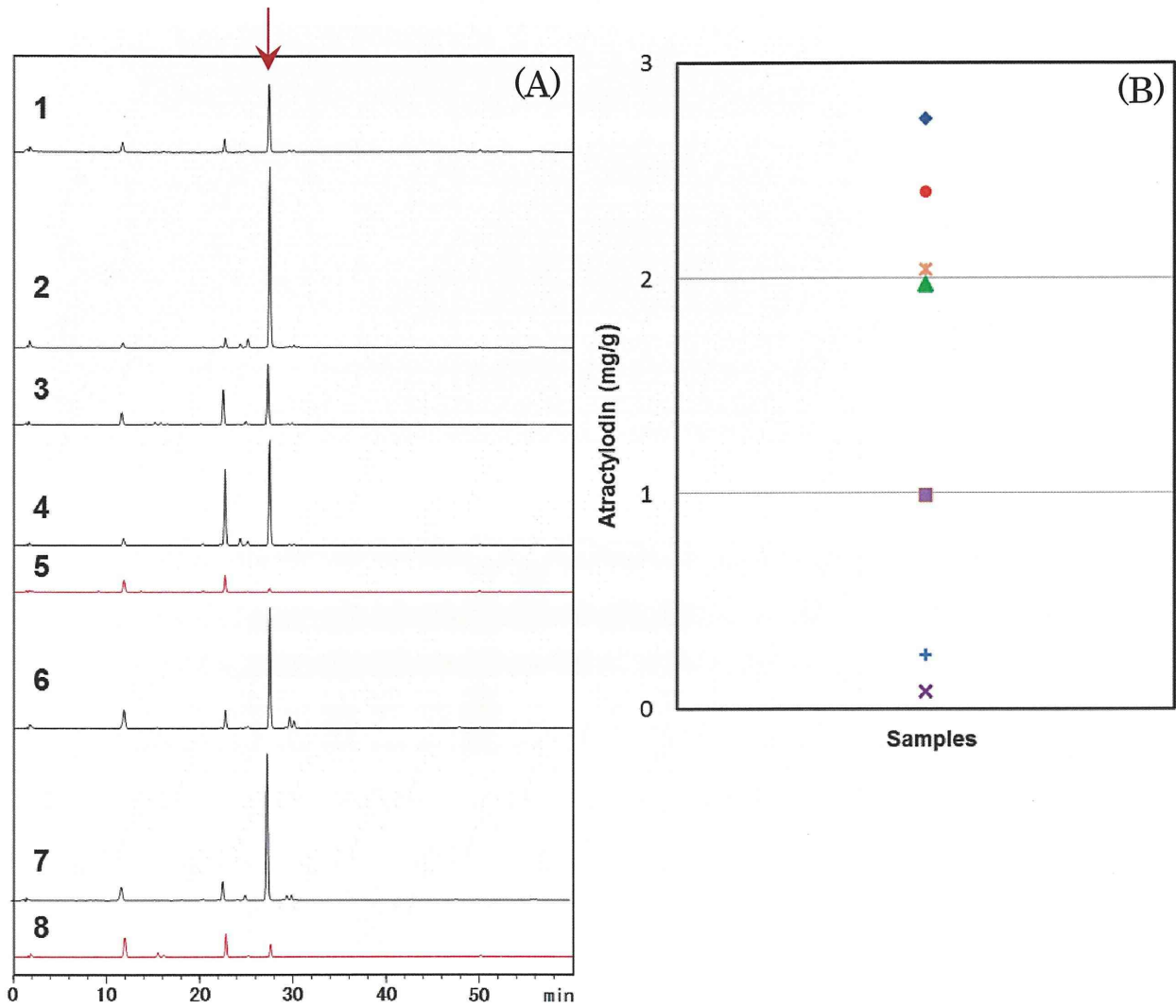


図 3. (A) ソウジュツの HPLC 分析, (B) 各ソウジュツ試料中の atrectylodin の含有量 (mg/g)

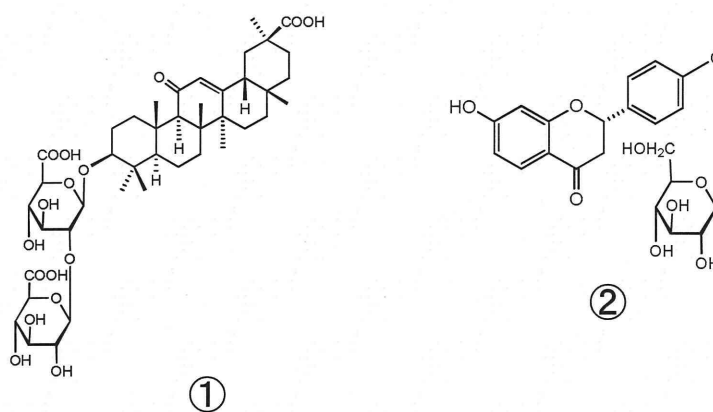
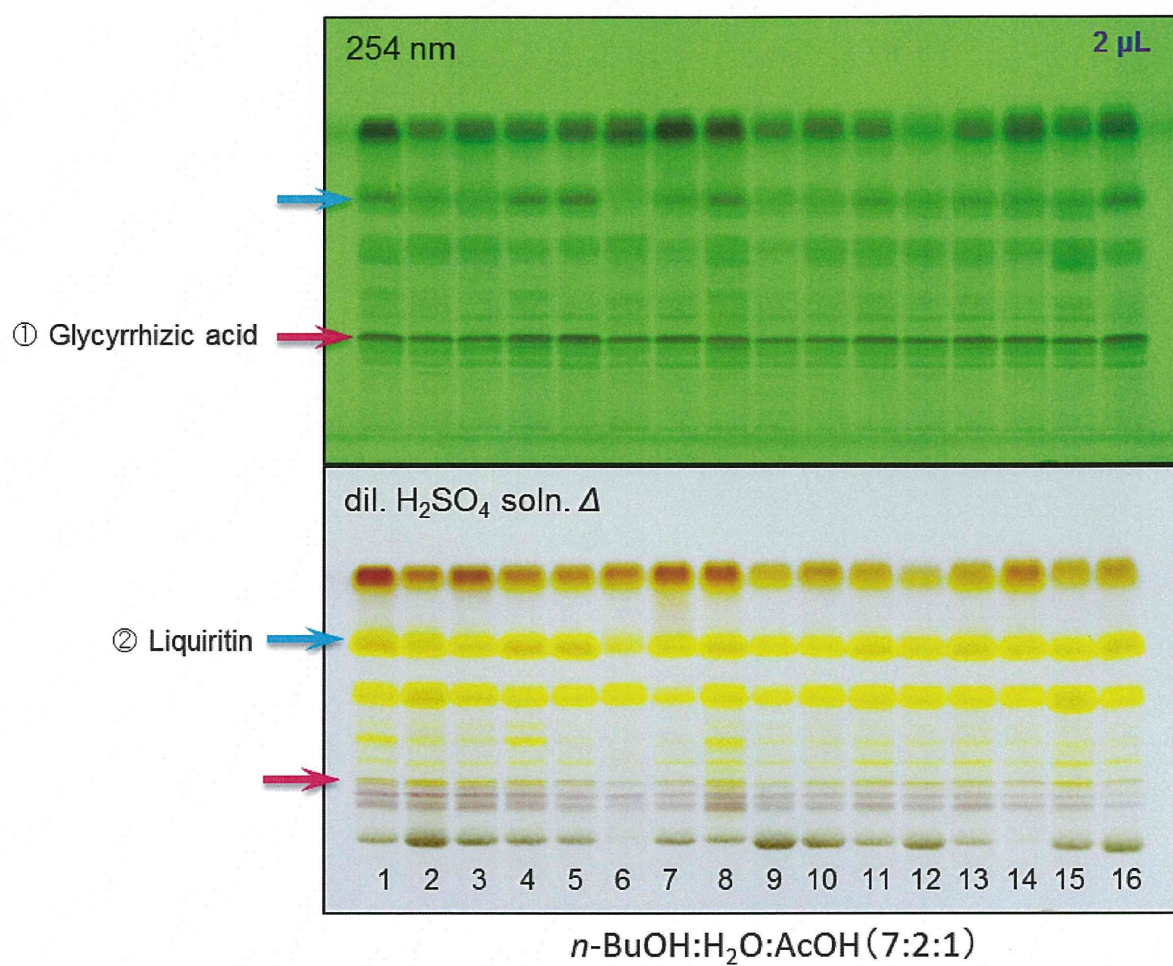


