

平成24年度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

研究分担課題 成分分析データ情報及びさく葉標本に関する研究

研究分担者 渕野 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)
蓮沼 タミ (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

18品目の国内市場品（サンシシ、マオウ、ケイヒ、シャゼンシ、センキュウ、ビャクジュツ、ブクリョウ、オウギ、チンピ、ボタンピ、カクコン、サイコ、ゴシツ、トウニン、ジオウ、ボウイ、サイシン、トウニン）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、トウニンの熱水抽出エキスに NO 産生抑制活性のロット差が大きいことが認められた。トウニン及び昨年度、活性のロット差が大きかったオウゴン、ニンジンについても多変量解析を行ない、NO 産生抑制活性のロット差に大きく寄与している成分について探索した。

A. 研究目的

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ている。H23 年度に引き続いて、生薬国内市場品の熱水抽出エキスの NO 産生抑制活性並びに活性のロット差等について評価を行なった。また、ロット差の大きな生薬エキスについて、ロット差の要因となっている成分を多変量解析によって探索した。

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℃、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 (2.4×10^5 cells/200 μ L/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 μ g/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^G-monomethyl-L-arginine acetate (100 μ M, Dojindo製) を用いた。試験は3回行ない、結果はMean \pm S.E.で示した。

NO 産生抑制率：

培養後の上清 100 μ L を回収し、1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ 試薬、0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 試薬を各 50 μ L 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 μ L 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

18 品目の国内市場品 (サンシシ、マオウ、ケイヒ、シャゼンシ、センキュウ、ビャクジュツ、ブクリョウ、オウギ、チンピ、ボタンピ、カッコン、サイコ、ゴシツ、トウニン、ジオウ、ボウイ、サイシン、トウニン) 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 1~44)。その結果、ケイヒが最も強い活性 (平均 NO 産生抑制率：50.3%) を示し、ブクリョウ (平均 NO 産生抑制率：31.3%)、カッコン (平均 NO 産生抑制率：25.7%)、マオウ (平均 NO 産生抑制率：20.5%) にも強い活性が認められた。一方、シャゼンシ (平均 NO 産生抑制率：6.0%)、ビャクジュツ (平均 NO 産生抑制率：6.7%) は活性が弱く、ジオウはほとんど活性 (平均 NO 産生抑制率：-1.4%) を示さなかった。その他の生薬エキスは 10%~20% 程度の活性が認められた。また、NO 産生抑制活性のロット差が大きい生薬としてマオウ、ケイヒ、センキュウ、オウギ、チンピ、ボタンピ、カッコン、サイコ、ゴシツ、ボウイ、トウニンが見出された。今回、トウニン及び平成 23 年度に NO 産生抑制活性のロット差が大きかったオウゴン、ニンジンについて多変量解析を行ない、ロット差の要因になっている

成分について探索した。

最初に、オウゴンについて SIMCA による主成分分析 (PCA) を行なった。その結果を図 45 に示した。PCA では、最もロット数の多い河北省産オウゴンはグループ化せず、バラつきが大きいことが分かった。続いて、オウゴンの各ロットを NO 産生抑制活性の強いグループと弱いグループの 2 群に分け、判別分析 (OPLS-DA) を試みた。t[1]軸を中心として活性の強いグループと弱いグループに分別され (図 45A)、S プロットからは、オウゴノシド ($m/z:461$, RT:23.7 min.)、オウゴニン ($m/z:285$, RT:28.0 min) と推定される成分が見出された (図 45B)。さらに、t[1]軸に近いロットを除外して、再度、OPLS-DA に付したところ、上記 2 成分がさらに明確に見出された。本成分が NO 産生抑制活性の発現に大きく寄与しているものと推定された (図 45C, D)。

次に、ニンジンの PCA を行なった。図 47 より、一部グループ化しているものの、最もロット数の多い吉林省産においてバラつきが大きいロットが存在することがわかった。つづいて、各ロットを湯通しと生干しグループの 2 群に分けて OPLS-DA を行なった。ロットには紅参 (NIB-113) が含まれていたが、湯通しのグループに加えた。図 48 に示すように、生干しと湯通しグループは明確に判別された。S プロットからは、2 成分 ($m/z:307$, RT:2.9 min と $m/z:324$, RT:3.1 min) が見出され (図 49)、2 群の判別に寄与しているものと推定された。また、ニンジンは平均 NO 産生抑制活性が弱いものの、湯通しと生干しの間で、明確な活性の差が認められた。そのため、活性に基づいた OPLS を行なったところ、t[1]軸を中心に分けられた (図 50)。S プロットからは、2 成分 ($m/z:307$, RT:2.9 min と $m/z:324$, RT:3.1 min) が見出され (図 51)、湯通ししたロットに多く含まれる成分が、NO 産生抑制活性にも関与していることが考えられた。

