

119	15771	ANJANAKOOTA	スリランカ	Galena	方鉛鉱	PbS
120	11978	Shora	インド	Niter	硝石	KNO ₃

Figure 6. 実験材料のデータとX線粉末回折法により明らかとなった含有される鉱物名、和名、および化学構造式

*TMPW No.: 富山大学和漢医薬学総合研究所附属民族薬物研究センター 民族薬物資料館の標本番号

番号	TMPW No.*	市場名	市場国名	鉱物名	和名	化学構造式
121	11981	Lal ret	インド	Almandine	石榴石類	Fe ₃ Al ₂ (SiO ₄) ₃
122	11990	Suhag	インド	Tincalconite	ティンカルコナイト	Na ₂ B ₄ O ₇ ·5H ₂ O
123	12060	Safeda Kashgiri	インド	Barite	重晶石	BaSO ₄
124	12068	Jaharmora khatai	インド	Orthochrysotite	蛇紋石類	Mg ₃ Si ₂ O ₅ (OH) ₄
125	12263	Soda Mitha	インド	Nahcolite	ナーコライト	NaHCO ₃
126	12303	Jorgar	インド	Halite, Sylvite	岩塩、カリ岩塩	NaCl, KCl
127	12408	Phitkiri Lal	インド	Tschermigite	ツェルミツヒ石	(NH ₄)Al(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O
128	12435	Suhaga Chokiyān	インド	Tincalconite	ティンカルコナイト	Na ₂ B ₄ O ₇ ·5H ₂ O

Figure 7. 実験材料のデータとX線粉末回折法により明らかとなった含有される鉱物名、和名、および化学構造式

*TMPW No.: 富山大学和漢医薬学総合研究所附属民族薬物研究センター 民族薬物資料館の標本番号

厚生労働科学研究費補助金(地域医療基盤開発推進研究事業)
分担研究年報告書

漢方処方薬の薬効薬理解析

研究分担者: 富山大学 和漢医薬学総合研究所 門脇 真

研究要旨 これまでに、漢方薬に多く用いられている 80 種類の生薬の抽出物及び 80 種類の生薬含有標準化合物質を用いて、粘膜型マスト細胞の活性化抑制作用についてのスクリーニングを行い、シコニンに最も強い作用を見出した。そこで、シコニンの薬理作用機序を解明するため、網羅的遺伝子発現解析などにより検討し、その結果、シコニンは核内オーファン受容体 NR4A の遺伝子発現を抑制すること明らかにした。本研究では、シコニンの作用発現における NR4A の役割の解明およびシコニンのターゲット・タンパク質の探索を行った、その結果、シコニンはカルシウム結合タンパク質であるカルシニューリンの作用を抑制し、さらにカルシニューリンにより亢進される NR4A 遺伝子発現の抑制を介して、マスト細胞の活性化抑制作用を示すことを示唆した。

A. 研究目的

食物アレルギーは、本来免疫応答しないはずの食餌成分を、排除しなくてはならない「異物」に生体が暴露されていると認識したために惹起された生物学的ストレスである。厚生労働省による調査では、約 33 万人の児童が食物アレルギーを罹患していることが報告されているが、これまで食物アレルギーに対しては有効な治療薬が見出されていない。我々はヒト食物アレルギーの病態に類似したマウスモデルを用い、腸管で粘膜型マスト細胞が著しく増多すること、腸管マスト細胞を持たないマウスで食物アレルギーが発症しないことなどから、粘膜型マスト細胞が食物アレルギーの発症に深く関与することを明らかにしている。そこで、食物アレルギーに対して治療効果を示す薬物を和漢薬や薬用植物の中から探索することを目的とし、和漢医薬学総合研究所が所有する和漢薬ライブラリーを用いて、マスト細胞の活性化抑制作用についてスクリーニングを行い、シコニンに最も強い作用を見出した。シコニンを主成分とする紫根は、江戸時代の医師・華岡青洲が創案した

漢方薬紫雲膏の主要な生薬成分であり、紫雲膏はひび・あかぎれ・切り傷・火傷・かぶれ・褥瘡などの皮膚症状や痔疾の治療にも用いられている。また、最近になりシコニンには、抗炎症作用、肉芽形成促進作用、抗菌作用、抗腫瘍作用など幅広い薬理作用が報告されている。また、2005 年から 4 年間に渡り行われた南米ペルーでの臨床試験により、紫雲膏は、全世界に約 1200 万人の患者がいると推測されているリーシュマニア症に非常に有効な薬物であるということが報告された。これは、紫雲膏の肉芽形成促進作用と抗原虫作用によるものと考えられるが、詳しい作用機序は分かっていない。

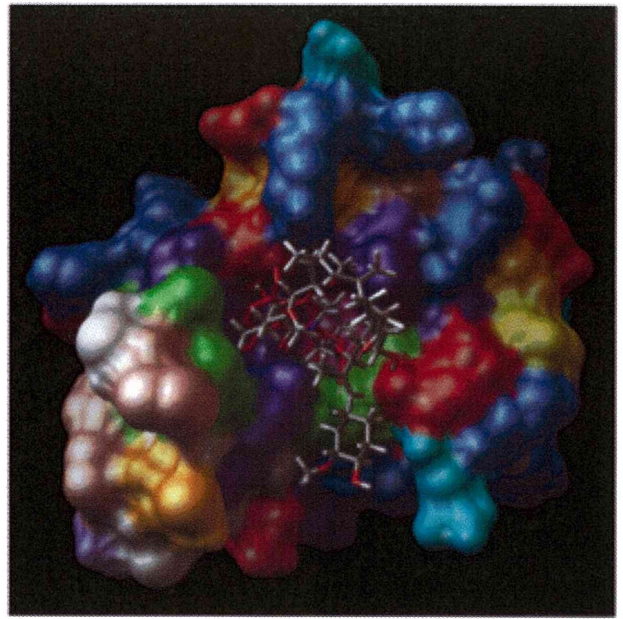
B. 研究方法

本研究では siRNA を用いて NR4A(nuclear receptor, family 4A)をノックダウンした。また、シコニンのターゲット・タンパク質の同定が必要であるため、タンパク質構造情報に基づくバーチャルスクリーニングを活用したインシリコ・ターゲット・タンパク探索を行った。

C. 研究結果

・粘膜型骨髄細胞由来マスト細胞に対する抑制作用

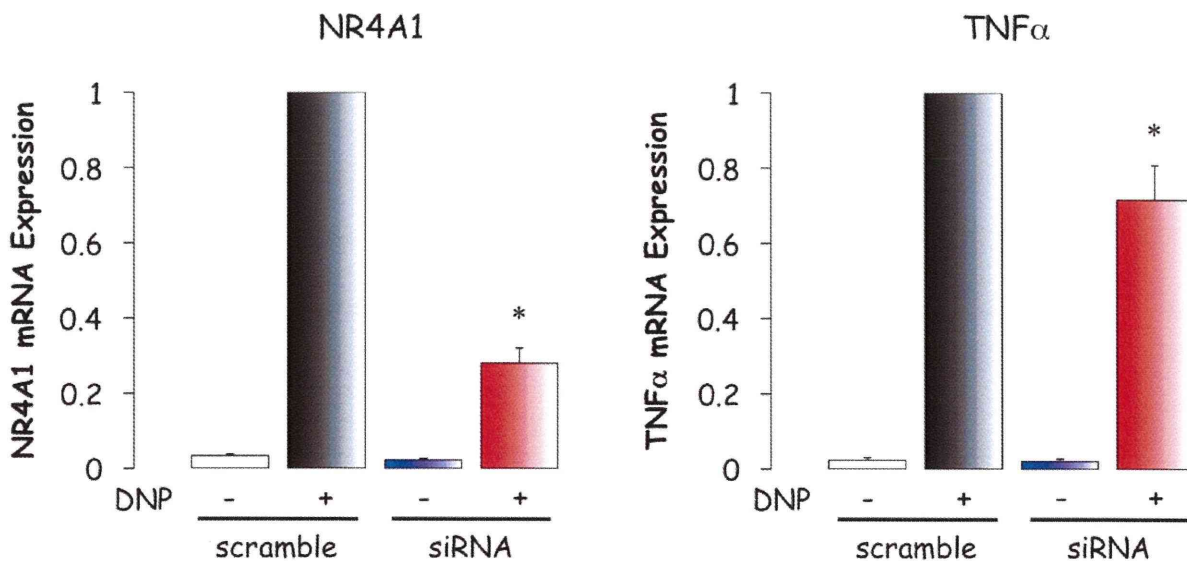
網羅的遺伝子発現解析では、DNP-BSA による抗原刺激およびカルシウム・イオノフォア A23187 による刺激により、特徴的に核内オーファン受容体の NR4A サブファミリー NR4A1、NR4A2、NR4A3 が、非常に強く発現亢進していたが、シコニンはいずれの刺激に対しても、この発現亢進をほぼ完全に抑制した。さらに、現在 NR4A1 の発現を抑制する薬剤が見出されていないので、NR4A1 に対する siRNA (small interfering RNA) の細胞内移入による遺伝子発現抑制を行ったところ、DNP-BSA 抗原刺激による腫瘍壊死因子 TNF α の遺伝子発現が抑制された。従って、シコニンは核内オーファン受容体の NR4A サブファミリーの発現を抑制することにより、マスト細胞の活性化を抑制することが示唆された。