図 4. カンゾウ市場品の HPTLC 分析

1: NIB-003, 2: NIB-004, 3: NIB-005, 4: NIB-006, 5: NIB-007, 6: NIB-037, 7: NIB-038, 8: NIB-054,
9: NIB-074, 10: NIB-090, 11: NIB-107, 12: NIB-108, 13: NIB-109, 14: NIB-146, 15: NIB-168, 16: NIB-176

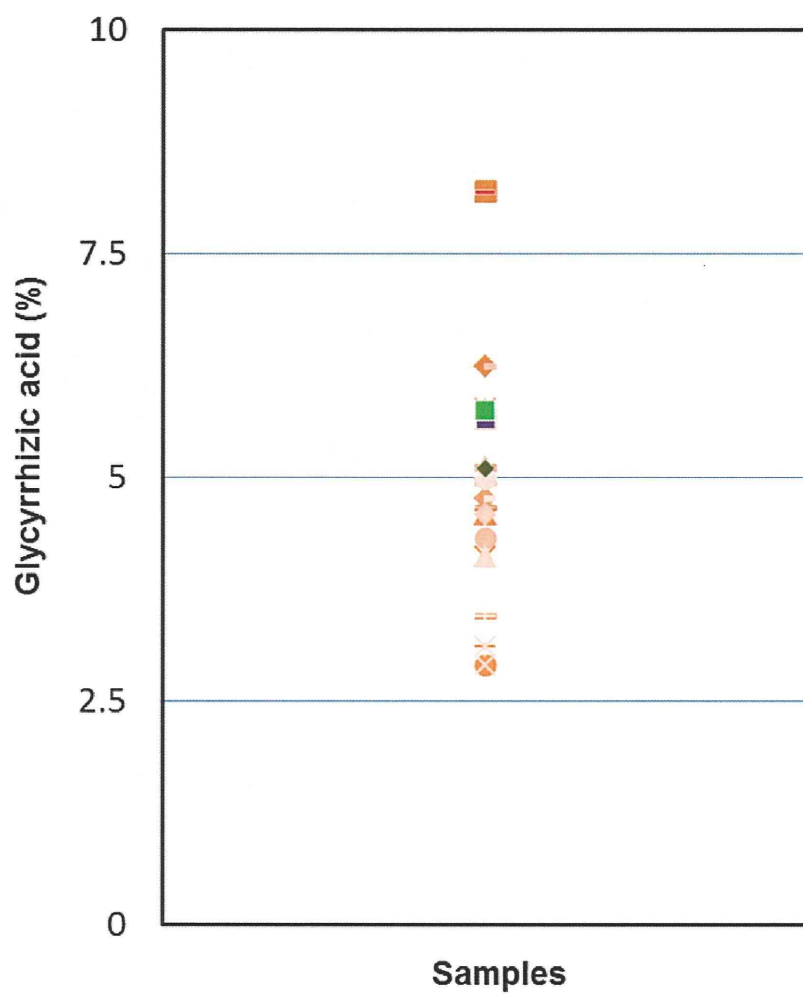


図 5. 各カンゾウ試料中の glycyrrhizic acid の含有率 (%)

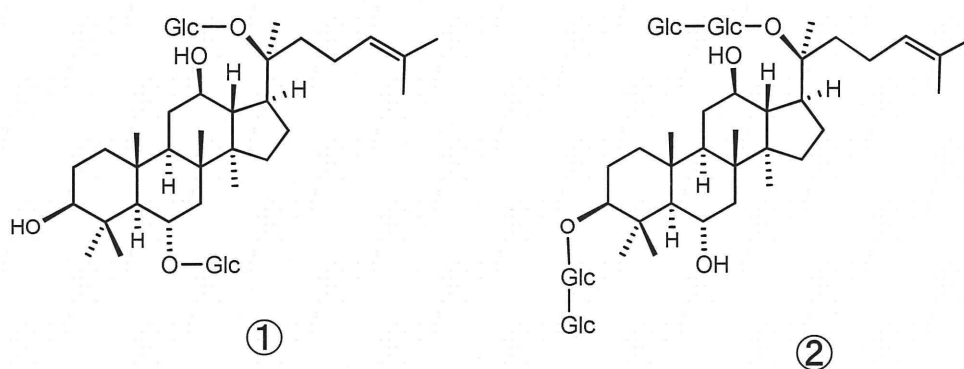
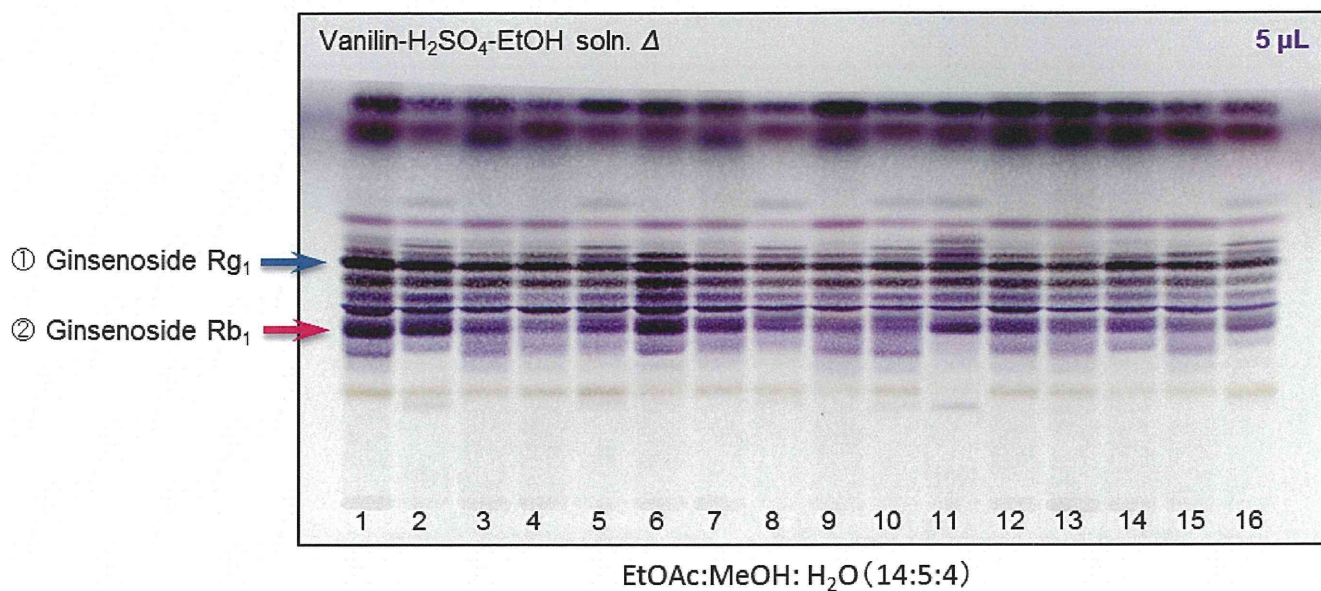