これら成分について同定するため、湯通しされたロット (NIB-12, 61, 112, 113) から、マーカー成分の単離を試みた。図 52 に示すように化合物 1 (MW: 306) が単離・同定された。本化合物は紅参からの単離報告があり、湯通しして熱を加えられることで生成され、さらに、NO 産生抑制活性にも関与しているものと考えられた。

最後にトウニンであるが、PCA の結果、産地別にグループすることはなかった。次に、NO 産生抑制活性の強いロットと弱いロットによる OPLS-DA を行なった。グループは明確に分類された (図 54)。S プロットから、2 群間の判別に大きく寄与する成分 ($m/z:475$, RT:16.0 min) が見出された (図 55)。同様に、NO 産生抑制活性を用いた OPLS も行なってみた。OPLS の結果を図 56 に示した。2 群は明確に分類された。S プロットから、2 群間の判別に大きく寄与する成分 ($m/z:475$, RT:16.0 min) が見出された (図 57)。入手年の新しいグループ (2010, 2011 年入手) と古いグループ (2000, 2003 年入手) による OPLS-DA を試みたところ、両群は明確に分類され (図 58)、S プロットから両群の判別に大きく寄与している成分 ($m/z:475$, RT:16.0 min) が見出された (図 59)。マーカー成分 ($m/z:475$, RT:16.0 min) について高分解能 MS による解析を行なったところ、マーカー成分はアミグダリンのアンモニウムイオン付加体 $[M+NH_4]^+$ であることがわかり、MS/MS においてもアミグダリンを支持する結果が得られた (図 60, 61)

これらの結果から、NO 産生抑制のロット間の差異に大きく寄与しているマーカー成分としてアミグダリンが同定された。また、アミグダリンは入手年の新しいロットに多く含まれることが示唆された。

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オウゴン、ニンジン、トウニンについて多変量解析による解析を行ない、ロット差に大きく寄与するマーカー成分として、オウゴンからはフラボン配糖体であるオウゴノシド、ニンジンからは熱を加えられた際に作られる化合物 1 (図 52)、トウニンからはアミグダリンが見出された。また、アミグダリンは入手年の新しいロットに多く含まれることが示唆された。

E. 結論

今回、NO 産生抑制試験を検討した生薬国内市場品のうち、オウゴン、ニンジン、トウニン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、NO 産生抑制活性のロット差に寄与しているマーカー成分としてオウゴノシド、化合物 1 (図 52)、アミグダリンがそれぞれ見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Daikonya A, Fuchino H, Takahashi Y, Goda Y, Kawahara N : *Shoyakugaku Zasshi*, **67** (1), 1-6 (2013).

2. 学会発表

1) 大根谷章浩、瀧野裕之、高橋 豊、鎌倉浩之、合田幸広、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 (その 2)、日本食品化学学会第 18 回総会・学術大会、講演要旨集 p97 (2012 年 6 月 22 日、函館)。

2) 大根谷章浩、竹脇大気、瀧野裕之、高橋 豊、和田浩志、鎌倉浩之、合田幸広、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 3)、日本生薬学会第 59 回年会、講演要旨集 p246 (2012 年 9 月 18 日、千葉)。

3) 大根谷章浩、瀧野裕之、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 4)、日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月 29 日、横浜)。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