多様な薬理作用を持つシコニンの詳細な作用機序を解明するためには、シコニンのターゲット・タンパク質の同定が必要であるため、タンパク質構造情報に基づくバーチャルスクリーニングを活用したインシリコ・ターゲット・タンパク探索を行った。まず、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンと、カルシウム結合タンパク質であるカルシニューリンに結合する FKBP との結合シミュレ

N=4

* P<0.05 vs scramble DNP+



マスト細胞での NR4A1 のノックダウン

・ターゲット・タンパク探索

シコニンおよび FK506 と FKBP の結合シミュレーション;シコニン (赤色) の FKBP への結合部位は、FK506 (灰色) の結合部位と類似性が高い

ーションを行った。その結果、シコニンのカルモジュリンへの結合部位はカルモジュリン阻害剤である W-7 と全く違う部位であった。それに対し、FKBP への結合部位は、FKBP の阻害剤である FK506 の結合部位と類似性が高いことがわかった。

D. 考察・結論

シコニンの作用機序を解明するため、GeneChipを用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ、シコニンは、粘膜型マスト細胞の活性に伴い発現が劇的に上昇する核内オーファン受容体 NR4A の遺伝子発現を著明に抑制した。

さらに、siRNA により NR4A1 の遺伝子発現を抑制したところ、粘膜型マスト細胞に多く発現し、アレルギー性炎症を引き起こす TNF α の遺伝子発現が抑制された。従って、網羅的遺伝子解析で明らかとなったシコニンによる核内オーファン受容体の NR4A サブファミリーの発現抑制は、シコニンによるマスト細胞の不活性化にともなう事象ではなく、シコニンが NR4A サブファミリーの発現抑制を介してマスト細胞を不活性化させることが明らかとなった。

また、シコニンの詳細な作用機序を解明するため、シコニンのターゲット・タンパク質の同定を試みた。シコニンは NR4A サブファミリーである NR4A1、NR4A2 および NR4A3 に同様な作用があるため、NR4A サブファミリーの上流にターゲット・タンパク質がある可能性があること、シコニンは抗原刺激およびカルシウム・イオノフォア刺激によるマスト細胞の活性化に対しいずれにも抑制作用があることよりカルシウム結合タンパク質がターゲット・タンパク質である可能性があることより、カルシウム結合タンパク質との結合シミュレーションを行った。その結果、FK506 と同様に FKBP を阻害することにより、マスト細胞の活性化を抑制する可能性を示唆した。

本研究は漢方薬に多く用いられている 80 種類の生薬の抽出物及び 80 種類の生薬含有標準化合物質から見出した薬理作用を基に研究を展開している。一般的な医薬品シードであるケミカルライブラリーと違い、漢方薬には永年の多種多様な臨床情報という貴重な付加情報が付帯されている。この蓄積された臨床情報と先端的研究技術を駆

使した基礎研究という科学的基盤を有機的に融合することにより、臨床予測性の高いトランスレーショナル研究を推進することが可能となると考える。

本研究での紫根の主要な薬効成分であるシコニンの作用に関する基礎研究と、その科学的エビデンスに基づく新規かつ最適な適応症の開拓は、その研究成果を和漢医薬学関連研究者に還元することにより、漢方薬・和漢薬をベースとした新規治療薬開発に繋がる研究となると考えている。

F. 研究発表

Chemical inducers of heat shock proteins derived from medicinal plants and cytoprotective genes response.

Ahmed K, Furusawa Y, Tabuchi Y, Emam HF, Piao JL, Hassan MA, Yamamoto T, Kondo T, Kadowaki M.

Int J Hyperthermia. 2012; 28: 1-8.

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）

分担研究報告書

漢方処方配合生薬の資源の確保と標準化に関する研究

研究分担者 小松かつ子 富山大学 和漢医薬学総合研究所 教授

研究要旨 *Ephedra* 属植物 12 種の *trnK* 遺伝子イントロン領域の塩基配列を基に、日局マオウの基源種の一つである *E. intermedia* の検出法として、制限酵素 *Bsa*XI を用いる PCR-RFLP 法を開発した。本法を市場品 11 検体に適用した結果、甘肅省産の 4 検体は *E. intermedia* であり、確実に同定できることを証明した。残りの 7 検体は、*trnK* イントロン領域の塩基配列を直接解析することにより *E. sinica* であると確認した。

研究協力者 富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教 朱 姝

A. 研究目的

「麻黄」は『神農本草経』の中品に収載され、古来、発汗、利水、鎮咳薬として薬用に供されてきた。現在、麻黄は、葛根湯や麻杏甘石湯などの感冒の初期に用いられる漢方処方のほか、メタボリックシンドロームに応用される防風通聖散、関節リウマチに応用される越婢加朮湯、水鼻で冷えの伴う発熱に応用される麻黄附子細辛湯、気管支炎や鼻炎に応用される小青龍湯などにも配合されており、漢方ではなくてはならない重要な生薬である。日本で使用される「マオウ」は『第十六改正日本薬局方』に「*Ephedra sinica* Stapf、*E. intermedia* Schrenk et C. A. Meyer、又は *E. equisetina* Bunge の地上茎で、総アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）0.7 %以上を含む」と記されており、それらは専ら漢方薬に配合されて使用される。日本では年間約 570 トンのマオウを使用し、すべて中国からの輸入品である。しかし、現在中

国では砂漠化防止政策の一環として、輸出制限を行うようになった。そこで、麻黄の新たな資源を開発する目的で、モンゴル国産 *Ephedra* 属植物の基源と品質に関する研究を行ってきた。¹⁾ 昨年度はモンゴル国産 *Ephedra* 属 7 種と不明種 (*Ephedra* sp.) の核 ITS 領域の遺伝子解析を行い、局方適合種の分布域を明らかにするとともにモンゴル国南西部における同属植物の交雑の実態を明らかにした。²⁾ 今年度は、日局マオウの基源種のひとつである *E. intermeida* の簡便な検出法として葉緑体 *trnK* イントロン領域の配列に基づく PCR-RFLP 法を開発し、麻黄市場品の同定に応用した。

B. 研究方法

1. 実験材料

植物材料

- ・モンゴル国産 *E. sinica* 1 検体
(Voucher No. M1455)

- ・ 中国甘肅省産 *E. intermedia* 1 検体
(Voucher No. KANP02369)
- ・ 中国青海省産 *E. intermedia* 1 検体
(Voucher No. KANP02309)

生薬材料 (Table 1)

- ・ 日本市場品「マオウ」(内蒙古産 6 検体、甘肅省産 1 検体)
- ・ 中国市場品「麻黄」(内蒙古産 1 検体、甘肅省産 3 検体)

2. 実験方法 (PCR-RFLP 法)

1) PCR 法による *trnK* イントロン 5'末側部分領域の増幅

植物材料または生薬材料より各々約 80 mg を採取し、凍結粉碎した後 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, U.S.A.)を用いて tDNA を抽出した。これらを鋳型として *trnK* イントロン領域の部分配列を PCR 法で増幅した (Fig. 1)。10-100 ng の tDNA と 1 対の Primer (最終濃度 0.25 μ M) を反応溶液 [1 \times Green GoTaq Flexi Buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1.25 U GoTaq DNA polymerase (promega, U.S.A.)] に加え、全量を 50 μ l とした。Primer は、*trnK* In1F (ATG ACG ATT GAG ATT CTT TC) 及び *trnK* In4R (AGA TAG TTT TGT TGA TGT AAT AGC) を使用した。反応は、ホットスタート 95 $^{\circ}$ C (2 min)、続いて熱変性 95 $^{\circ}$ C (30 sec)、アニーリング 51 $^{\circ}$ C (30 sec)、伸長反応 72 $^{\circ}$ C (1 min) の条件を 35 サイクル行い、最後に 72 $^{\circ}$ C (10 min) で終了した。PCR 産物は、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, U.S.A.) を用いて精製した。

2) 制限酵素 *Bsa*XI による PCR 産物の切断

精製した PCR 産物 10 μ l に 10 \times Buffer4 2.0 μ l、制限酵素 *Bsa*XI (New England BioLab., U.S.A.) 2.0 μ l を加え、全量を 20 μ l とし、37 $^{\circ}$ C で 5 時

