

草の特有な値であることが示された。一方、サンプル間の変動係数は 18.1%であり、5社の局方規格甘草における 10.0%と比較して大きく、産地などの環境要因の影響を受けやすい生薬と思われたが、産地(内蒙古、甘肅省、吉林省及び寧夏省)による特徴を見出すことはできなかった。

E. 結論

本研究事業において平成 23 年度の重点検討生薬(コア生薬)に指定された黄黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、5つの主要生薬メーカー局方規格製品についてエキス収量を測定した。いずれも会社間のばらつきは小さかったが、桂皮のようにエキス収率自体が小さく、また揮発性成分を

多く含む生薬は、やや他にくらべて若干のばらつきが観察された。

甘草については、様々な産地に由来する生薬原料についてエキス収量を測定し、産地などの環境の影響を受けやすい生薬であることが分かった。

F. 研究発表

1. 学会発表

該当無し

2. 誌上発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表1 生薬メーカー主要5社における平成23年度コア生薬の凍結乾燥エキス収率

| 生薬 | | A社 | B社 | C社 | D社 | E社 | 会社間平均 | 会社間変動係数 |
|-------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| オウレン | 1回目収率 [%] | 14.15 | 13.65 | 12.55 | 17.10 | 12.75 | | |
| | 2回目収率 [%] | 14.70 | 13.50 | 12.45 | 15.90 | 12.90 | | |
| | 3回目収率 [%] | 14.65 | 13.40 | 13.60 | 15.75 | 12.70 | | |
| | 会社内平均収率 [%] | 14.50 | 13.52 | 12.87 | 16.25 | 12.78 | 13.98 | 9.2 |
| | 会社内変動係数 | 1.71 | 0.76 | 4.04 | 3.72 | 0.66 | 2.18 | |
| | 相対値 ^{a)} | 103.69 | 96.66 | 92.01 | 116.21 | 91.42 | 100.00 | |
| ケイヒ | 1回目収率 [%] | 7.20 | 6.20 | 6.70 | 5.40 | 6.40 | | |
| | 2回目収率 [%] | 7.55 | 6.55 | 6.85 | 5.40 | 5.75 | | |
| | 3回目収率 [%] | 5.80 | 5.75 | 6.90 | 5.05 | 4.90 | | |
| | 会社内平均収率 [%] | 6.85 | 6.17 | 6.82 | 5.28 | 5.68 | 6.16 | 10.0 |
| | 会社内変動係数 | 11.04 | 5.31 | 1.25 | 3.12 | 10.81 | 6.30 | |
| | 相対値 ^{a)} | 111.20 | 100.11 | 110.66 | 85.77 | 92.26 | 100.00 | |
| ジオウ | 1回目収率 [%] | 54.95 | 55.30 | 49.50 | 49.00 | 57.70 | | |
| | 2回目収率 [%] | 56.55 | 55.05 | 49.30 | 50.15 | 58.15 | | |
| | 3回目収率 [%] | 52.45 | 52.30 | 48.25 | 46.15 | 49.15 | | |
| | 会社内平均収率 [%] | 54.65 | 54.22 | 49.02 | 48.43 | 55.00 | 52.26 | 5.6 |
| | 会社内変動係数 | 3.09 | 2.51 | 1.12 | 3.47 | 7.53 | 3.54 | |
| | 相対値 ^{a)} | 104.57 | 103.74 | 93.79 | 92.67 | 105.24 | 100.00 | |
| シヤクヤク | 1回目収率 [%] | 30.00 | 29.70 | 32.00 | 31.35 | 33.80 | | |
| | 2回目収率 [%] | 31.85 | 32.00 | 32.30 | 31.25 | 34.30 | | |
| | 3回目収率 [%] | 29.65 | 31.45 | 31.20 | 29.05 | 33.75 | | |
| | 会社内平均収率 [%] | 30.50 | 31.05 | 31.83 | 30.55 | 33.95 | 31.58 | 4.1 |
| | 会社内変動係数 | 3.16 | 3.16 | 1.46 | 3.47 | 0.73 | 2.40 | |
| | 相対値 ^{a)} | 96.59 | 98.33 | 100.81 | 96.75 | 107.52 | 100.00 | |
| トウキ | 1回目収率 [%] | 39.80 | 40.15 | 34.95 | 41.05 | 41.95 | | |
| | 2回目収率 [%] | 34.85 | 34.75 | 34.00 | 32.80 | 36.85 | | |
| | 3回目収率 [%] | 34.90 | 32.55 | 30.50 | 31.20 | 35.45 | | |
| | 会社内平均収率 [%] | 36.52 | 35.82 | 33.15 | 35.02 | 38.08 | 35.72 | 4.6 |
| | 会社内変動係数 | 6.36 | 8.91 | 5.77 | 12.33 | 7.33 | 34.36 | |
| | 相対値 ^{a)} | 102.24 | 100.28 | 92.81 | 98.04 | 106.63 | 100.00 | |

a) 会社間平均収率を100とした場合の各社の平均収率の相対値

表2 甘草生薬原料の凍結乾燥エキス収率

| 通し 番号 | NIBIO 管理番号 | 産地 | 形態 | 凍結乾燥 | エキス収率 (%) | 平均収率 (%) | 収率 標準偏差 | 収率 変動係数 |
|-------------|---------------|-----|----|------|--------------|-------------|------------|------------|
| 1 | NIB-003 | 内蒙古 | 原形 | 1回目 | 19.2 | 19.2 | 0.9 | 4.5 |
| | | | | 2回目 | 18.2 | | | |
| | | | | 3回目 | 20.3 | | | |
| 2 | NIB-004 | 寧夏省 | 原形 | 1回目 | 19.7 | 20.7 | 0.7 | 3.3 |
| | | | | 2回目 | 21.4 | | | |
| | | | | 3回目 | 20.8 | | | |
| 3 | NIB-005 | 内蒙古 | 原形 | 1回目 | 27.7 | 27.6 | 1.5 | 5.3 |
| | | | | 2回目 | 29.4 | | | |
| | | | | 3回目 | 25.8 | | | |
| 4 | NIB-006 | 内蒙古 | 原形 | 1回目 | 23.3 | 25.2 | 1.7 | 6.9 |
| | | | | 2回目 | 24.6 | | | |
| | | | | 3回目 | 27.5 | | | |
| 5 | NIB-007 | 内蒙古 | 原形 | 1回目 | 31.0 | 32.3 | 1.0 | 3.2 |
| | | | | 2回目 | 32.7 | | | |
| | | | | 3回目 | 33.4 | | | |
| 6 | NIB-037 | 内蒙古 | 原形 | 1回目 | 23.9 | 26.0 | 1.5 | 5.9 |
| | | | | 2回目 | 27.0 | | | |
| | | | | 3回目 | 27.2 | | | |
| 7 | NIB-038 | 甘肅省 | 原形 | 1回目 | 27.6 | 26.4 | 0.8 | 3.1 |
| | | | | 2回目 | 26.0 | | | |
| | | | | 3回目 | 25.7 | | | |
| 8 | NIB-054 | 吉林省 | 原形 | 1回目 | 25.5 | 25.4 | 0.2 | 0.8 |
| | | | | 2回目 | 25.5 | | | |
| | | | | 3回目 | 25.1 | | | |
| 9 | NIB-074 | 甘肅省 | 刻み | 1回目 | 20.1 | 21.3 | 1.0 | 4.5 |
| | | | | 2回目 | 21.5 | | | |
| | | | | 3回目 | 22.4 | | | |
| 10 | NIB-090 | 寧夏省 | 刻み | 1回目 | 19.7 | 20.0 | 0.3 | 1.5 |
| | | | | 2回目 | 20.4 | | | |
| | | | | 3回目 | 20.0 | | | |
| 11 | NIB-107 | 寧夏省 | 刻み | 1回目 | 26.6 | 26.9 | 0.3 | 1.0 |
| | | | | 2回目 | 26.9 | | | |
| | | | | 3回目 | 27.2 | | | |
| 12 | NIB-108 | 寧夏省 | 刻み | 1回目 | 29.1 | 28.9 | 0.3 | 1.2 |
| | | | | 2回目 | 28.5 | | | |
| | | | | 3回目 | 29.3 | | | |
| 13 | NIB-109 | 内蒙古 | 刻み | 1回目 | 19.0 | 20.5 | 1.2 | 5.9 |
| | | | | 2回目 | 20.8 | | | |
| | | | | 3回目 | 21.9 | | | |
| 14 | NIB-146 | 甘肅省 | 刻み | 1回目 | 17.2 | 16.4 | 1.0 | 6.4 |
| | | | | 2回目 | 15.0 | | | |
| | | | | 3回目 | 17.2 | | | |
| 15 | NIB-168 | 内蒙古 | 原形 | 1回目 | 20.7 | 21.9 | 1.4 | 6.5 |
| | | | | 2回目 | 21.1 | | | |
| | | | | 3回目 | 23.9 | | | |
| 16 | NIB-176 | 内蒙古 | 原形 | 1回目 | 29.5 | 29.7 | 0.2 | 0.7 |
| | | | | 2回目 | 30.0 | | | |
| | | | | 3回目 | 29.7 | | | |
| 16検体平均収率(%) | | | | | 24.3 | | | |
| 16検体収率標準偏差 | | | | | 4.4 | | | |
| 16検体収率変動係数 | | | | | 18.1 | | | |