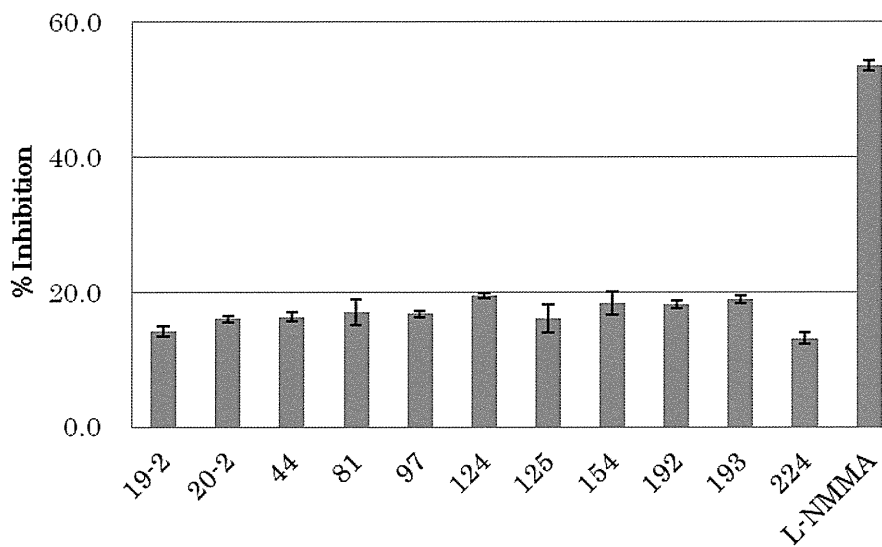


図1 サンシシ熱水抽出エキスのNO 産生抑制率 (%)