間インキュベートした。その後、反応液 5 μ l で 2% アガロースゲル電気泳動により、得られた断片を検出した。

C. 研究結果、考察

これまで解析したモンゴル国及び中国産 *Ephedra* 属 12 種の *trnK* イントロン領域の塩基配列を比較した結果、*E. intermedia* のみが上流から 568 番目~ 605 番目に 38bp の繰り返し配列が認められた。これらの配列で、NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>, New England BioLab. website) を用いて検索を行ったところ、38 bp の繰り返し配列上に制限酵素 *Bsa*XI の認識配列 [5'- γ (N)GGAG(N)₅GT(N)₁₂-3'] が認められた。したがって、*trnK* イントロン領域の 5'末側の部分配列を増幅し、制限酵素 *Bsa*XI を反応させることで *E. intermedia* の PCR 産物のみ切断され、これにより *E. intermedia* の同定ができると考えられた。また、生薬試料から得られた tDNA がほとんど断片化されており、長い PCR 産物の増幅が困難であることを考慮し、*trnK* In1F 及び *trnK* In4R の Primer 対を用いたところ、全ての試料から 308 bp または 346 bp の断片を増幅できた。それらに制限酵素 *Bsa*XI を反応させることで *E. intermedia* の PCR 産物のみ 92 bp, 30 bp 及び 224 bp の 3 断片に切断されると予想されたことから (Fig. 1)、植物材料の *E. sinica* と *E. intermeida* に対し本法を適用したところ、*E. sinica* では切断が認められず、*E. intermedia* では予想通り 92 bp と 224 bp の断片が確認された。ただし、30 bp の断片は非常に短いため確認することはできなかった (Fig. 2A)。

次に日本及び中国市場品 11 検体に対し、本法を用いて解析を行った。その結果、甘肅省産の 4 検体由来の PCR 産物で制限酵素 *Bsa*XI

による切断が認められたことから、これら 4 検体は *E. intermedia* であると判断した (Fig. 2B, Table 2)。残りの 7 検体は、*trnK* イントロン領域の塩基配列を直接解析することにより *E. sinica* であると確認された (Table 2)。

D. 結論

Ephedra 属植物 12 種の *trnK* 遺伝子イントロン領域の塩基配列を基に、日局マオウの基源種の一つである *E. intermedia* の検出法として、制限酵素 *Bsa*XI を用いる PCR-RFLP 法を開発した。また、本法を市場品に適用した結果、確実に同定できることを証明した。

E. 参考文献

- 1) Kitani Y., Zhu S., Omote T., Tanaka K., Batkhoo J., Sanchir C., Fushimi H., Mikage M., Komatsu K.: Molecular analysis and chemical evaluation of *Ephedra* plants in Mongolia. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1235-1243 (2009)
- 2) Kitani Y., Zhu S., Batkhoo J., Sanchir C., Komatsu K.: Genetic diversity of *Ephedra* plants in Mongolia inferred from nrDNA ITS sequence. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 717-726 (2011).

F. 研究発表

1. 発表論文 (総説)

- 1) Zhu S., Kitani Y., Komatsu K. Exploration of *Ephedra* resource in Mongolia: From field investigation to molecular identification and chemical evaluation. *J. Trad. Med.*, **29**: 35-40 (2012).

2. 学会発表

- 1) 朱 姝, 木谷友紀, 小松かつ子: 漢薬「麻黄」

の資源探索: モンゴル国産 *Ephedra* 属植物の遺伝子多型とアルカロイド成分に関する研究. 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011, 8/27-28, 富山.

- 2) 木谷友紀, 朱 姝, 田中 謙, 小松かつ子, 辰尾良秋, Batkhoo J.: 生薬「マオウ」の簡易同定法の開発とモンゴル国栽培品 *E. sinica* の品質評価及び栽培条件の検討. 日本生薬学会第 58 回年会, 2011, 9/24-25, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Samples of Ephedrae Herba collected from Japanese and Chinese markets

	TMPW No.	産地	入手先	入手年月日
日本市場品	26942	内蒙古自治区	株式会社栃本天海堂	2010.10.30
	26943	甘肅省	株式会社栃本天海堂	2010.10.30
	26944	内蒙古自治区	株式会社ウチダ和漢薬	2010.10.31
	26945	内蒙古自治区	松浦薬業株式会社	2010.10.31
	26988	内蒙古自治区	日本粉末薬業株式会社	2010.11.5
	26989	内蒙古自治区	日本粉末薬業株式会社	2010.11.5
	26990	内蒙古自治区	日本粉末薬業株式会社	2010.11.5
中国市場品	25563	甘肅省	甘肅省蘭州市黄河薬材市場	2007.7.23
	25566	甘肅省	甘肅省蘭州市蘭州安泰堂中薬飲片有限公司	2007.7.23
	25567	甘肅省	甘肅省臨夏市恒偉中薬飲片有限公司	2007.7.23
	25976	内蒙古自治区	広西壮族自治区岑溪老威薬業有限公司	2008.9.6

Table 2 The botanical source of Ephedrae Herba in Japanese and Chinese markets identified by PCR-RFLP and sequencing analysis.

	TMPW No.	産地	同定結果
日本市場品	26942	内蒙古自治区	<i>Ephedra sinica</i>
	26943	甘肅省	<i>E. intermedia</i>
	26944	内蒙古自治区	<i>E. sinica</i>
	26945	内蒙古自治区	<i>E. sinica</i>
	26988	内蒙古自治区	<i>E. sinica</i>
	26989	内蒙古自治区	<i>E. sinica</i>
	26990	内蒙古自治区	<i>E. sinica</i>
中国市場品	25563	甘肅省	<i>E. intermedia</i>
	25566	甘肅省	<i>E. intermedia</i>
	25567	甘肅省	<i>E. intermedia</i>
	25976	内蒙古自治区	<i>E. sinica</i>

Fig. 1 PCR-RFLP analysis by using the restriction enzyme *Bsa*XI on partial *trnK* intron sequence

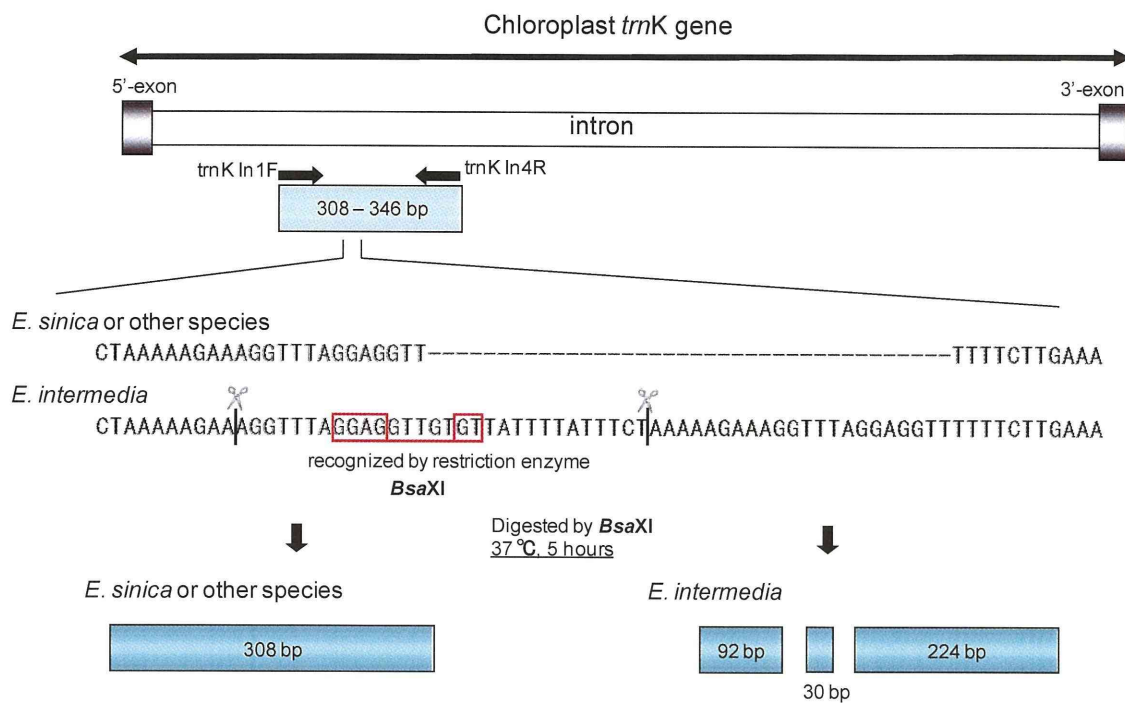
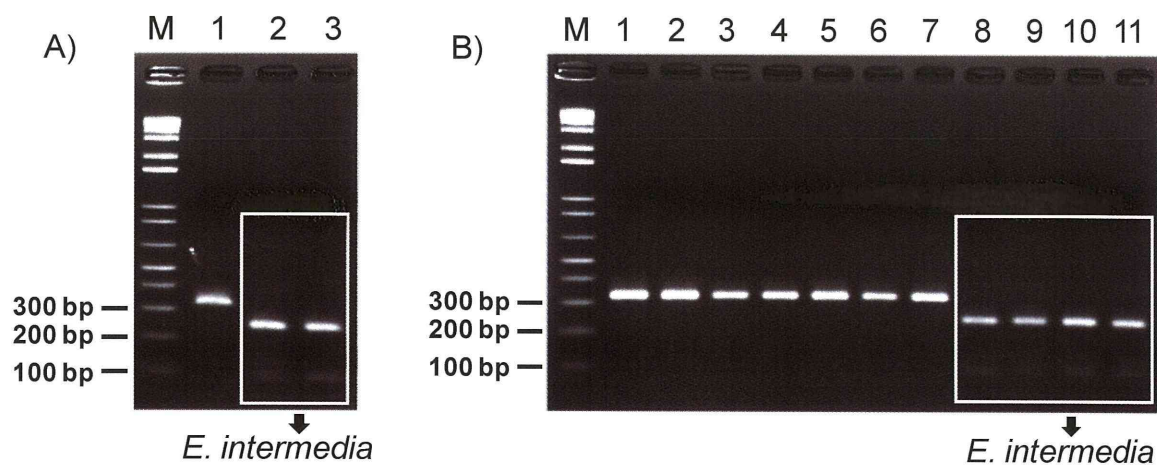