図 6. ニンジン市場品の HPTLC 分析

1: NIB-011, 2: NIB-012, 3: NIB-040, 4: NIB-056, 5: NIB-061, 6: NIB-067, 7: NIB-076, 8: NIB-077,
9: NIB-093, 10: NIB-112, 11: NIB-113, 12: NIB-114, 13: NIB-149, 14: NIB-170, 15: NIB-183, 16: NIB-184

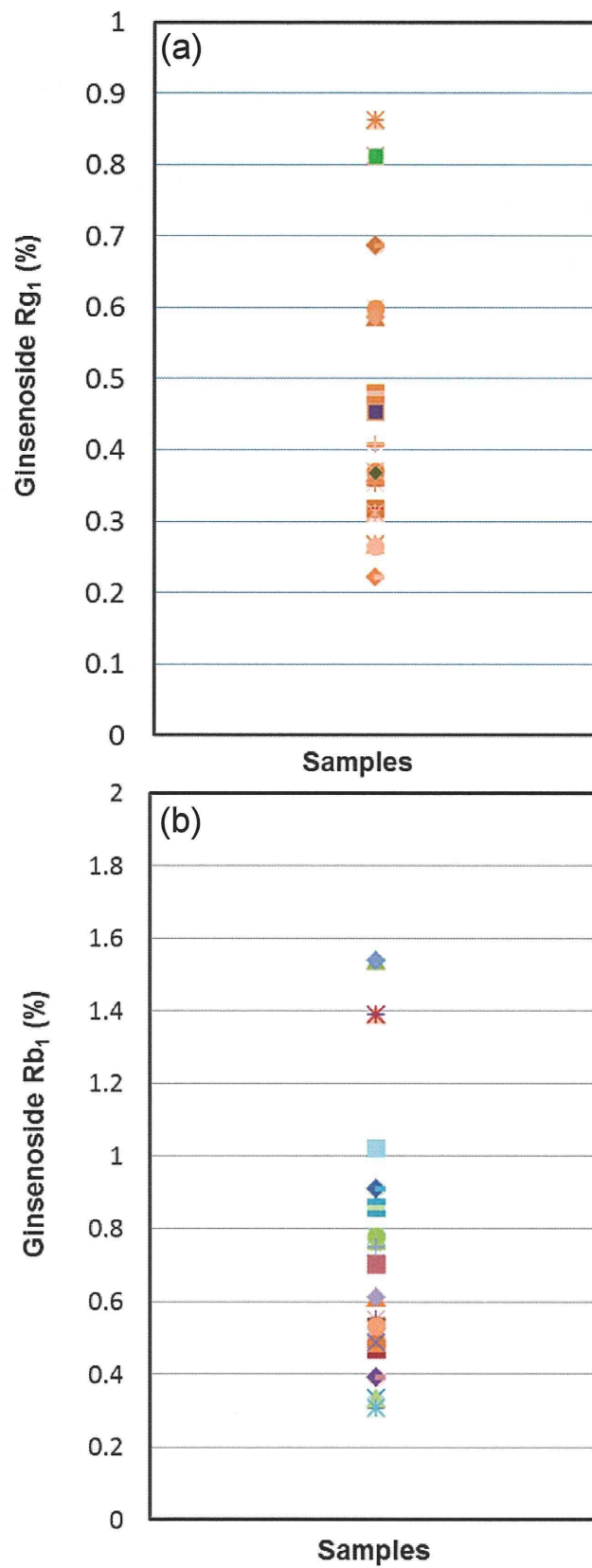
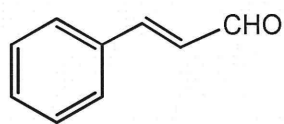
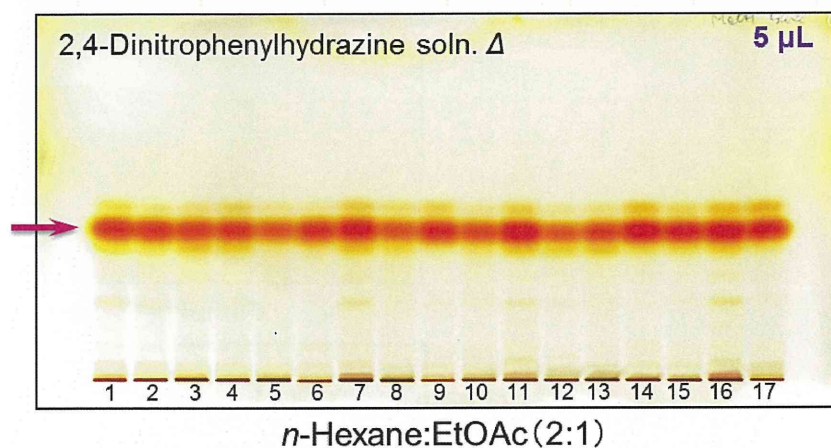
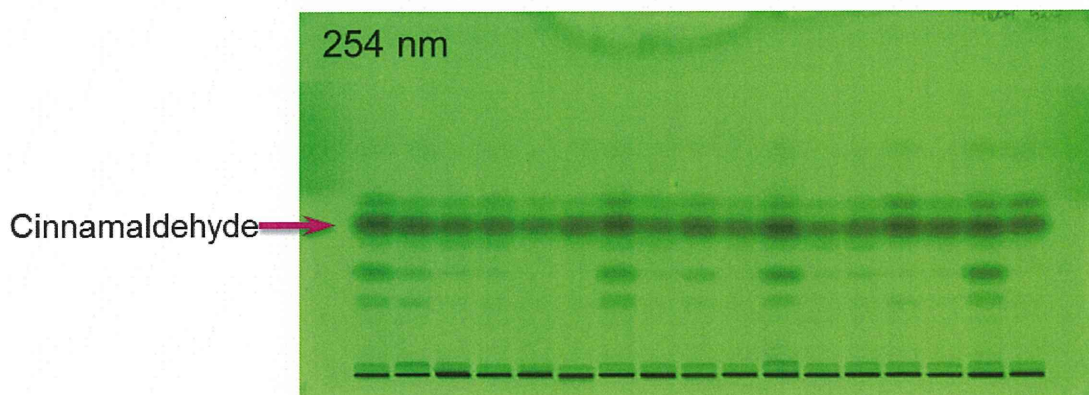


図 7. (a) Ginsenoside Rg₁, (b) Rb₁ の各ニンジン試料中の含有率 (%)



Cinnamaldehyde

図 8. ケイヒ市場品の HPTLC 分析

1: NIB-014, 2: NIB-015, 3: NIB-043, 4: NIB-062, 5: NIB-068, 6: NIB-069, 7: NIB-070, 8: NIB-078, 9: NIB-095, 10: NIB-117, 11: NIB-118, 12: NIB-119, 13: NIB-151, 14: NIB-171, 15: NIB-187, 16: NIB-188, 17: NIB-222