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 生物活性情報及び成分分析データ情報に関する研究

研究分担者 富山大学和漢医薬学総合研究所 所長 済木 育夫

がん細胞増殖試験、NF- κ B 活性化試験および IL-6 産生試験

研究協力者 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 櫻井 宏明

提供された各生薬について、それぞれ各ロットから等量ずつ混合した標準ロットを作製しアッセイを実施し、有効性の認められた生薬について各ロットの試験を実施することにした。標準ロットを用いて、がん細胞増殖試験、NF- κ B 活性化試験および IL-6 産生試験を実施した結果、がん細胞増殖試験では、ニンジン、トウキ、マオウが、NF- κ B 活性化試験ではオウゴン、オウレン、ダイオウが、IL-6 産生試験ではケイヒ、ダイオウ、マオウが活性を示したため、今後各ロットの試験を実施することにした。

A. 研究目的

本研究は、「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース」構築プロジェクトの一環として、生薬エキスのロット差を生物活性を指標に検出することを目的とする。

がん細胞は、発生母地の正常細胞の性質はある程度は保持していると考えられ、細胞ごとに化学物質に対する感受性が異なっていることが知られている。したがって、生薬のような複合薬物の活性を評価するに当たり、特定の分子等に焦点を当てるのではなく、広範な制御機構の影響を受ける細胞増殖能を指標とする生物活性試験が有用であると考えられる。そこで、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に対する各生薬エキスの活性を測定した。

炎症性サイトカイン TNF- α は、炎症性疾患をはじめとした様々な疾患の病態形成に極めて重要な役割を果たしている。最近、がん微小環境内における役割についても注目を集めている。そこで本研究においては、TNF-

α シグナル伝達系に焦点を当て、転写因子 NF- κ B 活性化試験を実施した。また、NF- κ B や AP-1 によって発現が制御されるサイトカイン IL-6 の三性試験を実施した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された生薬試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料である。被検生薬が各アッセイ系で活性を示すのかを検証する目的で、生薬ごとに各ロットを等量ずつ混ぜた標準ロットを作製し、試験に供した。今後、この標準ロットで活性が認められるものについては、各ロットの再アッセイを行い、ロット差を検討することにした。

本年度検討した生薬は、以下の 17 種である。オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジ

オウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、シャゼンシ。(尚、各標準生薬の質量分析解析結果は、協力研究者の田中謙博士の報告書を参照のこと)

2. 実験方法

細胞培養

HeLa細胞はDMEM+10%FCS培地で培養した。また、ルシフェラーゼアッセイには、NF- κ B結合配列を4つタンデムに持つレポータープラスミドを安定発現するHeLa- κ B6細胞を用い、親株のHeLa細胞と同様の方法で培養した。

がん細胞増殖試験

HeLa細胞を96ウェルプレートに播種し(3×10^3 cells/well)、翌日に生薬エキスを添加した。その24時間後にWST-1試薬を加え、吸光度(450 nm)を測定した。陽性コントロールとして、doxorubicinを10 μ g/mlで添加した。生薬は10 mg/mlの水溶液を作製し(不溶物を遠心分離で除いた)、最終濃度100 μ g/mlで試験を実施した。

NF- κ B活性化試験

HeLa- κ B6細胞を96ウェルプレートに播種し(1.5×10^4 cells/well)、翌日に最終濃度100 μ g/mlで生薬エキスを添加した。その30分後にTNF- α を最終濃度10 ng/mlとなるように添加し、さらに6時間培養した。培養上清を取り除き、細胞溶解液を調製し、ピッカジーン(東洋インキ社製)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

IL-6産生試験

HeLa- κ B6細胞を96ウェルプレートに播種し(1.5×10^4 cells/well)、翌日に最終濃度100 μ g/mlで生薬エキスを添加した。その30分後にTNF- α を最終濃度10 ng/mlとなるように添加し、さらに6時間培養した。培養上清を回収し、ELISA法(BD社製)によりIL-6濃度を測定した。

C. 研究結果

がん細胞増殖試験

HeLa細胞に各標準ロットの生薬エキスを24時間培養後の細胞数をWST-1アッセイで検討した。陽性コントロールとして添加したdoxorubicinは細胞死を強く誘導し、ほぼ完全に阻害することを確認した。17種類の生薬エキスを検討した結果、100 μ g/mlではあまり顕著に阻害するものは認められなかった。オウゴン、昨年度は試験濃度を500 μ g/mlとしていたため阻害作用を示したが、100 μ g/mlではほとんど阻害作用を認めなかった。

また、NF- κ B活性化やIL-6産生試験では、細胞をTNF- α で刺激することから、このサイトカインの細胞増殖に対する効果を調べたが、特に影響を及ぼしていることはなかった。

NF- κ B活性化試験

HeLa- κ B6細胞をTNF- α で刺激することにより、発現するルシフェラーゼ活性が約3倍上昇した。この発現誘導に対する各標準ロットの効果を調べた。オウゴンとダイオウがTNF- α 単独よりも強くルシフェラーゼ発現を誘導した。一方、オウレンは弱いながらも阻害作用を示したことから、今後これら生薬について各ロットの試験を実施することにした。

IL-6産生試験

細胞をTNF- α で刺激することにより、IL-6の発現が著しく上昇することを確認した。この上昇に対して各標準ロットの効果を調べた。その結果、強く阻害する生薬は認められなかったが、ケイヒ、ダイオウ、マオウが活性を示したため、今後各ロットの試験を実施することにした。

D. 考察

がん細胞増殖試験において、昨年度実施したパイロット試験では、試験濃度を500 μ g/mlとしていたためオウゴンに活性が認められた。しかし、一般的に培養系で生薬エキスの生物活性試験を実施する場合、100 μ g/ml以下が望ましいとされていることもあり、今年度から

標準ロットの試験は 100 µg/ml 以下で実施することにした。その結果、オウゴンのがん細胞増殖抑制効果は認められなくなった。

このような試験条件下で、3つのアッセイで弱いながらも活性を示す生薬が見出されたことから、各生薬の標準ロットを作製し生物活性の有無を確認する方法は、効率的な手法として有効であると思われた。したがって、来年度以降も本法を採用し、できるだけ多くの生薬エキスの生物活性を効率的に検討していく予定である。

NF-κB 活性化は IL-6 産生に関与しているにもかかわらず、NF-κB 活性化阻害作用のある生薬と IL-6 産生阻害作用のある生薬が一致しなかった。この結果については、各ロットの試験を実施することによるロット差の検討から考察を加えていく必要があると考えられた。

E. 結論

3つの試験を実施し、それぞれ各標準ロットの効果を検討した結果、弱いながらも活性を示した生薬が存在したことから、今後各ロットの試験を実施することとした。

F. 研究発表

なし

1. 学会発表

なし

2. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

H. 健康危険情報

なし

表 1、試験に用いた生薬

| | |
|----|--------|
| 1 | オウゴン |
| 2 | カンゾウ |
| 3 | ショウキョウ |
| 4 | ソウジュツ |
| 5 | ニンジン |
| 6 | オウレン |
| 7 | ケイヒ |
| 8 | ジオウ |
| 9 | シャクヤク |
| 10 | トウキ |
| 11 | サイコ |
| 12 | サンシシ |
| 13 | ゴシツ |
| 14 | ダイオウ |
| 15 | ビャクジュツ |
| 16 | マオウ |
| 17 | シャゼンシ |