Fig. 2 PCR-RFLP analysis using the restriction enzyme *Bsa*XI for identification of Ephedrae Herba



- A) Lane M, 1kb plus DNA ladder; Lane 1, Sample No. M1455; Lane 2, Sample No. KANP 02369; Lane 3, Sample No. KANP 02309.
- B) Lane M, 1kb plus DNA ladder; Lane 1, Sample No. 26942; Lane 2, Sample No. 26944; Lane 3, Sample No. 26945; Lane 4, Sample No. 26988; Lane 5, Sample No. 26989; Lane 6, Sample No. 26990; Lane 7, Sample No. 25976; Lane 8, Sample No. 26943; Lane 9, Sample No. 25563; Lane, 10 Sample No. 25566; Lane, 11, Sample No. 25567.

動物生薬成分の化学解析

分担研究者 紺野勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所

研究要旨

ミズを基源とする動物生薬「地竜」の熱水抽出物について、LC-MS によるペプチド成分分析と、確認試験・品質規格設定を目指した TLC による分析を行った。ペプチド成分としては、21 種のアミノ酸配列を決定した。TLC 分析では、セルロースまたはアルミナを用い、ニンヒドリンで発色することにより、良好な分離が得られることがわかった。

A. 研究目的

「富山のくすり」としてよく知られている熊胆圓と六神丸は、それぞれ動物生薬である「熊胆」（クマの胆嚢）と「蟾酥」（ヒキガエルの毒腺抽出物）が主要な薬効生薬である。しかし、薬効成分が明確で、品質規格の定まった動物生薬は、これら以外にはほとんどない。本研究では、「地竜」をはじめとした動物生薬成分の化学解析を行い、その結果を基礎とした薬効成分の解明、品質規格の設定を目的とする。

B. 研究方法・結果

B-1. ペプチド成分分析

ミズを基源とする動物生薬「地竜」は、もともと『神農本草経』に記載され、民間薬としてのミズも、特に子供の風邪の熱冷ましとして、昔からよく使われてきた。「地竜」の薬効としては、解熱作用が最も定評があり、各種解熱鎮痛薬や感冒薬にも配合されている。しかし、その薬効成分は未だ不明で、品質規格も定まっていない。

地竜の解熱作用成分について、緒方・森は、もともと含まれているものではなく、熱水抽出の過程である種のタンパク質から生成してくる低分子水溶性物質と推定している（薬学雑誌、58(10), 859-870, 1938; 59(7), 483-494, 1939）。そこで昨年度、地竜の熱水抽出物について、LC-MS を用いてペプチド成分分析を行ったところ、10 種のペプチド配列を決定することができた。そのうち半数の 5 種はアクチンから分解・生成したのと考えられ、緒方らの報告と考え合わせると、興味深い。

Figure 1. 地竜エキスの HPLC クロマトグラム

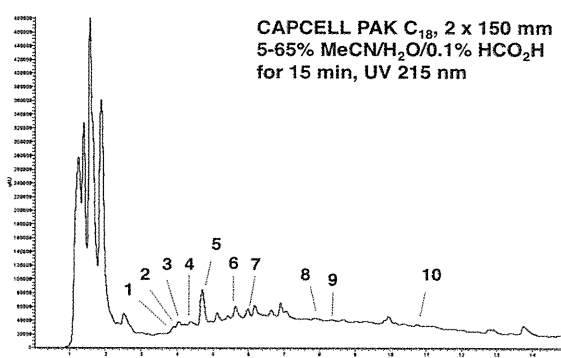


Table 1. 地竜エキス中のペプチド配列

No.	MH ⁺ _{obs}	MH ⁺ _{calc}	sequence
1	1093.572	1093.574	ESESTSVVKK
2	1118.578	1118.580	EGDSQTVVKKR
3	1033.540	1033.543	<u>RV</u> APEEHPV
4	869.473	869.473	<u>TE</u> APLNPK
5	672.336	672.335	YPLEH
6	1388.644	1388.644	EYDESGPSLVHR
7	1146.624	1146.627	<u>RV</u> APEEHPVL
8	1456.658	1456.656	<u>MS</u> GGTTFMFPGLADR
9	1103.611	1103.610	<u>PEE</u> HPVLGLL
10	732.431	732.429	VAFPSLV

Figure 2. ペプチド 1 の MS/MS スペクトル解析

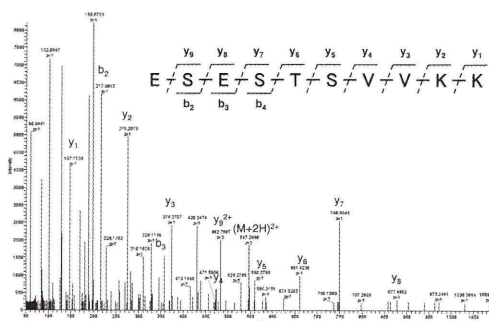


Figure 3. アカミズ *Lumbricus rubellus* アクチンのアミノ酸配列 (EBI Y09623)と地竜エキス中のペプチド配列(下線部)

EVTALVDNG SGMCKAGFAG DDAPRAVFPS IVGRPRHQGV
 MVMGMQKDSY VGDEAQSQRG ILTLKYPIEH GIVTNWDDME
 KIWHHTFYNE LRVAPEEHPV LLTEAPLNPK ANREKMTQIM
 FETFNSPAMY VAIQAVLSLY ASGRITGIVL DSGDGVTHTV
 PIYEGYALPH AILRLDLAGR DLTDYLMKIL TERGYSFTTT
 AEREIVRDIK EKLGYVALDF DQEMGTAASS SSLEKSYELP
 DGQVITIGNE RFRCPESMFQ PAFLGMESAG IHETTFNSIM
 KGDVDIRKDL YANTVMSGGT TMFPGIADRM QKEITSMAPS
 GMKIKIAPP ERKYSVWIGG SILASLSTFQ QMWISKQEYD
ESGPSIVHRK CF

Figure 4. 地竜エキスの HPLC クロマトグラム

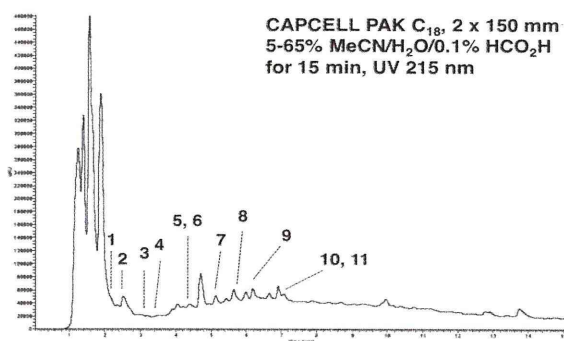


Table 2. 地竜エキス中のペプチド配列

No.	MH ⁺ _{obs}	MH ⁺ _{calc}	sequence
1	531.323	531.325	LSGVR
2	561.286	561.299	DSALR
3	592.312	592.312	NSLMK
4	564.252	564.251	EVSTE
5	877.442	877.441	<u>PEEHPVLG</u>
6	617.324	617.325	DVDLR
7	819.418	819.421	SEETVVR