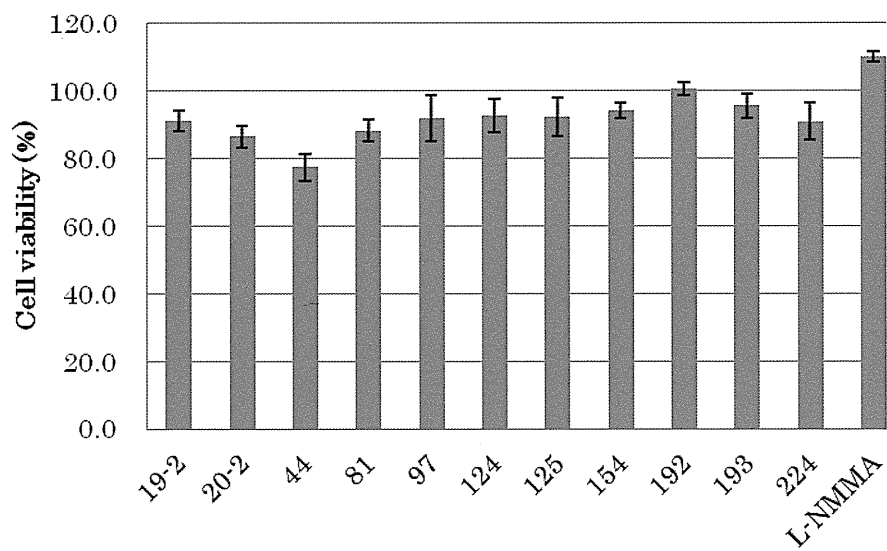


図2 サンシシ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

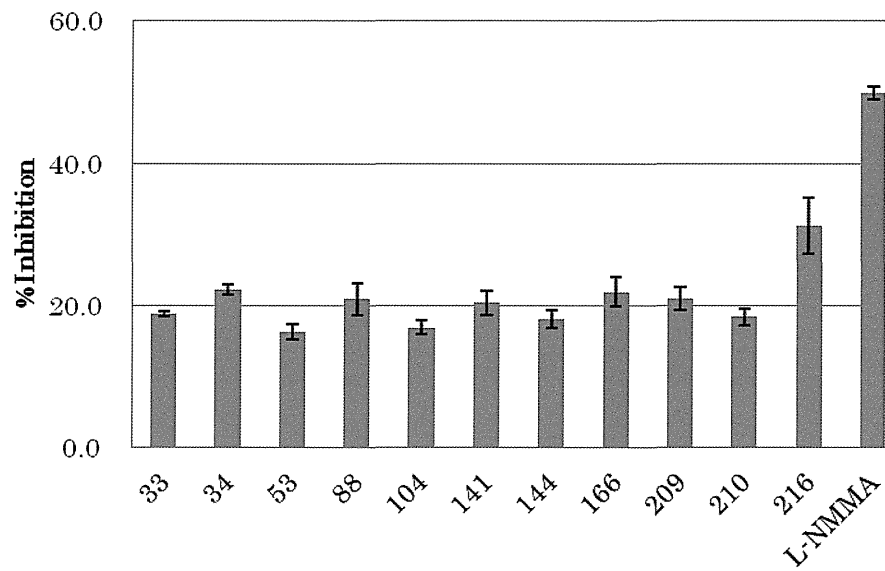


図3 マオウ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

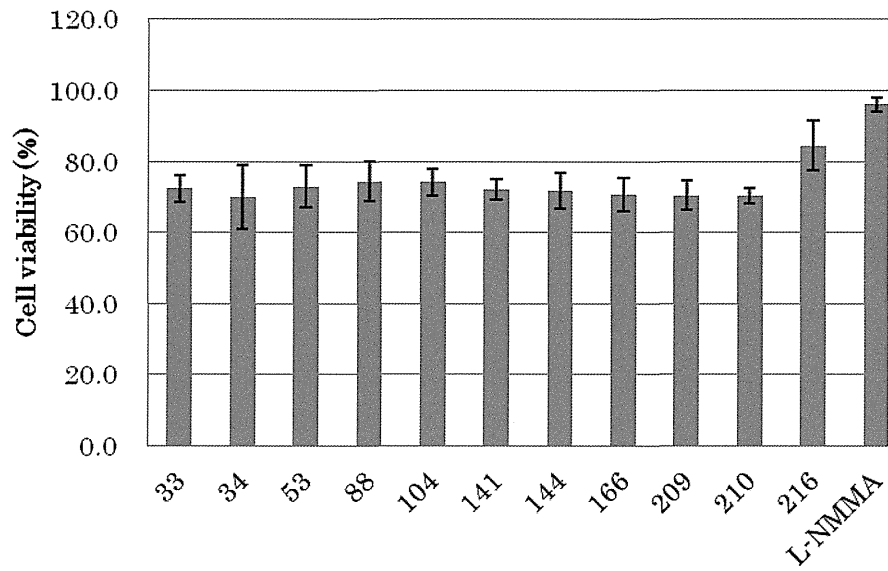


図4 マオウ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

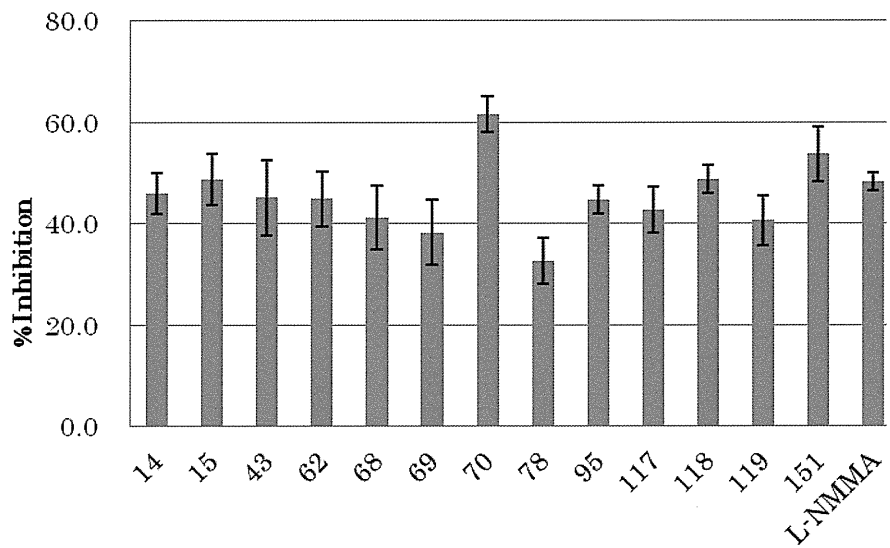


図5 ケイヒ熱水抽出エキスのNO産生抑制率(%)