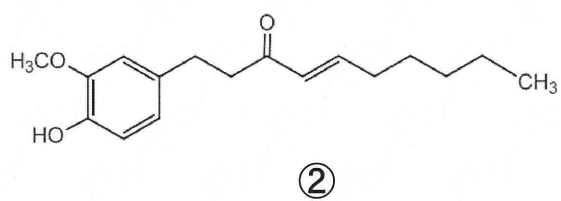
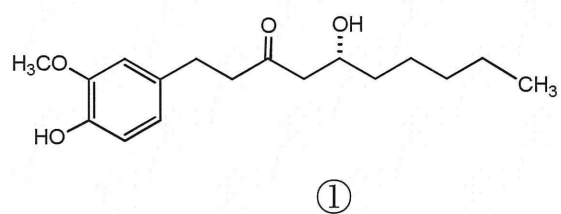
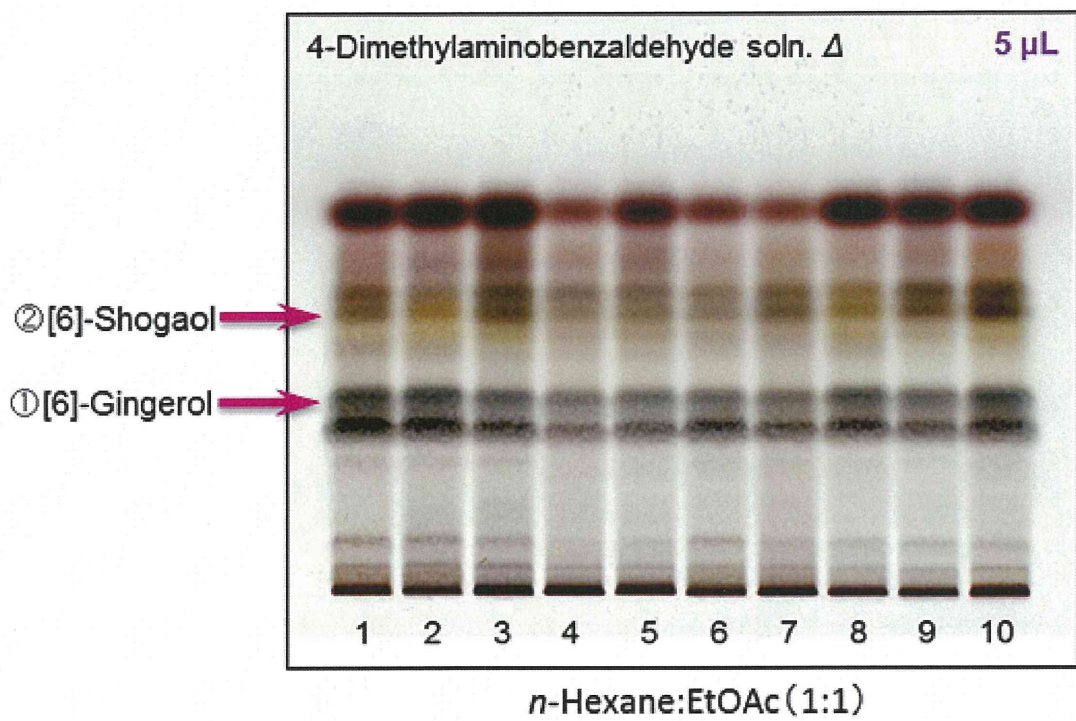


図 9. ショウキョウ市場品の HPTLC 分析

1: NIB-008, 2: NIB-039, 3: NIB-055, 4: NIB-060, 5: NIB-075, 6: NIB-091, 7: NIB-110, 8: NIB-147, 9: NIB-169, 10: NIB-179

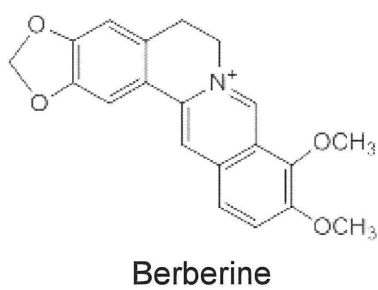
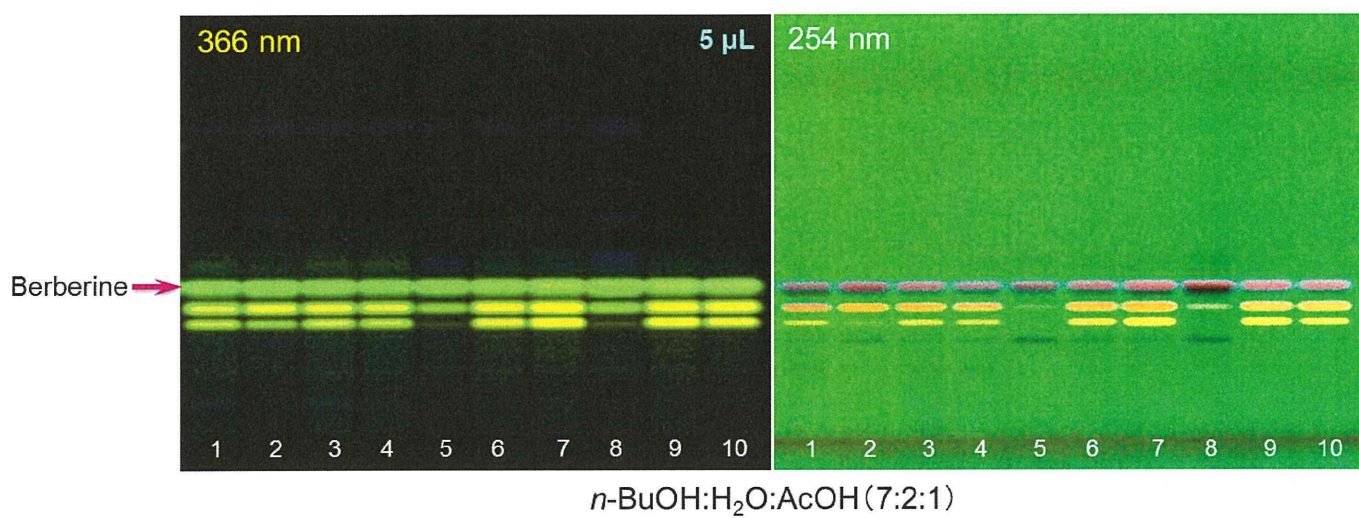