8	594.325	594.325	<u>EHPVL</u>
9	1104.572	1194.572	PSNTMDALKK
10	520.277	520.277	VAFPS
11	745.410	745.409	<u>VLTLGNE</u>

今年度、さらに同様のペプチド成分解析を進め、新たに 11 種のペプチド配列を決定した。HPLC クロマトグラムを Figure 1 に、解析結果を Table 1 にまとめた。アクチンの分解産物と考えられるのは 3 種のみで、8 種は FASTA による相同性検索でも、既存のタンパク質との明確な一致は見られず、新規ペプチドあるいは、未知タンパク質の一部と考えられる。しかも、そのうち 6 種はアミノ酸残基数 5 個と、非常に小さなペプチドであることが特徴である。

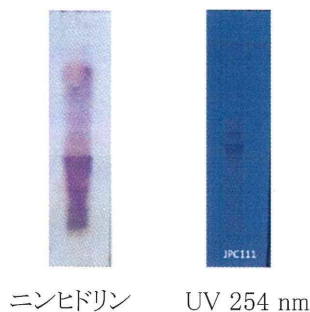
B-2. TLC 分析

地竜および地竜配合製剤は、数社から販売され流通している。しかしながら、確認試験法や品質規格が定まっていないため、日本薬局方には収載されていない。そこで、地竜の薬局方収載を目指して、TLC による確認試験法を検討した。

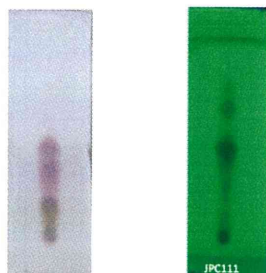
地竜熱水抽出物をシリカゲル、HILIC A、HILIC P、セルロース、中性アルミナ、塩基性アルミナの薄相プレートにそれぞれ適量スポットし、種々の展開溶媒で約 5 cm 展開した。展開・乾燥後、UV 254 nm で検出し、さらにニンヒドリンで呈色した。シリカゲル・HILIC を用いた場合は、いずれも良い分離が得られなかった。セルロース・アルミナを用い、*n*-BuOH/AcOH/H₂O (4/1/5) で展開した TLC は分離がよく、特にニンヒドリンによる呈色では、数個の明瞭な分離スポットが検出された。Figure 3 に結果を示す。

Figure 5 地竜熱水抽出物の TLC 分析

A. セルロース *n*-BuOH/AcOH/H₂O (4/1/5)

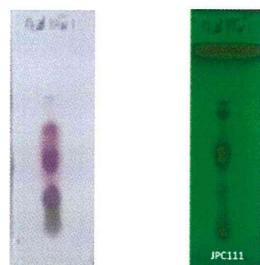


B. 中性アルミナ n -BuOH/AcOH/H₂O (4/1/5)



ニンヒドリン UV 254 nm

C. 塩基性アルミナ n -BuOH/AcOH/H₂O (4/1/5)



ニンヒドリン UV 254 nm

C. 考察

昨年度、地竜熱水抽出物の LC-MS 分析を行ない、10 種のペプチドを同定し報告した。今年度も同様の分析を進め、さらに 11 種のペプチドを見出した。これら合わせて 21 種のうち 8 種はアクチンの分解生成物と考えられ、緒方・森の報告を考え合わせると興味深い。すなわち、彼らは、地竜の解熱作用成分は、もともと含まれているものではなく、熱水抽出の過程である種のタンパク質から生成してくると推定している。今後、これらペプチドの解熱作用を調べる必要がある。

TLC 分析では、セルロースまたはアルミナを用い、 n -BuOH/AcOH/H₂O (4/1/5) で展開した場合に、良好な分離が得られた。これらは、アミノ酸・ペプチドの分析に繁用される条件であり、ペプチド成分が多量含まれていることを反映しているものと考えられる。

D. 結論

地竜熱水抽出物の LC-MS 分析により、ペプチド成分が多数含まれていることが明らかになった。そのうち数種は、アクチンから分解・生成したものと考えられた。TLC 分析では、アミノ酸・ペプチドの分析に繁用される条件が、良好な分離を与えることがわかった。

E. 研究発表

1. 紺野勝弘, 宮永 賢, 数馬恒平, 佐竹元吉: 地竜のペプチド成分: 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011, 8, 富山.
2. 紺野勝弘, 数馬恒平, 宮永 賢, 佐竹元吉: 地竜エキス中のペプチド成分分析: 日本生薬学会第 58 回年会, 2011, 10, 東

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）
漢方処方配合生薬の安定供給及び持続的品質保持における国際標準化に関する研究
分担研究報告書

分担研究課題 LC/MS によるラン科植物 5 属における含有分子種の検出
- dendrobine および nobilonine の探索 -

研究分担者 徳島文理大学香川薬学部 准教授 代田 修

薬用植物資源の乱獲などによる枯渇への対策として、生薬基原植物の栽培を行うにあたり最適種を選択するためには、基原植物および生薬の同定が確実にできることが重要である。形態からの同定の難しい植物については遺伝子による同定は一定の成果があるが、修治過程を経た生薬セッコクになると、遺伝子の保存状態が悪く種の同定が難しいため万能とはいえず、形態による同定が必要になるため熟練者の存在が必須である。そこで成分による生薬セッコク基原植物の同定の可能性を検討するにあたり、基原植物である *Dendrobium* 属植物（セッコク）以外の 5 つの属のラン科植物野生株を試料とし、指標として nobilonine および dendrobine を用い、LC-MS を用いてその含有の有無を分析した。その結果、いずれの属にもこれらの成分は検出されなかった。

研究協力者

朝比奈はるか お茶の水女子大学人間文化
創成科学研究科研究院研究員

A. 研究目的

セッコクは中国文化圏を中心に 1000 年以上にわたり使われてきた生薬であり、日本薬局方では、新 210 処方（2008）に漢方生薬セッコクを含む処方である甘露飲が記載された。セッコクの基原植物の *Dendrobium* 属植物は成長が遅いこと、大量栽培には設備や技術が必要なことから、薬用には現在まで野生資源が利用されてきた。そのため、最大の利用国であり、自生地を広く保有していた中国においても、今や資源が枯渇し、近隣諸国のベトナム、ラオス、カンボジア、ミャンマー、タイからの大量密輸が絶えず、これらの国でも近い将来枯渇するおそれがある。資源枯渇対策として生薬基原植物の栽培を行うにあたり、最適種を選択するためには、基原植物および生薬の同定が確実にできることが重要である。

伝統的に中国で流通しているセッコクの基原植物種は中国薬典にある数種（2010 年版における、*D. fimbriatum*、*D. nobile*、*D. officinale*、*D. chrisotoxum*）を含めて 50 数種あり（Bao, Shun et al. 2001）、栽培化するにあたっては植物種の選出のために、類縁種の同定や分類を正しく行う事がまず重要である。しかし、伝統的な検鏡などの形態による同定には、熟練者が

必要である。また形態からの同定の難しい植物について、遺伝子による同定は一定の成果があるが、修治過程を経たセッコク生薬の形になると、遺伝子の保存状態が悪く、遺伝子は万能とはいえない。同定に決め手がないため、販売表示種に対して偽物も多く、流通現場ではより信頼性をもたせるため、他の情報が期待されている。

中国では伝統的に人気の高いセッコク生薬の基原植物である、中国名鉄皮石斛（*D. officinale*）を中心にセッコクをとりあげ精力的に栽培推進を行い、また成分と薬効の解明に取り組んできたが、dendrobine とその類縁物質、およびいくつかの成分を除き、成分には未知な点が多く、さらに薬効については植物に普遍的に存在する bioflavonoid の抗酸化物質としての効果などを除き、いまだ不明な点が多い。*Dendrobium* 属以外にも中国文化圏でセッコクとして売られているラン科の別属の植物もあり、成分と属の関係も必ずしも解明されていない。一方、*Dendrobium* 属に広く分布すると考えられてきた dendrobine が、必ずしも当属植物において広域にみいだされるわけではないことがわかってきた（日本薬学会第 57 回年会発表）。このような背景を踏まえ、系統的に *Dendrobium* 属から離れた他の属のランでは dendrobine や類似物質はどう分布しているのか、それらの有無が種の同定に利用でき得るデータなのかについて検討する目的で、

dendrobine と nobilonine が *Dendrobium* 属以外のラン科植物 5 属においてどのように分布しているか明らかにすることにした。

B. 研究方法

1. 材料

Dendrobium 属から系統学的に離れた 5 属の植物を選び、LC-MS による分子種の解析を行い、*D. nobile* など *Dendrobium* 属植物に比較的良く含まれている dendrobine と nobilonine が見出されるか調べた。