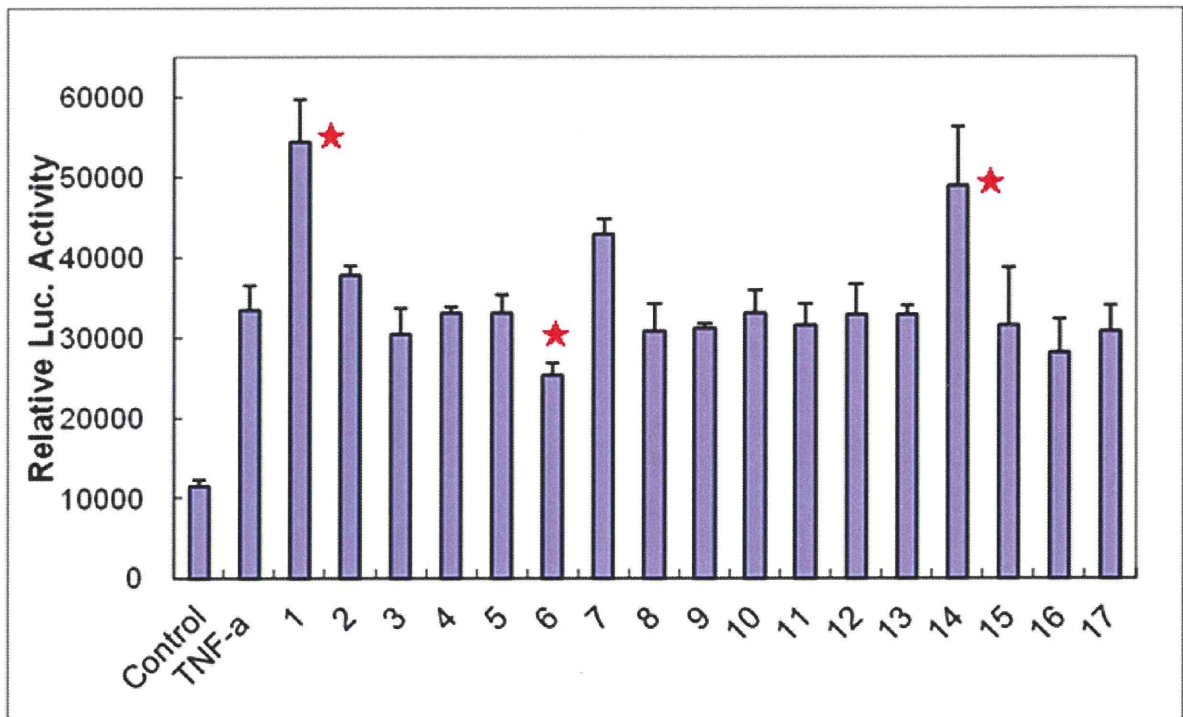


図 1. がん細胞増殖試験の結果

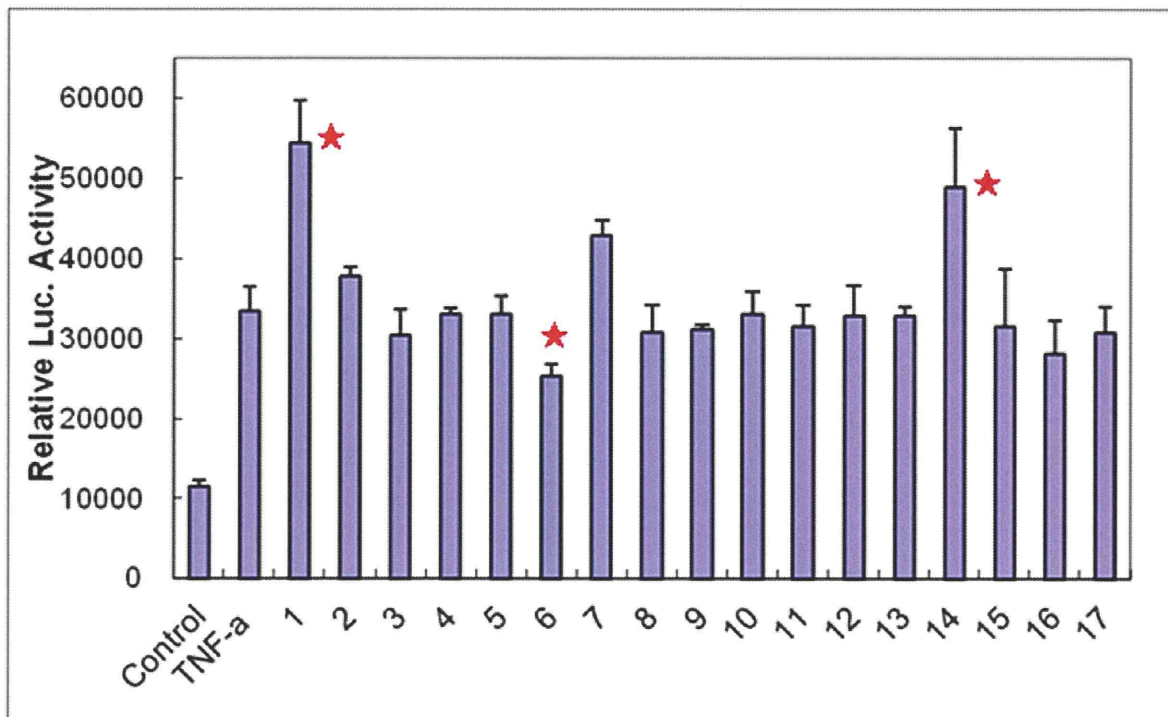


図 2. NF-κB 活性化試験の結果

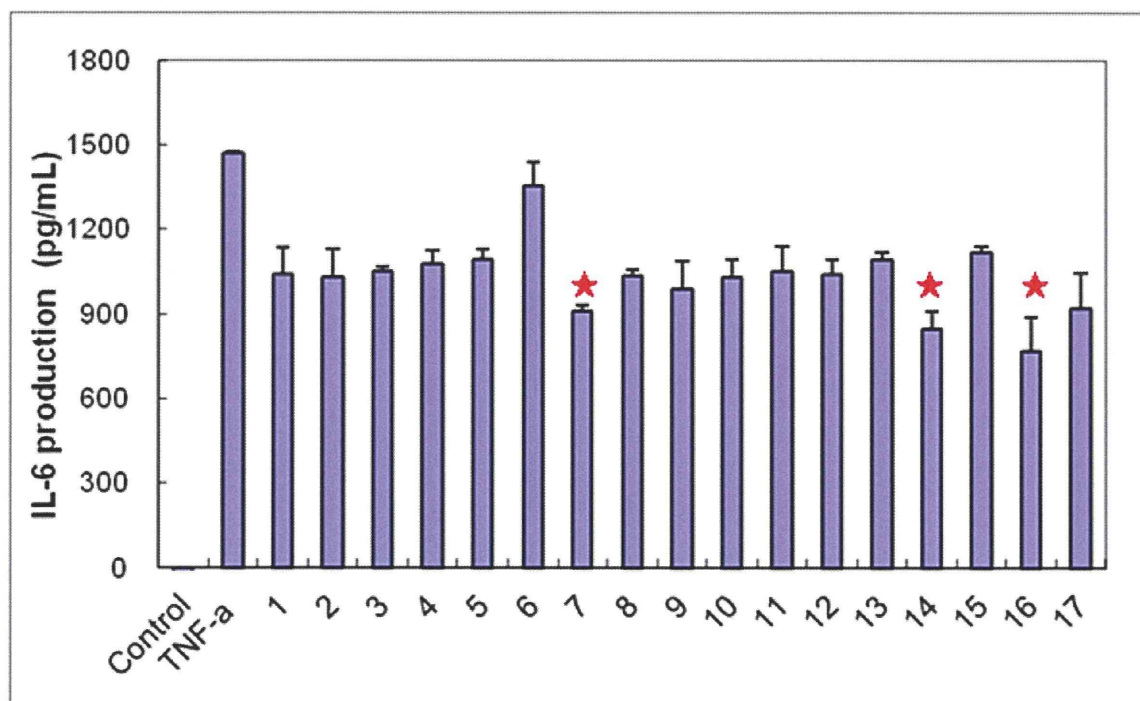


図 3. IL-6 産生試験の結果

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
基盤設備に関する研究（H23-創薬総合-一般-013）
分担報告書

分担研究課題 生物活性情報及び成分分析データ情報に関する研究

研究分担者 済木 育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所 所長

樹状細胞に対する生薬エキスの効果

研究協力者 山本 武 富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野

生薬エキスのロット差を生物活性によって検出するために、マウス骨髄細胞由来樹状細胞を用いて、LPS 刺激による樹状細胞の成熟化に対する生薬エキスの効果の検討を行った。樹状細胞は成熟に伴い細胞表面分子（CD80、CD86、MHC class II）の発現が増加するため、これら細胞表面分子を発現した樹状細胞の割合を指標として生薬エキスの効果の検討を行った。始めに、生薬エキスの各ロットを等量混合した生薬エキス標準品を用い検討を行った。その結果、ケイヒエキスに成熟化抑制効果が認められた。また、ダイオウエキスに成熟化促進効果が認められた。これら二つの生薬エキス以外にも成熟化に対する抑制効果や促進効果が確認されたが、その効果は弱いものであった。強い効果が確認された二つの生薬エキスについて個々のロットを検討した。ケイヒにおいては、生薬エキスのロットの生物活性に大きな差が認められた。樹状細胞の成熟化を、強く抑制するロットがあるものの、効果のないロットや逆に促進するロットも確認された。ダイオウにおいては、効果の強さに違いがあるものの、ほとんど全ての生薬エキスのロットで成熟化促進効果が認められた。

A. 研究目的

本研究は、「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース」構築プロジェクトの一環として、生物活性を指標にして生薬エキスのロット差を検出することを目的とする。

樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ重要な抗原提示細胞として知られている。樹状細胞は生体内に侵入した感染性病原体などの異種抗原を認識して成熟化し、様々な炎症性サイトカインを産生し、感染初期の防御反応を惹起する。さらに、樹状細胞は感染性病原体などの異種抗原を捕食し成熟化し、未成熟 T 細胞と反応し、キラー T 細胞及び抗体産生に関わるヘルパー T 細胞への分化を誘導する。一方、樹状細胞は免疫系の恒常性の維持に関与し、自己抗原への反応の抑制や制御性 T 細胞の産生に関与する。

この様に、樹状細胞は、成熟化を伴い免疫応答の活性化や抑制に関与している。

漢方薬は、生体の恒常性の維持に重きを置いた薬物治療体系を有し、生体の制御システムである免疫系は大きな治療標的の一つとして考えられている。実際に、年間生産量が上位の漢方薬の多くが免疫機構の恒常性の破綻が原因となる病態に適応されており、免疫系制御の中心的な役割を担う樹状細胞がその治療標的のひとつであることが示唆される。

従って、漢方薬を構成する生薬の生薬エキスが示す生物活性の解析には、樹状細胞の機能制御に関する検討は有効であると考えられる。そこで、未成熟樹状細胞を骨髄細胞から分化誘導し、樹状細胞の成熟化に対する生薬エキスの効果を測定した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された 17 種の生薬エキス試料（オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、ジオウ、ケイヒ、オウレン、トウキ、シャクヤク、サイコ、マオウ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、サンシシ、シャゼンシ）の詳細を表 1 にまとめた。これら試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料のなかから提供された。本研究では、これら生薬エキスの各ロットを等量混合した生薬エキス標準品を調製し、この生薬エキス標準品を用いて生物活性を測定し、生物活性が検出された生薬エキスについて、個々の生薬エキスのロットを用い生物活性の測定を行った。

2. 実験方法

雄 5-12 週令の BALB/c マウスの両足の大腿骨と頸骨より骨髓細胞をクリーンベンチ内で無菌的に採取した。この骨髓細胞を、10% Fetal bovine serum、55 μ M 2-mercaptoethanol、100 units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycin、292 μ g/ml Glutamine、10ng/ml GM-CSF を添加した RPMI-1640 培養液で培養し、6 日後に未成熟樹状細胞を採取した。未成熟樹状細胞を 96well plate に播種し、0.1 μ g/ml もしくは 0.5 μ g/ml の濃度の Lipopolysaccharide (LPS) により 24 時間刺激を行ない、成熟化を誘導した。同時に、100 μ g/ml の濃度で各生薬エキスを添加し、24 時間処置した。その後、樹状細胞を回収し、細胞表面分子を FITC 標識 Anti-mouse CD80、PF-cy7 標識 Anti-mouse CD86、PE 標識 Anti-mouse MHC class II、APC 標識 Anti-mouse CD11c を用いて蛍光染色し、フローサイトメーターにより CD11c 陽性細胞を樹状細胞として CD11c 陽性樹状細胞の各細胞表面分子の発現について解析を行った。また、7AAD により死細胞の核染色を行い、フローサイトメーターにより CD11c 陽性樹状細胞の生存率を測定した。

C. 研究結果

未成熟 CD11c 陽性樹状細胞は LPS (0.1 μ g/ml) 刺激により成熟化が誘導され、抗原提示に必要

な共刺激分子である CD80、CD86（共刺激分子）および MHC class II（主要組織適合遺伝子複合体 class II）を発現させた（図 1）。そこで、これら細胞表面分子の発現を指標として生薬エキスの効果の検討を行った。樹状細胞の成熟化は、0.1 μ g/ml もしくは 0.5 μ g/ml LPS の濃度で行い、LPS 刺激により細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に対する割合として各生薬エキスの効果を解析した。

各生薬エキス標準品 (100 μ g/ml) 処理による効果は、LPS (0.1 μ g/ml) 刺激により樹状細胞の CD80、CD86、MHC class II の各細胞表面分子の発現増加に対し、同様の傾向を示した。オウゴンエキス、ケイヒエキス、ビャクジュツエキスの処理により、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に抑制傾向が示された。一方、ニンジンエキス、ジオウエキス、マオウエキス、ダイオウエキス処理により、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に促進傾向が示された（図 2a-c）。また、LPS (0.5 μ g/ml) 刺激による各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に対しても同様の検討を行い、各生薬エキス標準品 (100 μ g/ml) 処理により LPS (0.1 μ g/ml) 刺激時に対する効果と同様の傾向が示された（データ未記載）。これら生薬エキスのなかでも、特に、ケイヒエキスに有意な抑制効果が、ダイオウエキスに有意な促進効果が確認された。また、これら生薬エキス標準品 (100 μ g/ml) の 24 時間処置では、7AAD を用いた細胞生存率判定において、細胞生存率は変化せず、全ての生薬エキス標準品で細胞毒性は検出されなかった（図 2d）。

これら結果から、次に細胞表面分子発現した樹状細胞の増加に対し有意な効果を示したケイヒエキス（抑制効果）とダイオウエキス（促進効果）について個々の生薬エキスのロットについて検討を行った。

ケイヒは、生薬エキスのロット間で生物活性に大きなばらつきが観察された（図 3a-c）。NIB-014、NIB-015、NIB-062、NIB-070、NIB-188 は、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に対し抑制傾向を示した。特に、NIB-014、NIB-062、NIB-188 は有意な抑制効果を示した。一方、NIB-095、NIB-117、NIB-151、NIB-171、

NIB-187、NIB-222 は、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に対し促進傾向を示した。特に、NIB-151 と NIB-222 は有意な促進効果を示した。これらケイヒエキスの各ロットにおいて、細胞生存率は変化せず、細胞毒性は検出されなかった (図 3d)。

ダイオウは、NIB-101 以外の全ての生薬エキスのロットにおいて各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加の増加に対し促進効果が示された (図 3a-c)。これらダイオウエキスの各ロットにおいて、細胞生存率は変化せず、細胞毒性は検出されなかった (図 3d)。

D. 考察

本研究は、免疫制御機構に重要な役割を担う樹状細胞の成熟化に伴う細胞表面分子の増加を指標として生薬エキスの生理活性を測定し、ケイヒとダイオウの生薬エキスのロット差を検出したことから、この系がこの生薬エキスの標準化に有用であることが示唆された。

ケイヒエキスは、ロット間で樹状細胞の成熟化に対する生物活性に差が大きいことが確認され、抑制効果を示すロットと促進効果を示すロットが確認された。これら生薬エキスのロットの成分分析により、抑制効果や促進効果に特異的なピークは確認することはできなかった (研究協力者 田中謙先生報告書参照)。ただし、ベトナムの Yen Bai 産の 2 つの生薬エキスロットが特に強い抑制効果を示したことから、含有成分の違いによる効果の違いが示唆され、産地の異なった生薬エキスの検定に有用であると考えられた。

ダイオウエキスは、ほぼ全てのロットで樹状細胞の成熟化に対する亢進効果が確認された。

しかし、これら生薬エキスのロットの成分分析により、促進効果に強さに関連したピークは確認できなかった (研究協力者 田中謙先生報告書参照)。また、産地による相関もみられず、ロット間による生物活性の強さの影響については詳細な検討が必要であるが、生物活性に差が検出できることから生薬エキスの検定に有用であると考えられた。

また、他の生薬エキスにおいても、樹状細胞の成熟化の抑制効果や促進効果として生物活性を検出することは可能であったがその活性は弱く、他のアッセイ系による検討が有効であることが示唆された。

E. 結論

ケイヒエキスとダイオウエキスは、樹状細胞の成熟化に伴う細胞表面分子発現量の増加を指標とした生物活性測定試験により、ロット間の差を検定可能である。ケイヒエキスは、ロットの違いによりその効果が大きく異なり、ダイオウエキスは、ロットの違いにより生物活性の強さが異なった。また、他の生薬エキスについては別の試験による検定が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表1. 本研究に使用された生薬リスト

オウゴン

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|---------|----|------|--------------|
| NIB-001 | 中国河北省 | 原形 | 2010 | 栽培 |
| NIB-002 | 中国河北省 | 原形 | 2009 | 野生 |
| NIB-035 | 中国河北省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-036 | 中国河北省 | 原形 | 2009 | 尖 |
| NIB-057 | 中国山東省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-059 | 中国河北省 | 刻み | 2010 | 栽培 |
| NIB-073 | 中国河北省 | 刻み | 2008 | 野生(主に使用) |
| NIB-089 | 中国河北省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-105 | 中国河北省 | 刻み | 2009 | 栽培(主に使用) |
| NIB-106 | 中国内蒙古自治 | 刻み | 2008 | 野生(尖) |
| NIB-142 | 中国河北省 | 原形 | 2001 | 片ゴン |
| NIB-145 | 中国河北省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-167 | 中国陝西省 | 原形 | 2009 | 栽培(主に使用) |
| NIB-174 | 中国河北省 | 小刻 | 2010 | 野生(尖) |
| NIB-175 | 中国陝西省 | 原形 | 2009 | 栽培(3年生) |