図 10. オウレン市場品の HPTLC 分析

1: NIB-013, 2: NIB-041, 3: NIB-042, 4: NIB-094, 5: NIB-115, 6: NIB-116, 7: NIB-150, 8: NIB-185, 9: NIB-186, 10: NIB-215

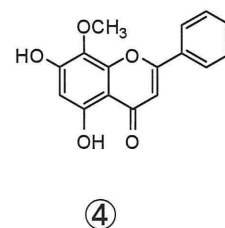
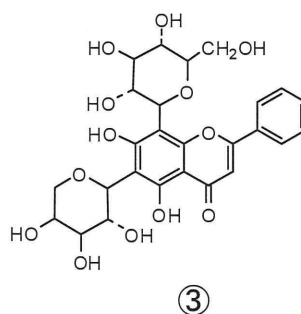
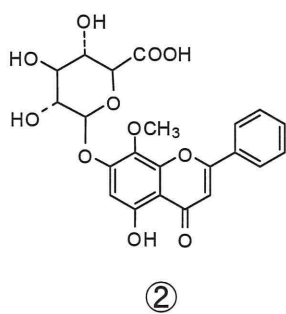
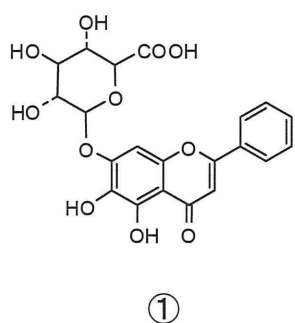
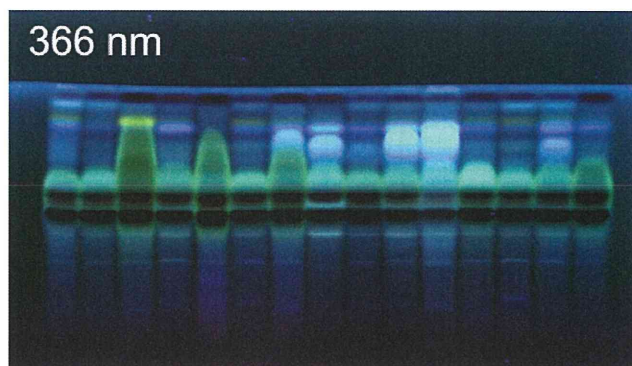
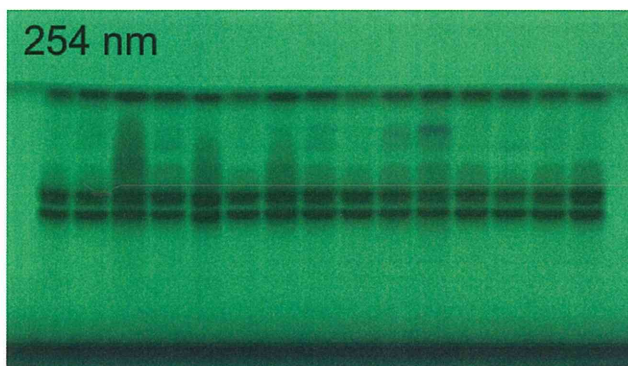
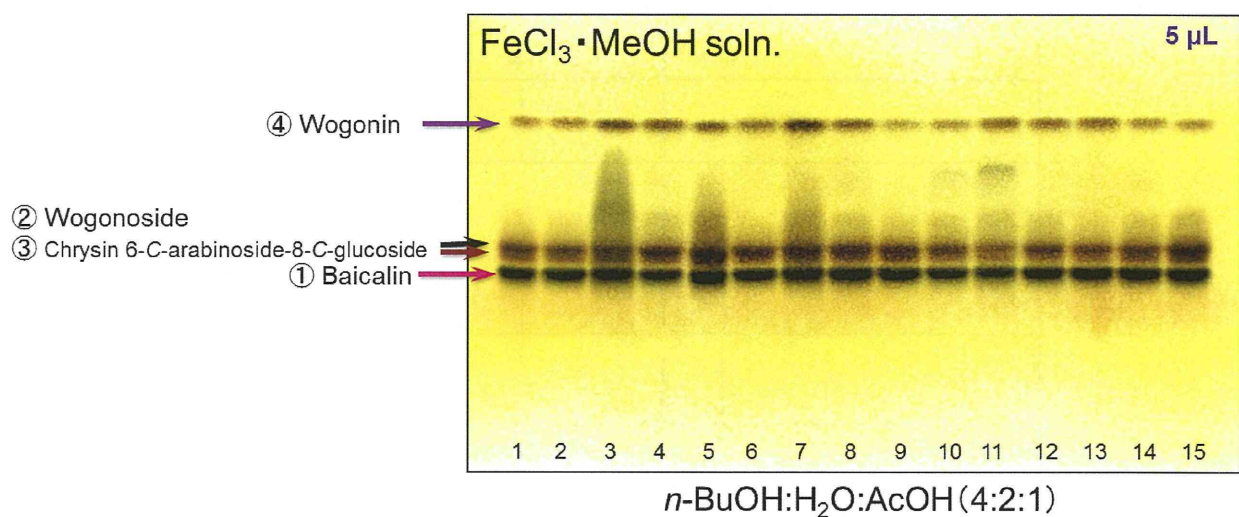


図 11. オウゴン市場品の HPTLC 分析

1: NIB-001, 2: NIB-002, 3: NIB-035, 4: NIB-036, 5: NIB-057, 6: NIB-059, 7: NIB-073, 8: NIB-089, 9: NIB-105, 10: NIB-106, 11: NIB-142, 12: NIB-145, 13: NIB-167, 14: NIB-174, 15: NIB-175

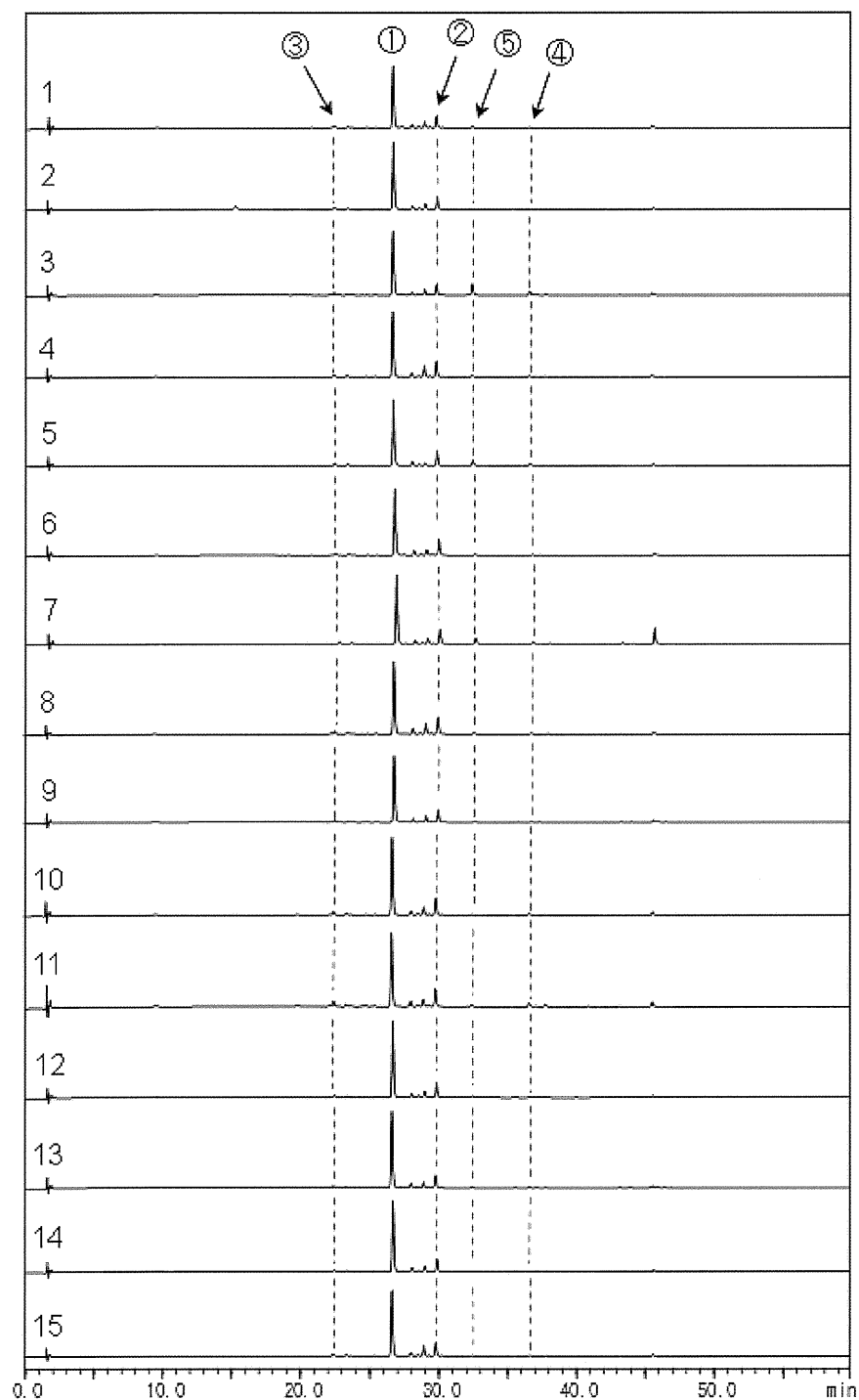


図 12. オウゴン市場品の HPLC 分析

①Baicalin, ②wogonoside, ③chrysin 6-*C*-arabinoside-8-*C*-glucoside, ④wogonin, ⑤baicalein

1: NIB-001, 2: NIB-002, 3: NIB-035, 4: NIB-036, 5: NIB-057, 6: NIB-059, 7: NIB-073, 8: NIB-089, 9: NIB-105, 10: NIB-106, 11: NIB-142, 12: NIB-145, 13: NIB-167, 14: NIB-174, 15: NIB-175

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）
分担研究報告書

分担研究課題 成分分析データ情報およびさく葉標本に関する研究

研究分担者 瀧野 裕之 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

各種生薬エキスの一酸化窒素（NO）産生抑制活性並びに多変量解析による
バイオマーカー探索に関する研究

研究協力者 大根谷章浩 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
高橋 豊 エムエス・ソリューションズ(株)
藤田 愛 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