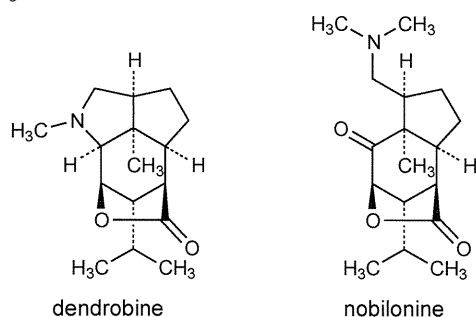
試料には、以下の 5 種を用いた。

- (1) *Laelia lobata* (中南米原産)
- (2) *Dendrochilum filiforme* (東南アジア原産)
- (3) *Maxilaria* sp. (中南米原産)
- (4) *Bulbophyllum carunculatum* (パプアニューギニアを起源とし世界の熱帯、亜熱帯に分布)
- (5) *Epidendrum prismatocarpum* (中南米原産)

上記サンプルについて、沖縄海洋博記念公園植物研究部唐澤耕司博士に同定を依頼した。

(3) の *Maxilaria* sp. については、種名までは開花後でなければ分からないとのことで報告書提出時点では不明である。

以上の 5 属植物につき、植物全体を 5 mm 幅に刻み風乾後、YASUI KIKAI Multi-Beads Shocker にて 2500 rpm, 10 sec にて粉末を作製した。



Chemical Formula: $C_{16}H_{25}NO_2$
Molecular Weight: 263.38

Chemical Formula: $C_{17}H_{27}NO_3$
Molecular Weight: 293.40

2. 分析サンプル調製

サンプル：乾燥粉末サンプル 400 mg

抽出：80% MeOH、8 mL；超音波処理 15 min x 2、40°C にて減圧乾固後、5 倍濃縮 MeOH 溶液とした。

3. 定性分析条件

LC 部分: Acquity UPLC system (Waters Co. Ltd.)

質量分析計: Q-ToF micro (Micromass Co. Ltd.)
測定・解析ソフト: MassLynx 4.0 (Micromass Co. Ltd.)

カラム: Acquity UPLC BEH C18; 1.7 μ m; 2.1 x 100 mm (Waters)

注入量: 10 μ L/injection;

移動相: 0.1% TFA/ACN (90:10 - 60:40, v/v)

流速: 0.35 mL/min

C. 研究結果

図 1 に測定したサンプルのトータルイオンクロマトグラムを示す。また、図 2 に 5~8 min の領域を積算したマススペクトルを示す。今回分析した 5 種のサンプルでは、いずれにも dendrobine (5.6 min; m/z 264) および nobilonine (6.5 min; m/z 294) は検出されなかった。

D. 考察

今回成分を検討した 5 属 (5 種) の植物のなかから、DNA データベース (DNA Data Bank of Japan) に登録済みである三属と同じ属の *matK* 遺伝子、すなわち、*Laelia* (*gouldiana*)、*Dendrochilum* (*scriptum*)、*Epidendrum* (*rigidum*) について、dendrobine あるいは/それに加え nobilonine を含有する *Dendrobium* 属植物と合わせて Neighbor-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987) を用いて MEGA 4 で系統樹を構築したところ、これら三属は明らかに *Dendrobium* 属グループとは離れたところに位置することが確認された (図 3 accession No. をそれぞれに示した)。

今回の LC/MS 分析結果と、図 3 だけからは、成分と遺伝的距離に関係があるとはいえないが、少なくとも *Dendrobium* 属との遺伝的距離が認められる図 3 の 3 属の中には、dendrobine と nobilonine は検出されなかったと言えよう。しかしながらセッコクの基原植物 *Dendrobium* 属植物が必ずしも dendrobine や nobilonine をどちらか、あるいは両方持っているわけではないため (日本薬学会第 57 回年会発表)、これらの物質あるいは dendrobine 派生/類縁物質が *Dendrobium* 属の特性とは言えない。これらの物質は、属より狭い範囲の特長を示す成分かもしれないが、種を規定できるほどの物質ではないが、*Dendrobium* 属の中のいくつかのグループのうち、なにかを特長づけるものである可能性がある。したがって、成分単独で種の同定は難しいが、種の同定の補助手段として有

効である可能性は高いことが示された。

Dendrobium 属も、他の属も、LC/MS の結果は他にもアルカロイド、非アルカロイド物質が存在していることを示している。そのため、これらの成分をさらに分離・精製して同定し、さらに多くの指標に加えることが、遺伝的距離と成分の関係、すなわち種の同定における成分の役割を解明する上で不可欠であると考えられた。

E. 参考文献

1) Bao, X., Shun, Q. and Chen, L., Eds. (2001). The Medicinal Plants of *Dendrobium* (Shi-hu) in China. Shang Hai, Shanghai

Medical University Press, Fudanpress.

2) 朝比奈 はるか、森光 康次郎、佐竹 元吉、代田 修、関田 節子 (2010) 漢方生薬セッコクの基源植物に関する科学研究(2) ケモタキソノミー的手法による類縁関係解明の検討、日本薬学会第130年会、岡山。

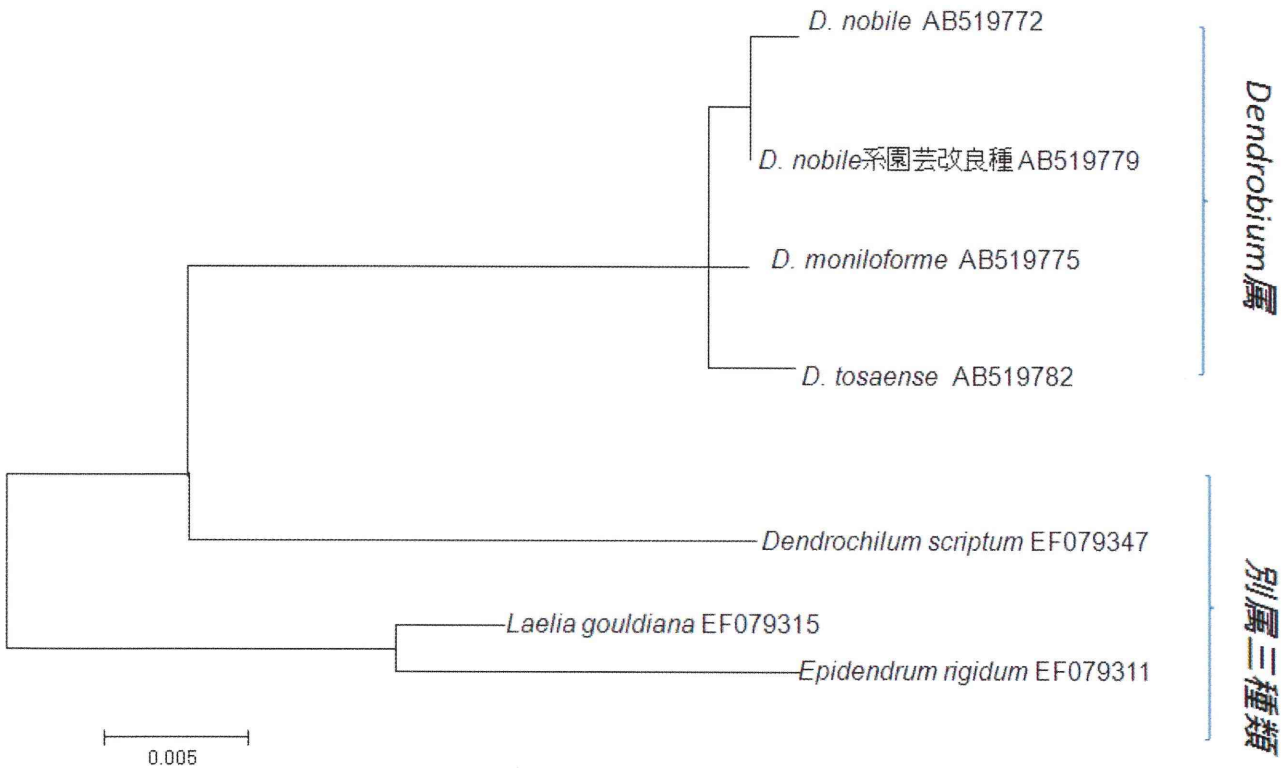
F. 研究発表

論文発表等

なし

学会発表

なし



The indicated scale represents 0.005 nucleotide substitution per site.