カンゾウ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|---------|----|------|------------------|
| NIB-003 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2009 | 西北丁級 |
| NIB-004 | 中国寧夏省 | 原形 | 2008 | 西北丁級 |
| NIB-005 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2008 | 東北1号 |
| NIB-006 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2008 | 東北2号 |
| NIB-007 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2008 | 東北3号 |
| NIB-037 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2010 | 東北3号 |
| NIB-038 | 中国甘肅省 | 原形 | 2010 | 西北丁級 |
| NIB-054 | 中国吉林省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-074 | 中国甘肅省 | 刻み | 2008 | 野生品西北(主に使用) |
| NIB-090 | 中国寧夏省 | 刻み | 2008 | 西北甘草 |
| NIB-107 | 中国寧夏省 | 刻み | 2010 | 野生品・西北甘草・丙(主に使用) |
| NIB-108 | 中国寧夏省 | 刻み | 2009 | 野生品・西北甘草・乙(主に使用) |
| NIB-109 | 中国内蒙古自治 | 刻み | 2010 | 野生品・西北甘草・丙(主に使用) |
| NIB-146 | 中国甘肅省 | 刻み | 2006 | 西北 |
| NIB-168 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2009 | 野生品(主に使用) |
| NIB-176 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2010 | 野生品(東北甘草・2号) |

ショウキョウ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|------|------|--------------|
| NIB-008 | 中国雲南省 | 原形 | 2010 | 無硫片 |
| NIB-039 | 中国雲南省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-055 | 中国雲南省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-060 | 中国雲南省 | 刻み | 2008 | |
| NIB-075 | 中国雲南省 | スライス | 2006 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-091 | 中国雲南省 | 刻み | 2009 | |
| NIB-110 | 中国雲南省 | 刻み | 2010 | 栽培品 |
| NIB-147 | 中国雲南省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-169 | 中国雲南省 | 原形 | 2009 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-179 | 中国雲南省 | 原形 | 2010 | |

ソウジュツ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|---------|----|------|--------------|
| NIB-009 | 中国湖北省 | 原形 | 2008 | 古立 |
| NIB-010 | 中国内蒙古自治 | 原形 | 2010 | 津 |
| NIB-158 | 中国湖北省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-192 | 中国湖北省 | 原形 | 2008 | |
| NIB-111 | 中国湖北省 | 原形 | 2009 | 野生品 |
| NIB-148 | 中国湖北省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-181 | 中国湖北省 | 原形 | 2010 | 古立 |
| NIB-182 | 中国陝西省 | 原形 | 2010 | |

ニンジン

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------|
| NIB-011 | 中国吉林省 | 原形 | 2009 | 生干 |
| NIB-012 | 中国吉林省 | 原形 | 2008 | 湯通 |
| NIB-040 | 中国吉林省 | 原形 | 2007 | 5-6年根 |
| NIB-056 | 中国吉林省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-061 | 中国吉林省 | 刻み | 2009 | 湯通 |
| NIB-067 | 中国吉林省 | 原形 | 2009 | 栽培品 |
| NIB-076 | 中国吉林省 | 刻み | 2009 | 栽培品 生干(主に使用) |
| NIB-077 | 中国吉林省 | 刻み | 2009 | 栽培品 湯通 |
| NIB-093 | 中国遼寧省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-112 | 中国吉林省 | 原形 | 2010 | 栽培品 湯通 |
| NIB-113 | 中国吉林省 | 原形 | 2009 | 栽培品 紅参 |
| NIB-114 | 中国吉林省 | 刻み | 2010 | 栽培品 生干(主に使用) |
| NIB-149 | 中国吉林省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-170 | 中国吉林省 | 原形 | 2010 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-183 | 中国吉林省 | 原形 | 2009 | 生干 |
| NIB-184 | 日本福島県 | 原形 | 2007 | 湯通 |

オウレン

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------|
| NIB-013 | 中国四川省 | 原形 | 2010 | 3等級 |
| NIB-041 | 中国雲南省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-042 | 中国重慶 | 原形 | 2008 | 3等級 |
| NIB-094 | 中国四川省 | 原形 | 2008 | |
| NIB-115 | 日本岐阜県 | 原形 | 2010 | 栽培品 |
| NIB-116 | 中国重慶 | 刻み | 2010 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-150 | 中国四川省 | 原形 | 2009 | 栽培品 |
| NIB-185 | 日本福井県 | 原形 | 2010 | 越前 |
| NIB-186 | 中国四川省 | 原形 | 2010 | 1等級 |
| NIB-215 | 中国四川省 | 原形 | 2009 | |

ケイヒ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------|
| NIB-014 | ベトナム | 原形 | 2010 | YBV |
| NIB-015 | 中国広西省 | 刻み | 2010 | 東興 |
| NIB-043 | 中国広西省 | 刻み | 2009 | |
| NIB-062 | 中国広西省 | 刻み | 2007 | 東興 |
| NIB-068 | 中国広東省 | 刻み | 2009 | 栽培品 |
| NIB-069 | 中国広西省 | 刻み | 2009 | 栽培品 |
| NIB-070 | ベトナム | 刻み | 2008 | 栽培品 |
| NIB-078 | 中国広東省 | 刻み | 2009 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-095 | ベトナム | 刻み | 2009 | |
| NIB-117 | 中国広東省 | 砕 | 2010 | 栽培品・広南 |
| NIB-118 | ベトナム | 刻み | 2009 | 栽培品・ベトナム |
| NIB-119 | 中国広西省 | 砕 | 2010 | 栽培品・東興 |
| NIB-151 | 中国広西省 | 刻み | 2009 | 広南 |
| NIB-171 | 中国広西省 | 原形 | 2009 | 半野生品(主に使用) |
| NIB-187 | 中国広西省 | 刻み | 2010 | 広南 |
| NIB-188 | ベトナム | 原形 | 2010 | YB3 |
| NIB-222 | 中国広西省 | 原形 | 2010 | |

ジオウ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|---------------|
| NIB-021 | 中国河南省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-022 | 中国河南省 | 原形 | 2004 | 熟1級 |
| NIB-045 | 中国河南省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-071 | 中国山西省 | 原形 | 2009 | 栽培品 |
| NIB-126 | 中国河南省 | 刻み | 2010 | 栽培品・乾地黄(主に使用) |
| NIB-127 | 中国河南省 | 刻み | 2008 | 栽培品・熟地黄 |
| NIB-155 | 中国山西省 | 刻み | 2009 | 乾地黄 |
| NIB-156 | 中国山西省 | 原形 | 2010 | 熟地黄 |
| NIB-194 | 中国山西省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-195 | 中国山西省 | 原形 | 2009 | 熟地黄 |
| NIB-219 | 中国河南省 | 原形 | 2010 | |

シャクヤク

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------------|
| NIB-023 | 中国安徽省 | 原形 | 2010 | 皮付 |
| NIB-024 | 中国浙江省 | 原形 | 2009 | 皮付 |
| NIB-046 | 中国四川省 | 刻み | 2009 | |
| NIB-063 | 日本長野県 | 原形 | 2009 | |
| NIB-072 | 中国安徽省 | 刻み | 2008 | 栽培品 |
| NIB-082 | 中国安徽省 | 刻み | 2008 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-083 | 中国安徽省 | 原形 | 2008 | 皮付 |
| NIB-098 | 中国四川省 | 刻み | 2009 | |
| NIB-128 | 中国安徽省 | 刻み | 2009 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-129 | 日本奈良県 | 原形 | 2010 | 栽培品・大和芍薬 |
| NIB-130 | 日本新潟県 | 原形 | 2010 | 栽培品・奈良県以外で栽培した国産芍薬 |
| NIB-157 | 中国安徽省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-172 | 中国安徽省 | 原形 | 2009 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-197 | 日本奈良県 | 刻み | 2010 | 大和芍薬 |
| NIB-225 | 日本奈良県 | 原形 | | |

トウキ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------------|
| NIB-029 | 日本北海道 | 原形 | 2010 | |
| NIB-065 | 日本北海道 | 刻み | 2010 | 北海当帰 |
| NIB-066 | 日本奈良県 | 刻み | 2010 | 大和当帰 大深 |
| NIB-085 | 日本北海道 | 原形 | 2009 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-102 | 中国浙江省 | 刻み | 2010 | |
| NIB-136 | 中国四川省 | 原形 | 2009 | 栽培品・大和当帰(主に使用) |
| NIB-137 | 日本奈良県 | 原形 | 2009 | 栽培品・大和当帰 |
| NIB-138 | 日本新潟県 | 原形 | 2008 | 栽培品・奈良県以外で栽培した国産当帰 |
| NIB-162 | 中国四川省 | 原形 | 2009 | 和種(栽培品) |
| NIB-173 | 中国山東省 | 原形 | 2009 | ?? |
| NIB-204 | 日本奈良県 | 原形 | 2010 | 大和当帰 |
| NIB-218 | 日本群馬県 | 原形 | 2010 | |