11種の生薬市場品（ショウキョウ、オウゴン、ソウジュツ、オウレン、カンゾウ、ニンジン、ゴシツ、サイコ、トウキ、ソヨウ、ダイオウ）の熱水抽出エキスについてNO産生抑制活性を検討した。その結果、ショウキョウ、オウゴン、カンゾウ、ダイオウの生薬エキスにNO産生抑制活性のロット差が大きいことが認められた。また、多変量解析により、ショウキョウの活性のロット差に寄与する成分として[6]-gingerolを見出した。

A. 研究目的

「瘀血」は漢方における重要な病態診断の概念である。炎症や血液循環障害と深く関連していると考えられており、例えば、難治性の皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎も「瘀血」が原因と考えられている疾患の一つである。炎症には、マクロファージから産生されるサイトカイン、一酸化窒素（NO）などの炎症性メディエーターが関与している。それらのうち、過剰に産生されるNOは、臓器障害や炎症性疾患を悪化させる要因となっている。生薬には古くから炎症に有効とされるものがあり、抗炎症成分も明らかにされつつある。しかしながら、生薬は天産物であるため、産地、栽培品・野生品、加工調製法などの違いにより、有効成分の含量にばらつきが生じやすく、生物活性もその影響を受けることが予想される。

本研究では「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究」の一環として、抗炎症作用の指標の一つであるNO産生抑制活性について検討することを

目的とし、生薬の国内市場品のマクロファージからのNO産生に及ぼす影響並びにロット差などについて評価を行なった。また、ロット差の認められた生薬について、ロット差の要因となっている成分を多変量解析により検出を試みた。

B. 研究方法

試料

本研究に使用した試料は、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターがデータベース構築のために作製した国内市場品の熱水抽出エキスを用いた。

材料細胞

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 は、European Collection of Cell Cultures (ECCC) より購入した。

細胞培養

培地はF-12 Ham 培地 (Sigma 製) に FBS を 10%、

L-glutamine (Sigma 製) を 2 mM になるように加えた。RAW264.7 は、インキュベーター (37°C、5% CO₂) にて培養し、コンフルエントになり次第、継代した。継代はおおよそ週 2 回行ない、必要に応じてアッセイに用いた。

NO 産生抑制試験法

RAW264.7 細胞を 96 ウェルプレートに播種 (2.4×10⁵ cells/200 μL/well) し、インキュベーター (37°C、5%CO₂) にて 2 時間培養し、接着させた。mouse recombinant interferon (IFN)-γ (Wako 製) および lipopolysaccharide (LPS) (Sigma 製) をそれぞれ、最終濃度が 0.3 ng/mL、100 ng/mL になるように加え、さらに DMSO に溶解した生薬エキス (100 μg/ml) を添加した。インキュベーター (37°C、5%CO₂) にて 16 時間培養した。ポジティブコントロールとして、N^ε-monomethyl-L-arginine acetate (100 μM、Dojindo 製) を用いた。試験は 3 回行ない、結果は Mean±S.E. で示した。

NO 産生抑制率：

培養後の上清 100 μL を回収し、1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ 試薬、0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 試薬を各 50 μL 加え、遮光下、15 分間室温で反応させた。マイクロプレートリーダー (xMark、Bio-Rad 製) にて 550 nm での吸光度を測定し、対照とした 655 nm の吸光度を除いた値を使用した。NO 産生抑制率は以下の式を用いて算出した。

NO inhibitory ratio (%) =

$$(1 - (A_S - A_N) / (A_D - A_N)) \times 100$$

A_N: Untreated

A_S: Sample/LPS/IFN treated

A_D: DMSO/LPS/IFN treated

細胞生存率：

上清を回収した残り細胞に、MTT 試薬 (Dojindo 製) を最終濃度が 0.1 mg/mL になるように加え、インキュベーター (37°C、5%CO₂) にて 4 時間培養した。培地を除去し、150 μL の DMSO に溶解した。マイクロプレートリーダーにて 550 nm での吸光度を測定し、対照とした 655 nm の吸光度を除いた値を使用した。細胞生存率は以下の式を用いて算出した。

$$\text{Cell viability (\%)} = A_S / A_D \times 100$$

A_S: Sample/LPS/IFN treated

A_D: DMSO/LPS/IFN treated

多変量解析

解析は、多変量解析ソフトウェア SIMCA P+ ver. 12.0.1 (Umetrics 社) を用いた。

C. 研究結果

11 種類の生薬 (ショウキョウ、オウゴン、ソウジュツ、オウレン、カンゾウ、ニンジン、ゴシツ、サイコ、トウキ、ソヨウ、ダイオウ) から調製された熱水抽出エキスについて NO 産生抑制活性を検討した (図 1~22)。その結果、ショウキョウ、オウゴン、カンゾウ、ダイオウの熱水抽出エキスは NO 産生抑制活性のロット差が大きいことが認められた。オウレンは強い NO 産生抑制活性を示したが、強い細胞毒性も認められた。ソウジュツ、ニンジン、ゴシツ、サイコ、トウキ、ソヨウに NO 産生抑制活性はほとんど認められなかった。ロット間で NO 産生抑制活性の差異があることが認められたショウキョウについて、多変量解析を行なった。まず、主成分分析を行なった。ほぼ 3 グループに分類されたが、各グループの特徴については分からなかった (図 23)。次に、ショウキョウを NO 産生抑制活性の強さにより 2 群 (A、B) に分け判別解析を行なった。2 群はきれいに判別された (図 24)。S plot より 2 群間の判別に大きく寄与している成分 (*t_R*: 25.8 min、*m/z*: 293、191、176) が見いだされた (図 25)。本成分は標品との比較から、ショウキョウの辛味成分である [6]-gingerol と同定された (図 26)。

D. 考察

今回、生薬市場品について NO 産生抑制活性を検討した。その結果、NO 産生抑制活性についてロット差の大きい生薬があることが示された。ロット差が大きかった生薬は、LC/MS や TLC においても差異が認められており、大変興味深い。しかしながら、活性と産地や栽培品・野生品の違いなどの相関は認められなかった。今回、用いた試料は熱水抽出エキスであり、主に高極性成分であるため、すべての成分を網羅していない可能性が考えられた。

多変量解析により、ロット差の大きかった生薬について、その要因となる成分の検出を試みた。ショウキョウについて多変量解析を行なった結果、[6]-gingerolを見出した。

今回の検討から、市場品のロット差やその要因となるマーカー成分を明らかにすることが出来た。

E. 結論

今回、検討した生薬市場品のうち、ショウキョウ、オウゴン、カンゾウ、ダイオウの熱水抽出エキスがNO産生抑制活性のロット差が大きいことが示された。ショウキョウのNO産生抑制活性のロット差に寄与している成分として[6]-gingerolが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 大根谷章浩、湊野裕之、高橋 豊、合田幸広、川原信夫：生薬学雑誌 (*submitted*)。

2. 学会発表

1) 大根谷章浩、安藤成紀、北中 進、湊野裕之、川原信夫：食品としても用いられる薬用植物の一酸化窒素産生抑制活性について、日本食品化学学会第17回総会・学術大会、講演要旨集 p32 (2011年5月19日、東京)。

2) 大根谷章浩、湊野裕之、高橋 豊、川原信夫：国内流通生薬のNO産生抑制活性とLC/MSメタボローム解析、日本生薬学会第58回年会、講演要旨集 p199 (2011年9月24日、東京)。

3) 大根谷章浩、湊野裕之、高橋 豊、川原信夫：国内流通生薬のNO産生抑制活性とLC/MSメタボローム解析(その2)、日本薬学会第132年会、プログラム p182 (2012年3月30日、札幌)。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