図3 *Dendrobium* 属(*D. nobile*, *D. moniliforme*, *D. tosaense*)と *Dendrochilum* 属、*Laelia* 属、*Epidendrum* 属の matK による遺伝的位置関係

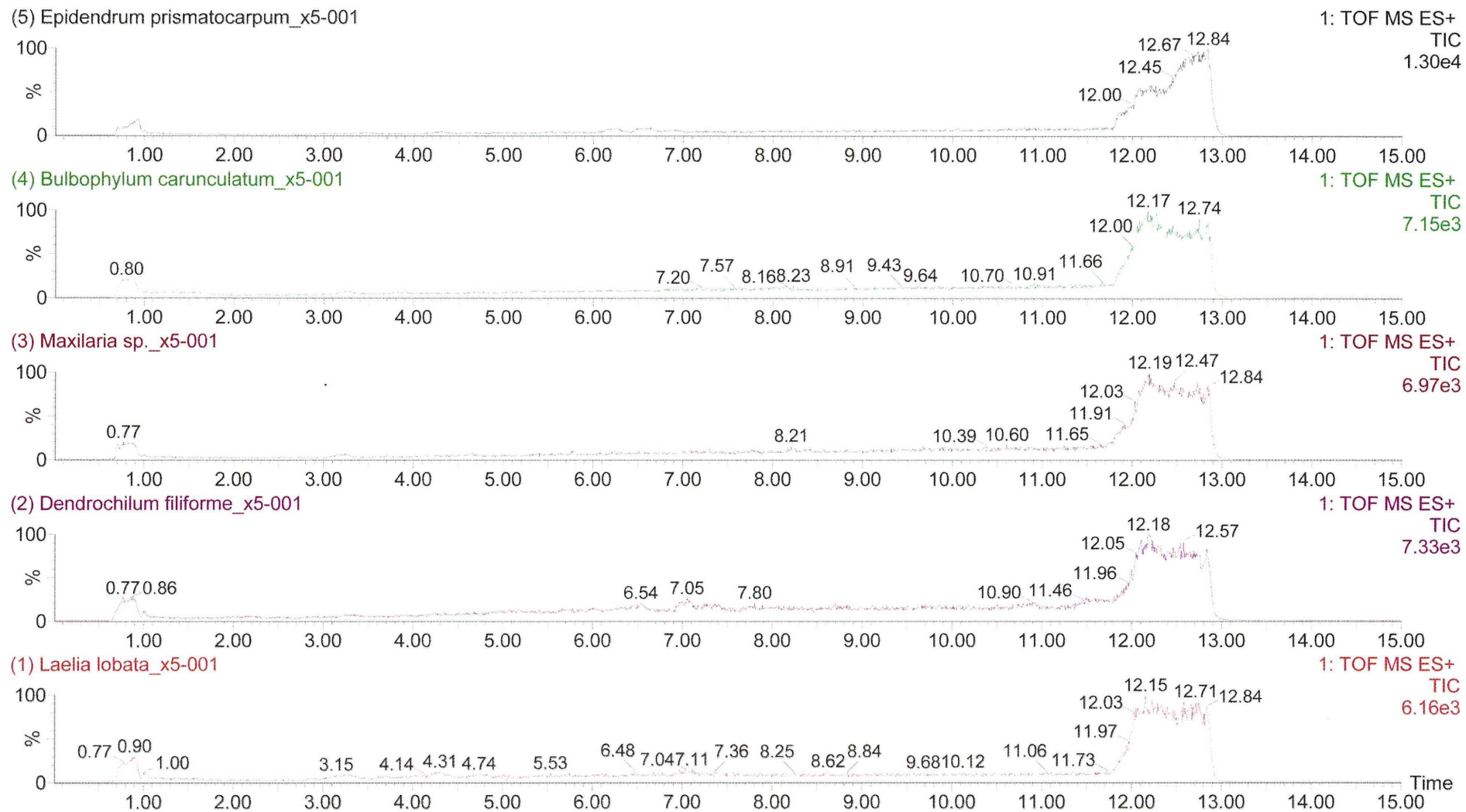


図1 5種サンプルのトータルイオンクロマトグラム (TIC)

(1) *Laelia lobata* (中南米原産) (2) *Dendrochilum filiforme* (東南アジア原産) (3) *Maxilaria* sp. (中南米原産) (4) *Bulbophyllum carunculatum* (パプアニューギニアを起源とし世界の熱帯、亜熱帯に分布) (5) *Epidendrum prismatocarpum* (中南米原産)

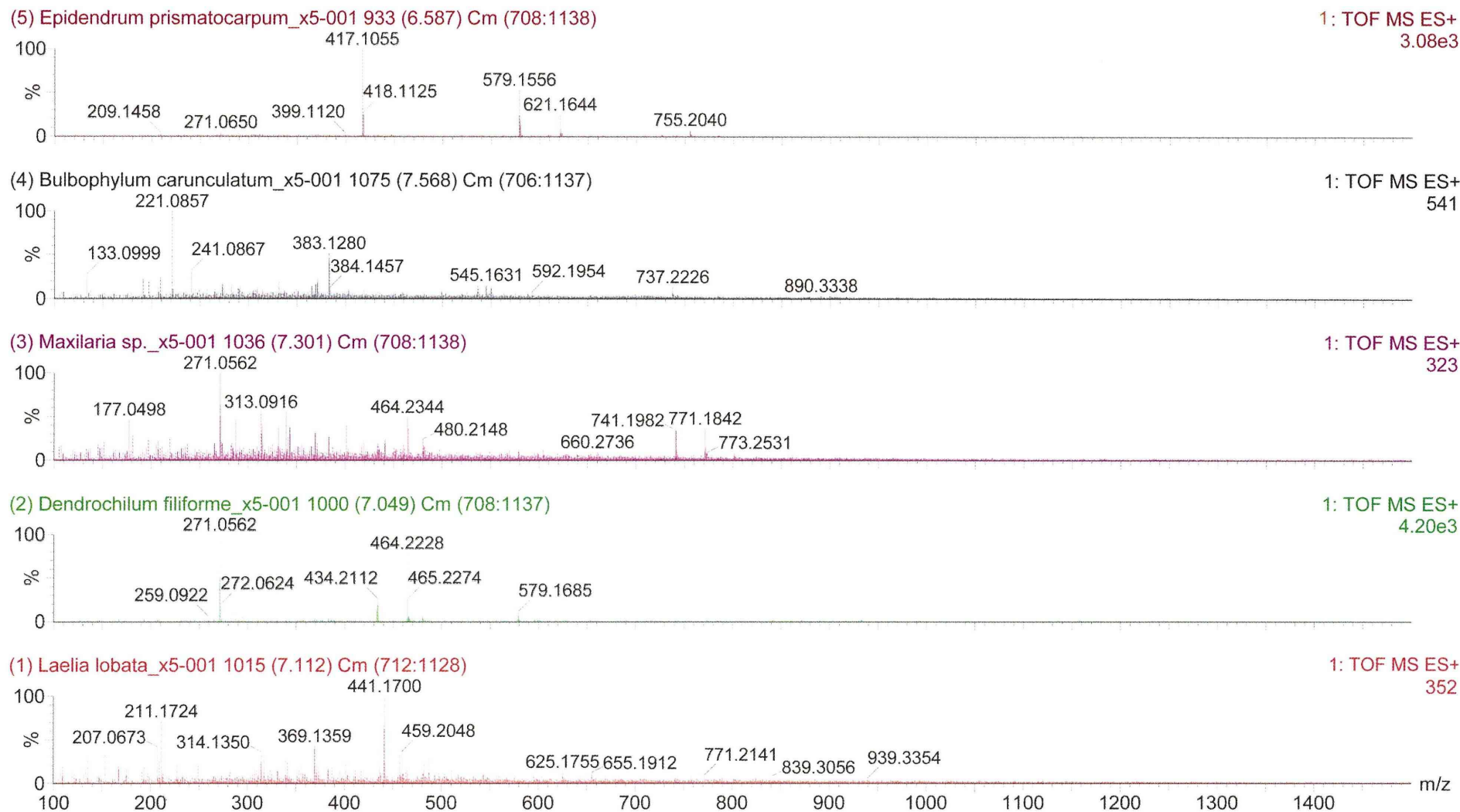


図2 5~8 min 領域の積算したマススペクトル

(1) *Laelia lobata* (中南米原産) (2) *Dendrochilum filiforme* (東南アジア原産) (3) *Maxilaria* sp. (中南米原産) (4) *Bulbophyllum carunculatum* (パプアニューギニアを起源とし世界の熱帯、亜熱帯に分布) (5) *Epidendrum prismatocarpum* (中南米原産)

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）
分担研究年度終了報告書

ミャンマー産オウレンの成分分析

分担研究者 徳島文理大学香川薬学部 代田 修

研究要旨 ミャンマーにて購入・入手した4種のビルマオウレン (*Coptis teeta* Wall.) と国内に流通している局方オウレンについて成分分析を行い、ベルベリン、パルマチン、コプチシン以外で主に局方オウレンで2つの未同定化合物が確認された。これらは単離、構造決定することによりエピベルベリンおよびジャトロリジンと同定された。