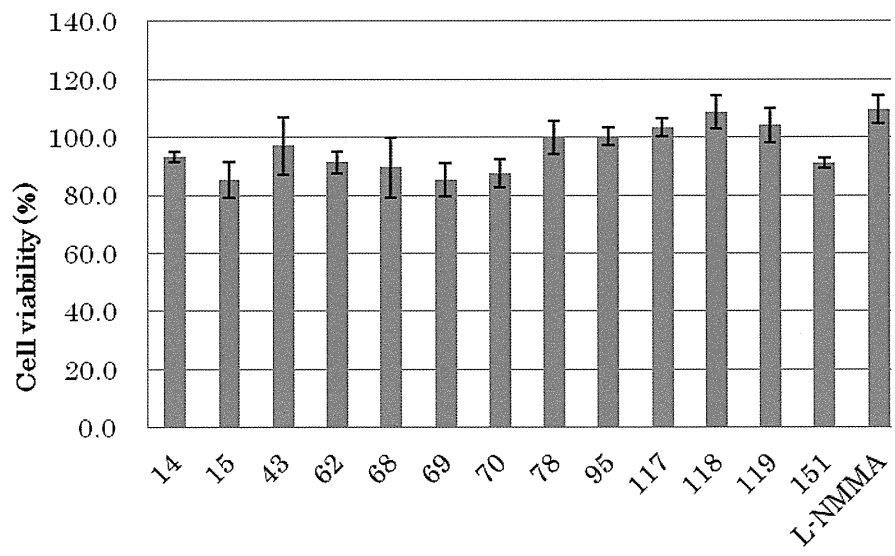


図6 ケイヒ熱水抽出エキスの細胞生存率(%)

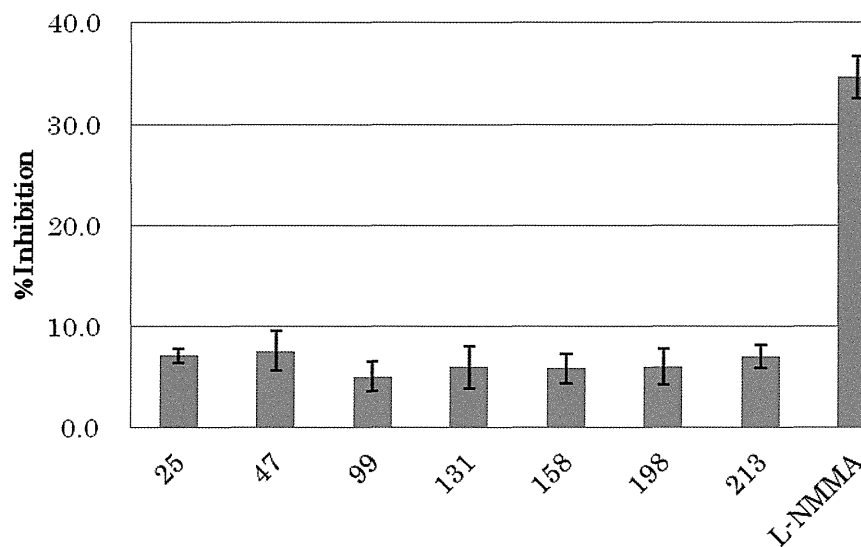


図7 シャゼンシ熱水抽出エキスのNO産生抑制率(%)

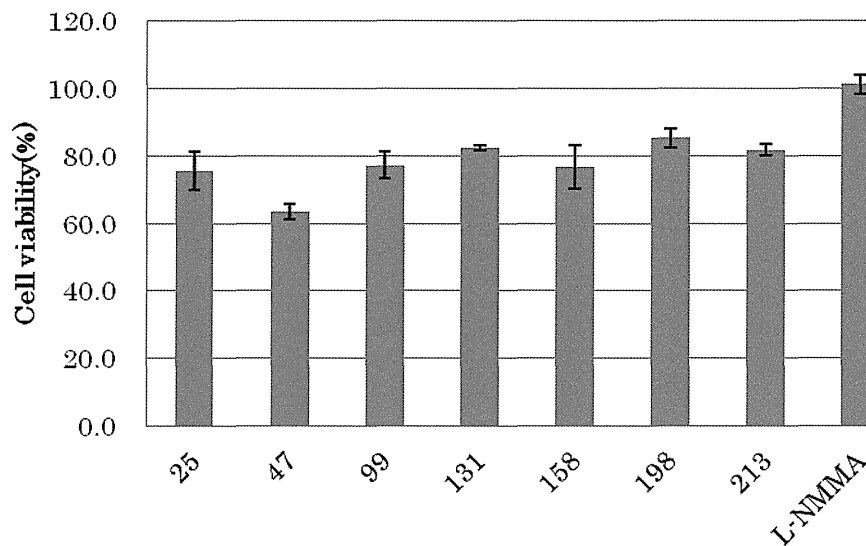


図8 シャゼンシ熱水抽出エキスの細胞生存率(%)