サイコ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|-----------------|
| NIB-017 | 日本茨城県 | 原形 | 2010 | |
| NIB-018 | 中国遼寧省 | 原形 | 2010 | 中国栽培三島 |
| NIB-080 | 中国湖北省 | 刻み | 2007 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-121 | 中国河北省 | 刻み | 2007 | 野生品・津柴胡(主に使用) |
| NIB-122 | 中国四川省 | 刻み | 2010 | 栽培品・中国で栽培した三島柴胡 |
| NIB-123 | 日本茨城県 | 原形 | 2010 | 栽培品・三島柴胡 |
| NIB-153 | 中国甘肅省 | 刻み | 2008 | 野生品 |
| NIB-190 | 中国河北省 | 原形 | 2010 | 天津柴胡 |
| NIB-191 | 中国四川省 | 原形 | 2010 | ミシマサイコ・2年生 |
| NIB-220 | 中国四川省 | 原形 | | |

サンシシ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------|
| NIB-019 | 中国浙江省 | 原形 | 2010 | 水梔子の選別品 |
| NIB-020 | 中国江西省 | 原形 | 2008 | 山梔子 |
| NIB-044 | 中国広西省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-081 | 中国浙江省 | 刻み | 2009 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-097 | 中国浙江省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-124 | 中国広西省 | 原形 | 2009 | 栽培品・長手(主に使用) |
| NIB-125 | 中国江西省 | 刻み | 2009 | 栽培品・丸手 |
| NIB-154 | 中国浙江省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-192 | 中国安徽省 | 原形 | 2009 | 紅梔子 |
| NIB-193 | 中国広西省 | 原形 | 2010 | 水梔子 |
| NIB-224 | 中国四川省 | 原形 | | |

ゴジツ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------|
| NIB-016 | 中国河南省 | 原形 | 2010 | 特級去頭 |
| NIB-079 | 中国河南省 | 刻み | 2008 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-096 | 中国河南省 | 原形 | 2007 | |
| NIB-120 | 中国河南省 | 刻み | 2009 | 栽培品 |
| NIB-152 | 中国河南省 | 刻み | 2007 | |
| NIB-189 | 中国河南省 | 刻み | 2009 | |
| NIB-212 | 中国河南省 | 原形 | | |

シャゼンシ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------|
| NIB-025 | 中国江西省 | 原形 | 2008 | |
| NIB-047 | 中国浙江省 | 原形 | 2006 | |
| NIB-099 | 中国江西省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-131 | 中国江西省 | 原形 | 2008 | 栽培品 |
| NIB-158 | 中国江西省 | 原形 | 2007 | |
| NIB-198 | 中国広西省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-213 | 中国江西省 | 原形 | 2010 | |

ダイオウ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-------|----|------|--------------|
| NIB-028 | 中国四川省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-049 | 中国四川省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-101 | 中国青海省 | 原形 | 2008 | |
| NIB-134 | 中国四川省 | 刻み | 2009 | 野生品・雅黄(主に使用) |
| NIB-135 | 中国青海省 | 刻み | 2004 | 野生品・錦紋大黄(箱黄) |
| NIB-161 | 中国四川省 | 原形 | 2009 | 3~4等級 |
| NIB-201 | 中国青海省 | 原形 | 2009 | 包黄 |
| NIB-202 | 中国四川省 | 原形 | 2008 | 雅黄・1級 |
| NIB-223 | 中国青海省 | 原形 | | |

ビャクジュツ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|--------|----|------|--------------|
| NIB-030 | 北朝鮮 | 原形 | 2010 | |
| NIB-050 | 中国遼寧省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-086 | 中国黒竜江省 | 刻み | 2009 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-103 | 中国黒竜江省 | 原形 | 2009 | |
| NIB-139 | 中国黒竜江省 | 刻み | 2009 | 野生品 |
| NIB-163 | 中国黒竜江省 | 原形 | 2010 | 皮去品 |
| NIB-164 | 中国浙江省 | 原形 | 2010 | |
| NIB-206 | 中国浙江省 | 原形 | 2008 | 唐白朮 |
| NIB-217 | 中国黒竜江省 | 原形 | | |

マオウ

| 管理番号 | 産地 | 形態 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|-----------|----|------|--------------|
| NIB-033 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2010 | 刻 |
| NIB-034 | 新疆ウイグル自治区 | 刻み | 2009 | 刻 |
| NIB-053 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2009 | |
| NIB-088 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2008 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-104 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2009 | |
| NIB-141 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2008 | 野生品 |
| NIB-144 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2008 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-166 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2004 | |
| NIB-209 | 中国内モンゴ自治 | 刻み | 2009 | |
| NIB-210 | 中国甘肅省 | 刻み | 2009 | |
| NIB-216 | 中国内モンゴ自治 | 原形 | | |

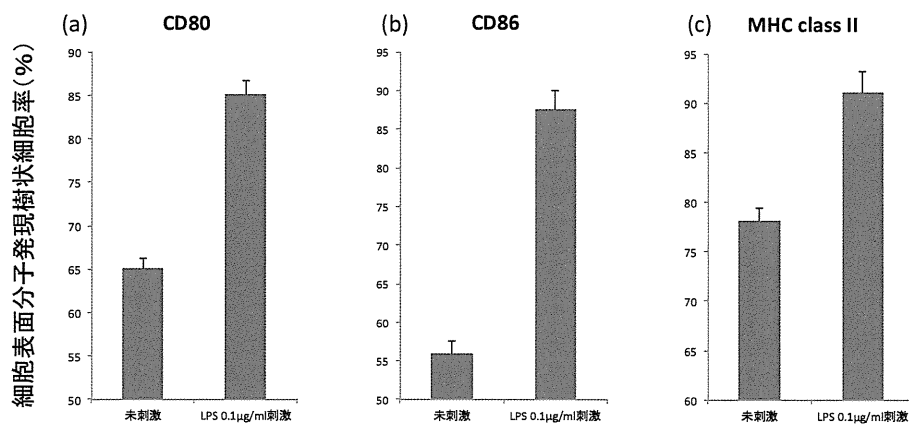


図1. 細胞表面分子を発現した樹状細胞の割合

(a)CD80、(b)CD86、(c)MHC class IIの各細胞表面分子が発現した樹状細胞の割合を示す。LPS刺激(0.1µg/ml、24時間)により、細胞表面分子が発現した樹状細胞は増加した。