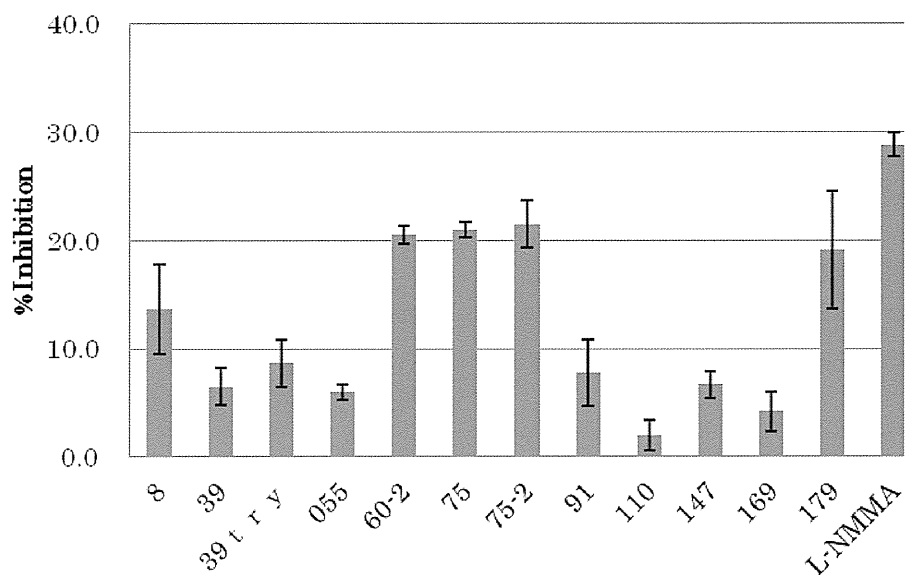


図1 ショウキョウ熱水抽出エキスのNO産生抑制率 (%)

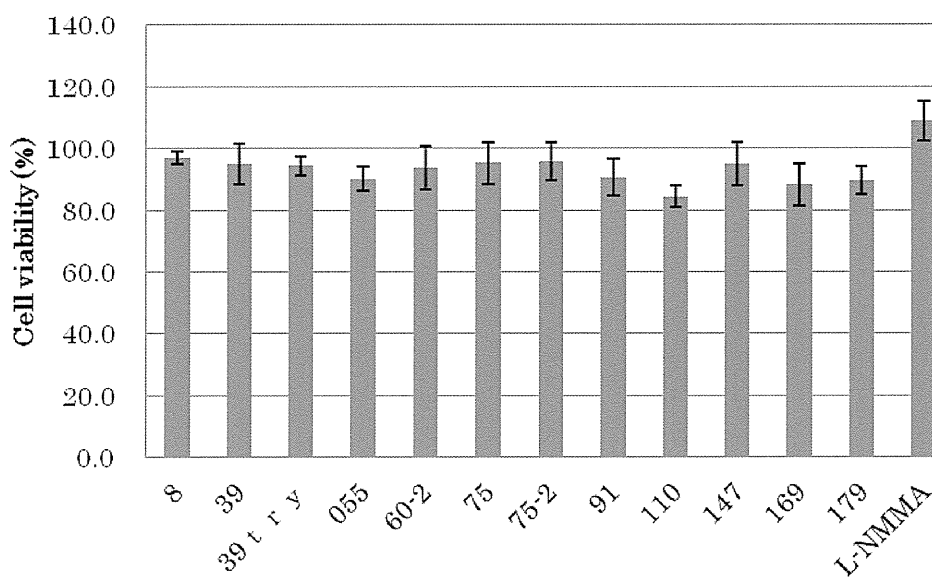


図2 ショウキョウ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

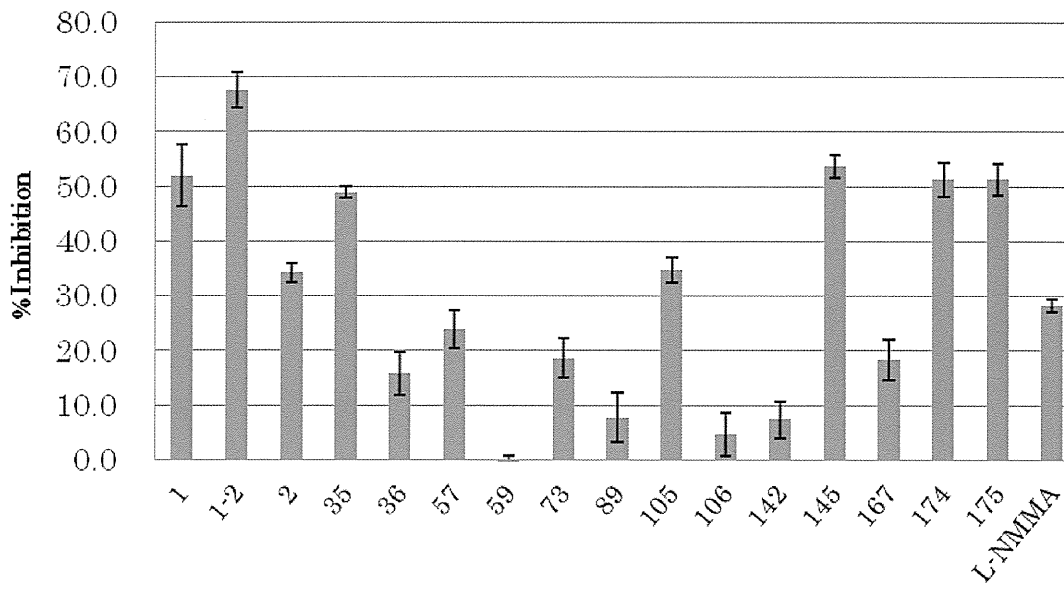


図3 オウゴン熱水抽出エキスのNO 産生抑制率 (%)