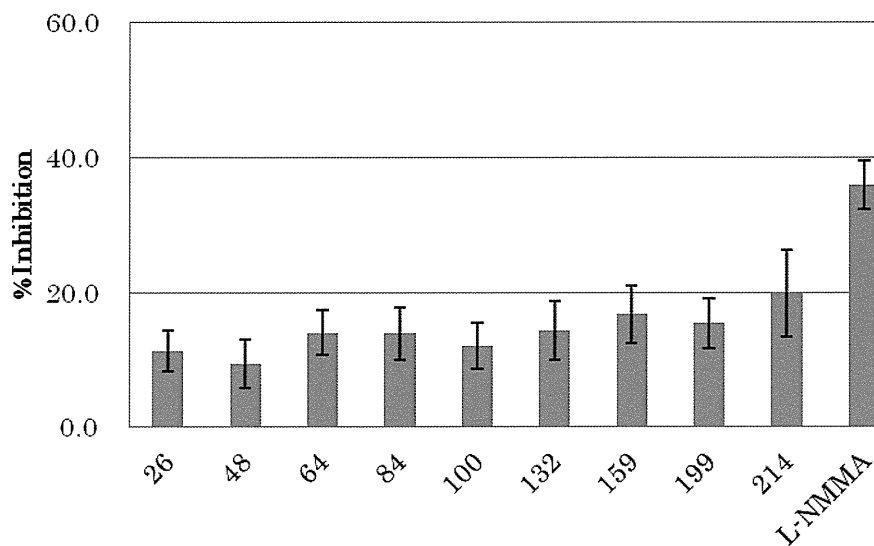


図9 センキュウ熱水抽出エキスのNO産生抑制率(%)

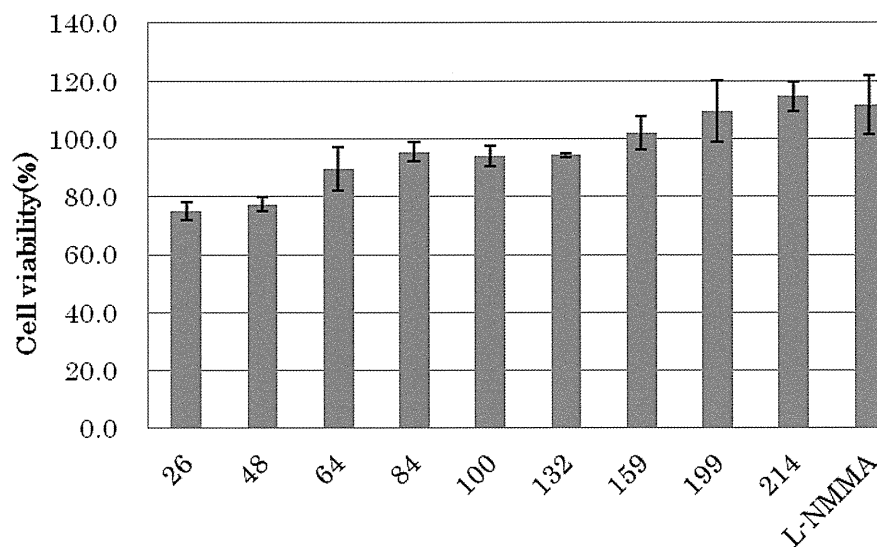


図10 センキュウ熱水抽出エキスの細胞生存率(%)