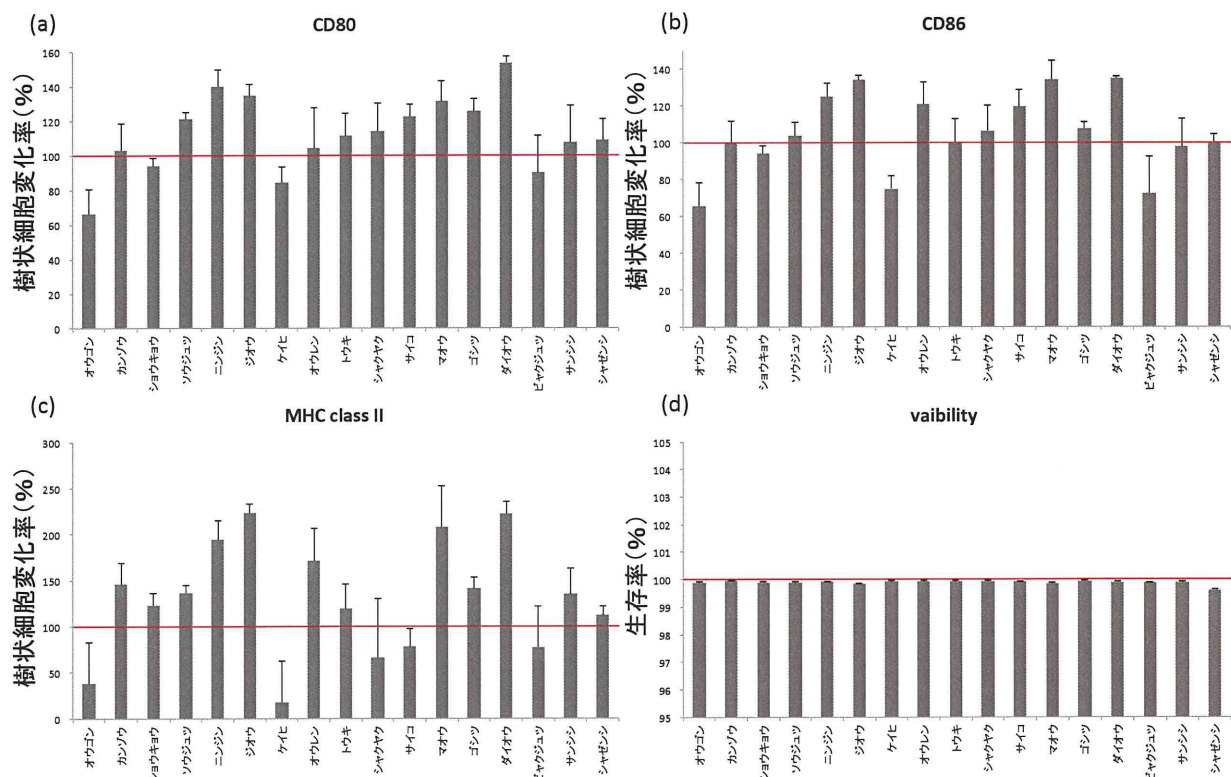


図2. 生薬エキス標準品による効果

LPS刺激(0.1 μ g/ml、24時間)と同時に生薬エキス標準品(100 μ g/ml)を処理し、LPS刺激によるCD80、CD86、MHC class IIが発現した樹状細胞の増加に対する変化率を示す(a-c)。処理24時間後の細胞生存率を示す(d)。

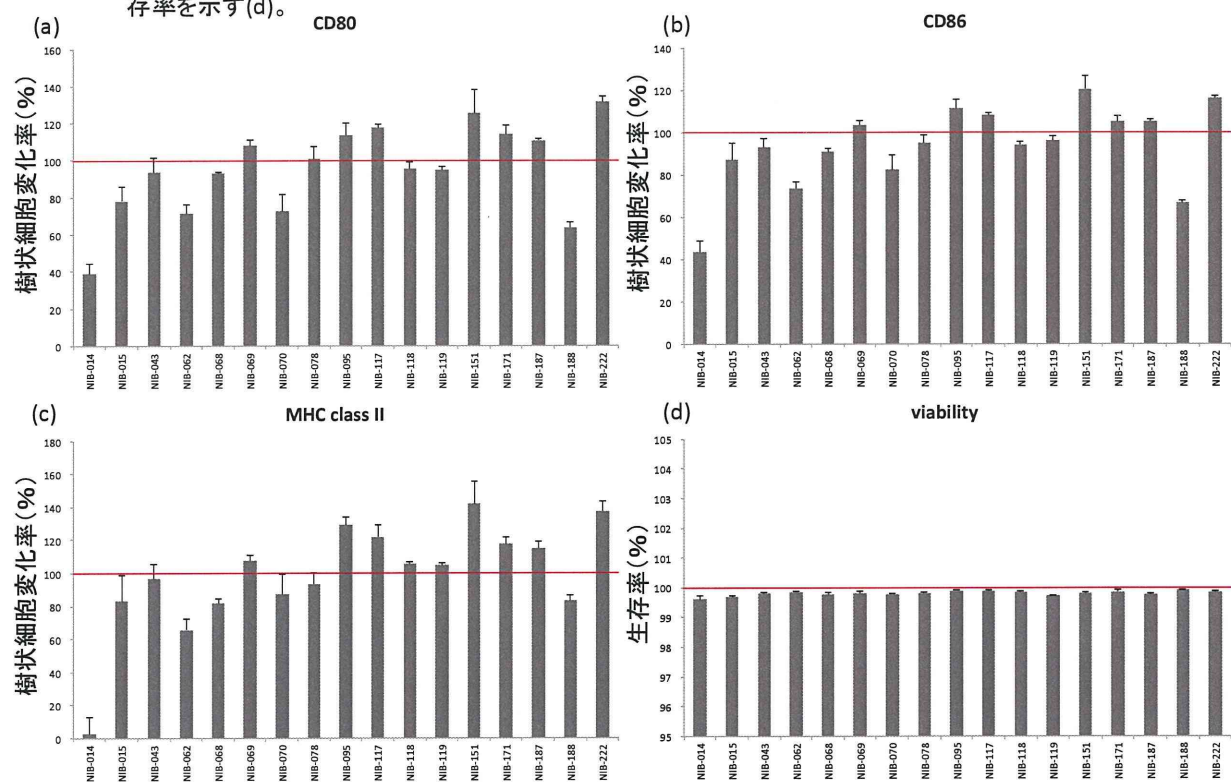


図3. ケイヒエキスの各ロットによる効果

LPS刺激(0.1 μ g/ml、24時間)と同時にケイヒエキスの各ロット(100 μ g/ml)を処理し、LPS刺激によるCD80、CD86、MHC class IIが発現した樹状細胞の増加に対する変化率を示す(a-c)。処理24時間後の細胞生存率を示す(d)。

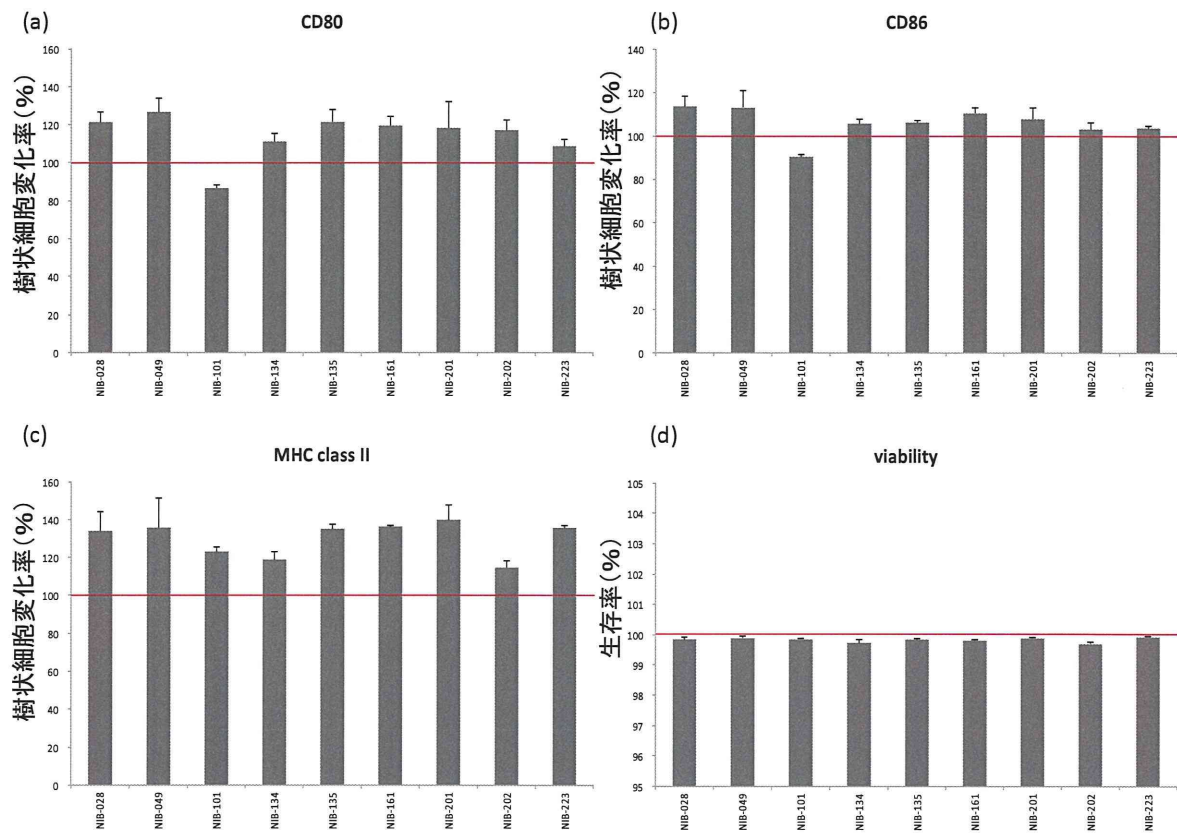


図4. ダイオウエキスの各ロットによる効果

LPS刺激(0.1 μ g/ml、24時間)と同時にダイオウエキスの各ロット(100 μ g/ml)を処理し、LPS刺激によるCD80、CD86、MHC class IIが発現した樹状細胞の増加に対する変化率を示す(a-c)。処理24時間後の細胞生存率を示す(d)。

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 生物活性情報及び成分分析データ情報に関する研究

研究分担者 富山大学和漢医薬学総合研究所 所長 済木 育夫

抗アルツハイマー病活性を志向した *in vitro* assay 系による評価

研究協力者 富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物研究センター
薬効解析部准教授 東田 千尋

総合情報データベース構築に資する、生薬の生物活性を検討するため、抗アルツハイマー病作用を予測し得る 3 種の *in vitro* アッセイ系を実施した。サンシシ、カンゾウ、ニンジン、ゴシツに特に有効性が認められた。