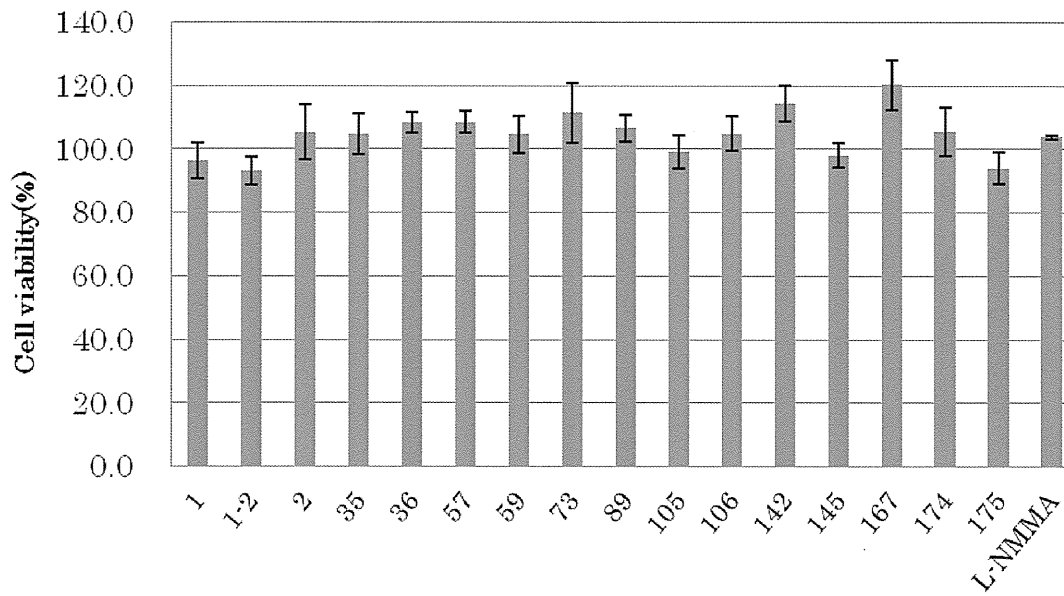


図4 オウゴン熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

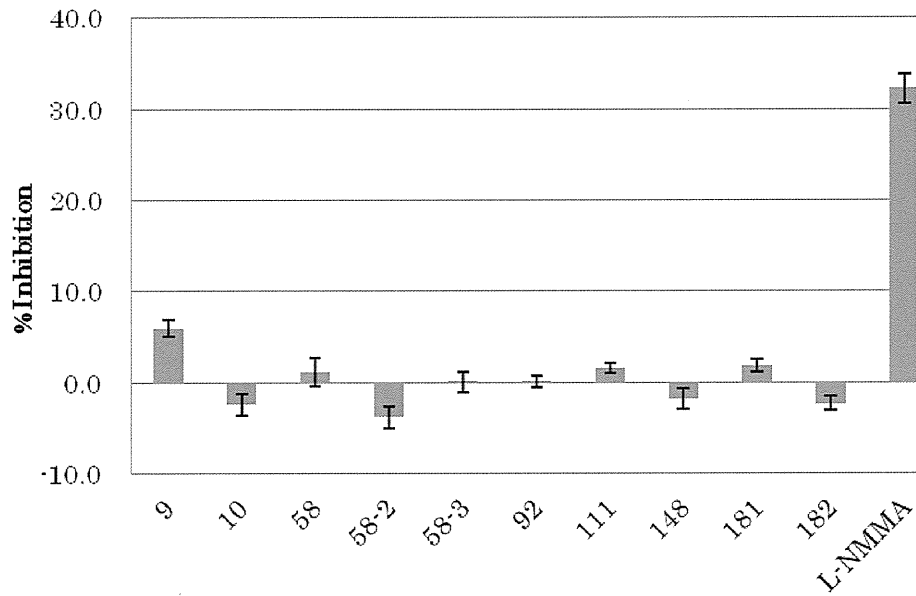


図5 ソウジュツ熱水抽出エキスのNO産生抑制率(%)

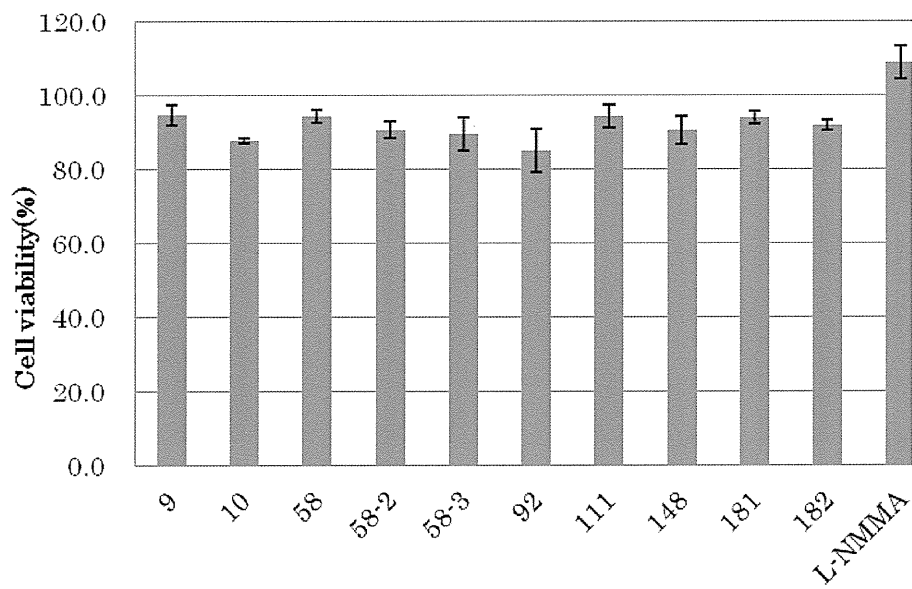


図6 ソウジュツ熱水抽出エキスの細胞生存率(%)

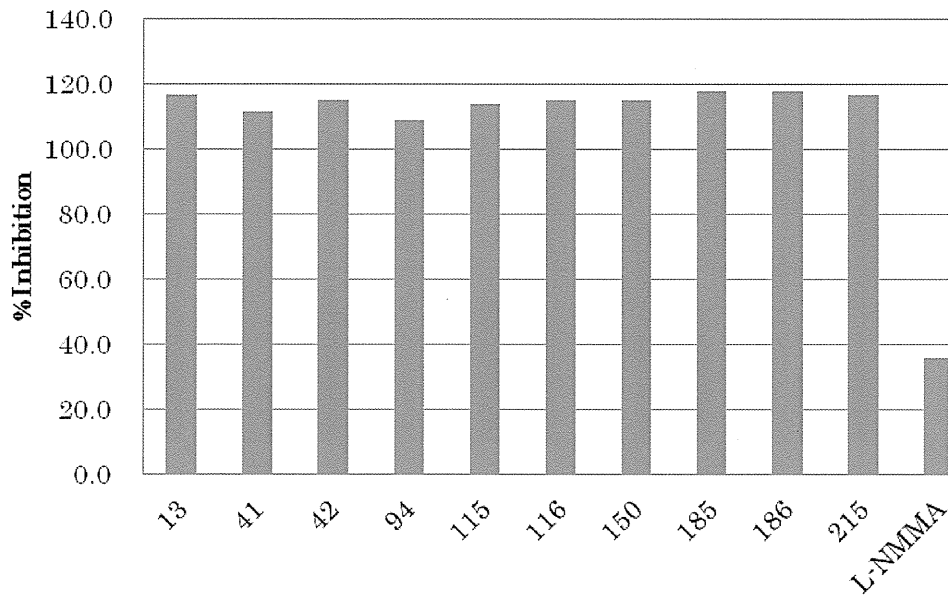


図7 オウレン熱水抽出エキスのNO 産生抑制率 (%)

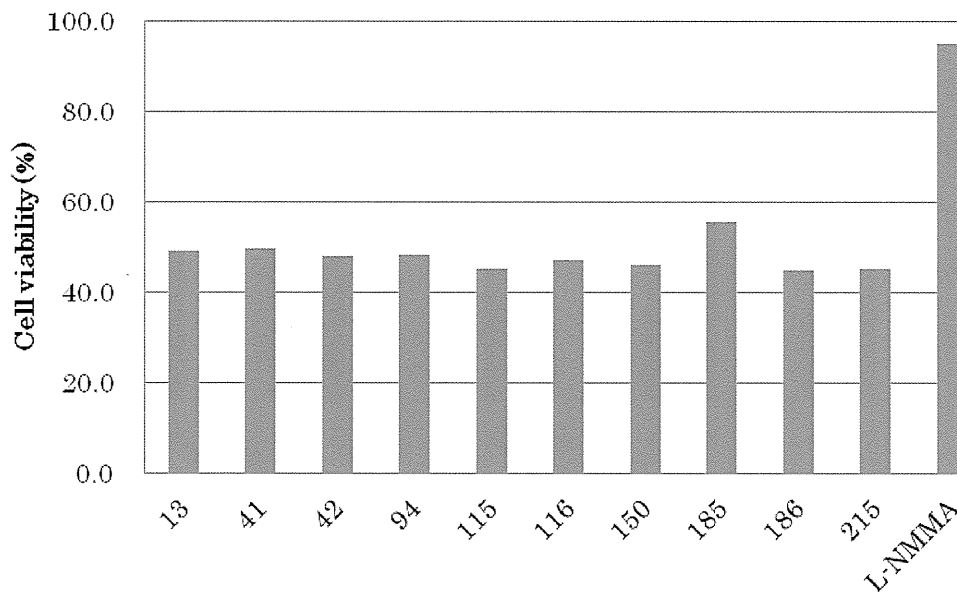


図8 オウレン熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)