A. 研究目的

一昨年に名古屋で行われたCOP10において資源保存の重要性が認識されたように、現在、生物多様性が地球的に重要なテーマとなっている。薬用資源については、中国、東南アジア、南米等の生薬供給国における工業化、人口増加、観光地開発などによる野生薬用植物生育地の破壊が進行し、一方で薬用植物栽培者及び採取者の減少が著しい。しかしながら、世界的には生薬需要は高まっており、生薬の安定供給及び持続的品質保持が憂慮されている。このような背景のもと、薬用資源の保存・持続的保持のために栽培復興が必要となっており、そのための原種探索が急務となっている。

昨年度、漢方処方のみならずベルベリン製剤としても重要な生薬である「黄連」に着目し、ミャンマーのビルマオウレン (*Coptis teeta* Wall.) を現地にて採取し、また現地で購入・入手したビルマオウレンと日本において流通している局方オウレンとの定性的、定量的比較を検討した。その結果、「ビルマオウレン」とされる4種ともベルベリンの含量は概ね5%以上であり、これは局方で示されている4.2%以上という基準を満たしていた。しかし、そのHPLCクロマトグラムでは、局方品及びビルマオウレン栽培品においてベルベリン、コプチシン、パルマチンの他に二つのピークが現れた。一方、残る3種のビルマオウレンではその片方のピークのみが現れた。そこで今回、未同定であるこれらの成分の単離同定を行った。

B. 研究方法

1. 分析試料

分析試料には、以下の5種を用いた。

- (1) ビルマオウレン野生品
- (2) ビルマオウレン栽培品

- (3) 現地商品1 (Putaoの市場にて購入)
 - (4) 現地商品2 (Putaoの空港にて購入)
 - (5) 日本薬局方オウレン (紀伊国屋から購入)
- サンプル(1)及び(2)については、現地でビルマオウレンとされているものである。また、サンプル(3)及び(4)については、購入品であるが、ビルマオウレン (*Coptis teeta* Wall.) と思われる。

これら5種のサンプルは、それぞれ粉砕器により粉末状とした。

2. 分析サンプルの調製

各粉末サンプル500mgを精密に量り、メタノール/希塩酸混液(100:1)30mLを加え、環流冷却器を付けて水浴上で30分間加熱し、冷後、綿栓ろ過した。残留物は、メタノール/希塩酸混液(100:1)30mL及び20mLを用いて、更にこの操作を2回行った。最後の残留物にメタノール10mLを加え、良く振り混ぜた後、綿栓ろ過した。全ろ液をメスフラスコに集め、メタノールを加えて正確に100mLとし、ろ液を試験溶液とした。

3. LC/MS分析条件

以下の条件にて分析した。

LC装置: ACQUITY UPLC (Waters)

検出器: ACQUITY PDA; 200-400 nm

カラム: ACQUITY BEH Shield RP-18; 1.7 μ m; 2.1 \times 100 mm (Waters)

注入量: 1 μ L/injection

移動相: 0.1% ギ酸/メタノール (A/B)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
Initial	0.350	80.0	20.0
1.00	0.350	80.0	20.0
11.00	0.350	60.0	40.0
11.10	0.350	0.0	100.0

12.00 0.350 0.0 100.0
 12.10 0.350 80.0 20.0
 15.00 0.350 80.0 20.0

MS 装置: Q-ToF micro (MICROMASS/Waters);
 Capillary voltage: 2800 V; Sample
 Cone voltage: 35 V; Desolvation
 Temp.: 240°C; Source Temp.: 120°C
 測定・解析ソフト: MassLynx 4.0 (Waters)

検出波長: 254 nm

カラム: XSELECT CSH Prep C18 ODB; 5 μm;
 19 x 100 mm (Waters)

移動相: 0.1% ギ酸/メタノール (A/B)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
Initial	5.0	90.0	10.0
1.0	5.0	90.0	10.0
3.0	12.0	90.0	10.0
20.0	12.0	50.0	50.0
20.1	10.0	0.0	100.0
23.0	10.0	0.0	100.0
23.10	5.0	90.0	10.0
30.00	5.0	90.0	10.0

4. 未同定化合物の単離

局方オウレン末 (紀伊國屋) 310 g をメタノールにて3回温浸抽出し、得られたメタノール抽出物を水に懸濁しジエチルエーテルにて3回分配した。次に水層を HP20 カラム (8 cm x 60 cm) に付し、水溶出画分 20 g を得た。これをシリカゲルカラム (5 cm x 50 cm) に付し、酢酸エチル/メタノール/酢酸 (2:8:0.1、1.5:8.5:0.1、1:9:0.1) にて溶出することで、Fr. A (9.75 g)、B (6.95 g)、C (2.72 g)、D (0.57 g)、E (0.54 g) に分画した。HPLC 分析の結果、Fr. A 及び D に未同定化合物が多く存在することが判明した。そこで Fr. A (xxx mg) 及び D (560 mg) を以下の分取 HPLC 条件により分離することで化合物 1 (32.3 mg; 0.001%) 及び 2 (148.3 mg; 0.048%) をそれぞれ単離した。

LC 装置: GULLIVER (日本分光)

5. 未同定化合物の構造解析

NMR 測定には以下の装置を用いた。

AVANCE 700 (Bruker BioSpin)

Unity INOVA 500 (Varian)

また、NMR のデータ処理ソフトには MNova (Mestrelab Research) を用いた。

C. 研究結果

1. LC/PDA 及び LC/MS 分析

分析試料 (1) ~ (5) の LC/PDA 分析のクロマトグラムを図 1 に示す。標品との比較により、コプチシンが 4.3 min、ベルベリンが 5.9 min、

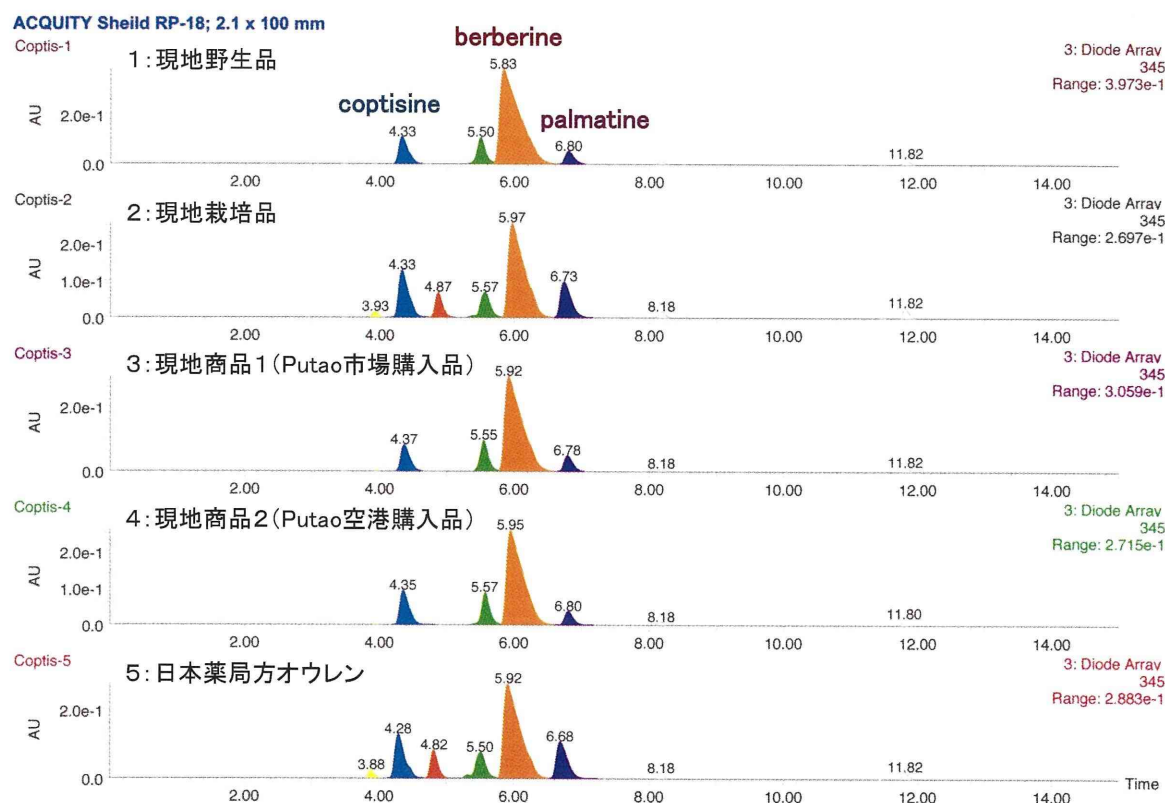


図 1. 各種オウレンサンプルの LC/PDA 分析