A. 研究目的

漢方薬に使用される種々の薬用植物の生物活性を検討し、結果をデータベースに登録する。本年度は、抗アルツハイマー病作用を予測し得る 3 種の *in vitro* アッセイ系を用いて生物活性の検討を行うことを目的とした。

Calpain-Glo Protease Assay kit (Promega) を用いた。Glo 試薬に精製 calpain (2 nM) と生薬エキス(1 µg/ml, 10 µg/ml)を同時に加え、Calpain 酵素活性による発光反応に対する影響を検討した。ポジティブコントロールとしては、calpain 阻害剤 MDL28170 (0.5 nM – 1 µM) を用いた。阻害活性としての値は、Calpain 酵素未添加のブランクでの発光値を 100%として算出した。

B. 研究方法

1) 生薬エキス

今年度は、オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、シャゼンシの 17 種について活性を検討した。Calpain 酵素阻害活性については、さらに、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウを加えた 20 種について検討した。いずれも、異なる産地のサンプルを等量混合したエキスを別途準備し、それを用いてまず一次評価を行った。

2) Calpain 酵素阻害活性

3) Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制作用

動物の取り扱いは富山大学動物実験指針に従った。胎生 14 日齢の ddY マウス (Japan SLC) から取り出した胎児を PBS で洗浄後、断頭し、初代培養用に作成した培地 [Neurobasal media (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中に 12% 馬血清 (Invitrogen), 2 mM L-グルタミン酸, 0.6% グルコースを溶解] に入れた。培地中で、実体顕微鏡 (SMZ-10, Olympus) 下で大脳皮質

のみを単離した。大脳皮質を安全キャビネット内で約 1 mm 角に切断した。700 rpm で 3 分間遠心した後、上清を除去し、沈殿物に 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Invitrogen) を 2 ml 加え、懸濁した。37°C で 15 分間、5 分置きに攪拌しながらインキュベーションし、培地を 4 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心して上清を除去し、沈殿に 0.004% DNase I (Invitrogen)-0.03% trypsin inhibitor (Gibco BRL)-PBS 溶液を 2 ml 加え、懸濁した。さらに、37°C で 15 分間、5 分置きに攪拌しながらインキュベーションし、培地を 4 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心し、沈殿に培地を 4 ml 加えた。先端を炙りなめしたパスツールピペットで細胞塊が見えなくなるまで穏やかに懸濁した後、70 μ m nylon cell strainer (Falcon, New Jersey, USA) で濾過した。さらに HBSS 溶液で細胞を 2 回洗浄し細胞液とした。前日にコーティング [Poly-D-Lysine (PDL, Sigma- Aldrich) を PBS で 0.005 mg/ml に希釈したものをまき、37°C でインキュベーションしたもの。培養当日に PBS で 2 回洗浄。] した及び白色 96-well 細胞培養用マイクロテストプレート (Falcon) に、 0.5×10^5 cells / well になるよう播種した。37°C、10% CO₂、飽和水蒸気下で培養を開始し、翌日に培地を全量、馬血清の代わりに B-27 supplement (Invitrogen) を含む新しい培地で交換した。その際、20 μ M A β (25-35) 及び生薬エキス (1 μ g/ml, 10 μ g/ml) を同時処置し、2 日後に cell viability を測定した。A β (25-35) (Sigma) はあらかじめ滅菌蒸留水に溶解後、37°C で 4 日間インキュベーションし線維化させたものを用いた。Cell viability は、A β (25-35) とエキスとの同時処置期間終了後、96-well マイクロテストプレートを

室温で 30 分静置した。30 分後、CellTiter-Glo 試薬 (Promega,) [室温で融解させた 10 ml CellTiter-Glo buffer を CellTiter-Glo substrate へ添加し、溶解させたもの] を 100 μ l / well ずつ加え、2 分間攪拌し、室温で 10 分間静置した。その後、GENios マルチプレートリーダー (和光純薬) を用いて、発光シグナルを測定した。阻害活性としての値は、A β (25-35) 無処置細胞での細胞生存率と、A β (25-35) 処置細胞での細胞生存率の差を 100% とした。つまり、阻害率の値が正の数として 100% に近くなれば、正常細胞の生存率に近づいている、すなわち神経保護作用があることを示す。

4) Amyloid β 誘発の神経突起萎縮に対する抑制作用

上記 2) の要領で、胎生 14 日齢 ddY マウスより大脳皮質神経細胞を初代培養し、 0.8×10^5 cells / well になるよう 0.5×10^5 cells / well になるよう播種した。その翌日、B-27 supplement を含む無血清培地 (2% B-27 supplement, 2 mM L-グルタミン酸、0.6% グルコースを Neurobasal media に溶解) に全量交換した。培養開始 3 日後、37°C で 4 日間インキュベーションし線維化させた 10 μ M A β (25-35) を処置し、そのまま 3 日間培養した。その後、各濃度の生薬エキスを処置し 3 日後に固定した。薬物処置期間終了後、培地を除いて PBS で洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA, 和光純薬) -PBS 溶液を各 well に約 150 μ l ずつ加え、90 分間室温で静置し、細胞を固定した。0.3% triton X-100 (和光純薬) -PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った。その後、全量 100 μ l の 1 次抗体溶液 [0.3% triton X-100-PBS 溶液、1% normal goat serum (NGS, 和光純薬)、1 次抗体] を加え、4°C で一晩反応させ

た。1次抗体には、マウス抗リン酸化型 NF-H モノクローナル抗体 (1:500) (COVANCE, Emeryville, CA, USA)、ラビット抗 MAP2 ポリクローナル抗体 (1:500) (ミリポア) を用いた。翌日、1次抗体溶液を除き、0.3% triton X-100-PBS 溶液で5分間の洗浄を2回行った後、全量 100 μ l の2次抗体溶液 [0.3% triton X-100-PBS 溶液, Alexa Fluor 488 標識 ヤギ抗マウス IgG 抗体(1:300) (Molecular Probes), Alexa Fluor 568 標識 ヤギ抗マウス IgG 抗体(1:300) (Molecular Probes)] を加え、遮光下の室温で2時間反応させた。反応後、2次抗体溶液を除き、PBS で5分間、2回洗浄し、Aqua Poly Mount (Polysciences, Warrington, USA) で封入した。蛍光顕微鏡 (BX-61, Olympus) を用いて、各薬物処置を施した well から 648 μ m \times 860 μ m で10枚の画像をデジタル画像撮影装置 DP70 (Olympus) を用いて取得した。それらの画像について、画像解析ソフト Neurocyte Image Analyzer ver.1.5 (Kurabo, 大阪) を用いて、画面全体の pNF-H 陽性、MAP2 陽性の神経突起の長さを測定した。また、各画面中の MAP2 陽性の神経細胞体の数を測定し、画面全体の軸索あるいは樹状突起の長さを神経細胞体の数で割ることにより、神経細胞当たりの長さを算出した。

C. 研究結果

1) Calpain 酵素阻害活性

ポジティブコントロールである MDL28170 による calpain 酵素活性阻害作用において、0.1 μ M MDL28170 では約 40%の阻害がみられた。50 nM 以下では用量に依存した阻害活性の変化が見られず、安定した数値も得られにくい発光範囲であった。そこで本アッセイでは、40%以上の阻害活性を示すエキスを

「Calpain 阻害活性が認められる」と判断することとした (Fig. 1)。

生物活性評価においては、由来のことなる個々の生薬エキスを均等量混ぜた mixture を用意し、まずその活性を測定する。有効性が認められた場合は個々の生薬エキスについても検討する、という手順を踏襲している。本年度検討した 20 種の生薬エキスのうち、Calpain 活性を有意に変動させたものはなかった (Fig. 2, Fig. 3)。

2) Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制作用

A β (25-35)の2日間処置により、大脳皮質神経細胞の約 40%が死滅した。本年度検討した 17 種の生薬エキスのうち、オウレンに細胞毒性が強く Amyloid β 誘発神経細胞死によって減少した細胞数をさらに減少させた。一方、サンシシは細胞死阻害活性を有意に示した。その他の生薬エキスは無効だった (Fig. 4, Fig. 5)。

3) Amyloid β 誘発の神経突起萎縮に対する抑制作用

A β (25-35)の3日間後にエキスを処置し、さらにその3日後に、大脳皮質神経細胞の樹状突起の長さ、軸索の長さを細胞当たりの長さとして算出した。A β (25-35)のみ処置すると、樹状突起、軸索ともにその長さが有意に減少した。生薬エキスを後処置することにより、樹状突起を有意に伸展させたのは、カンゾウ、ソウジュツ、ニンジン、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、マオウ、シャクヤク、トウキであった。また軸索を有意に伸展させたのは、カンゾウ、ニンジン、ゴシツであった。オウレンは、細胞毒性が強いため評価できなかった (Fig. 6, Fig. 7)。