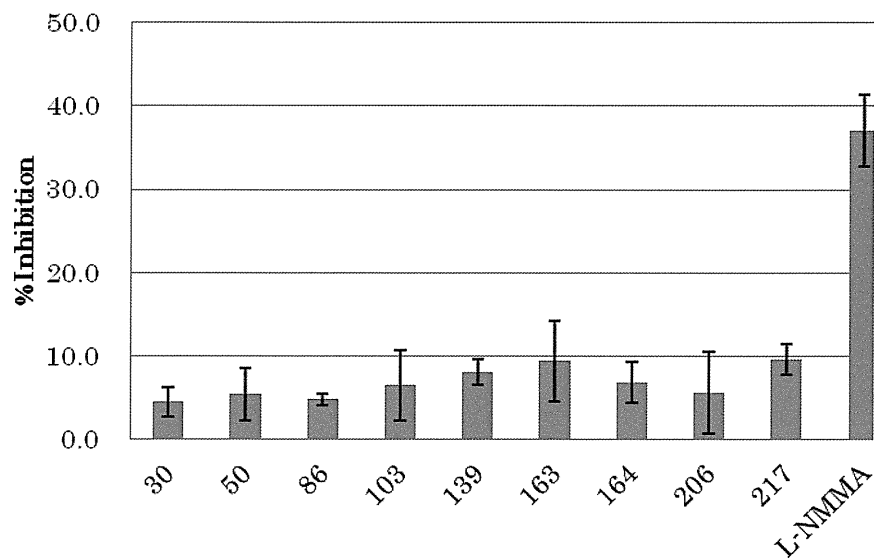


図 11 ビャクジュツ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

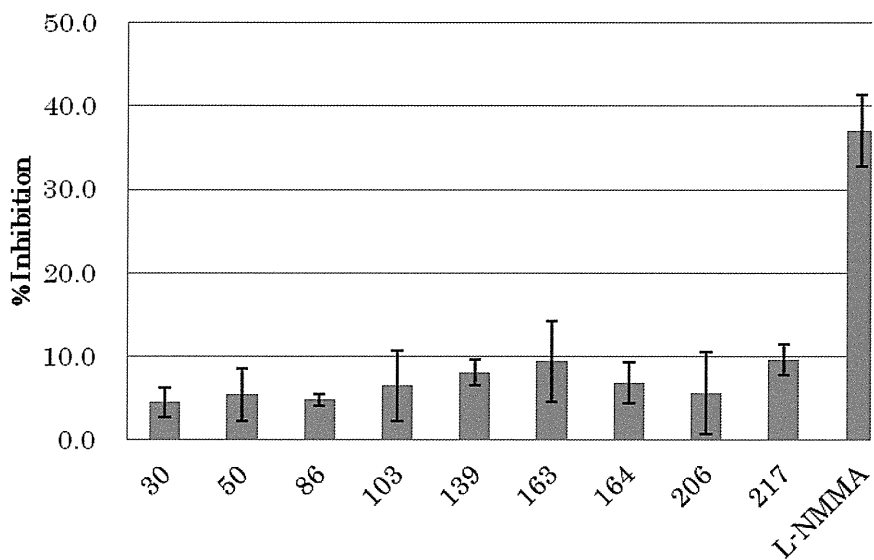


図 12 ビャクジュツ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

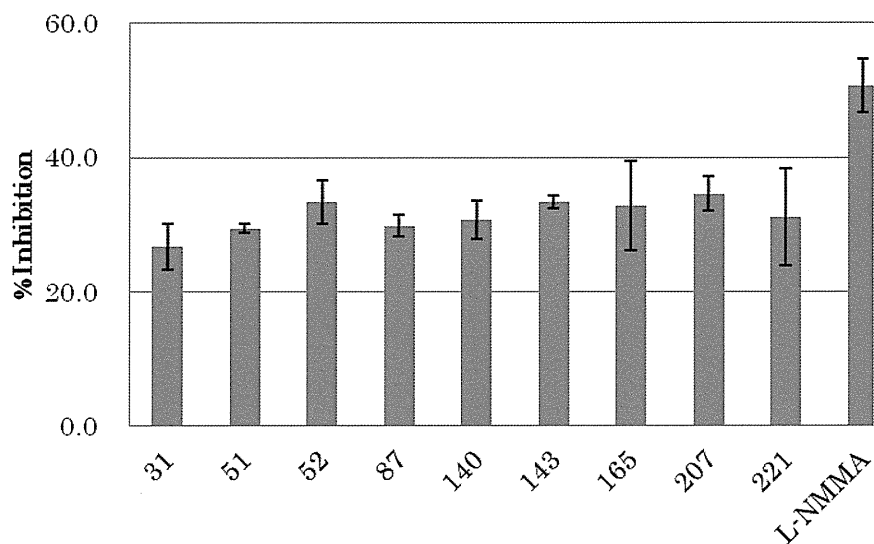


図 13 ブクリョウ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

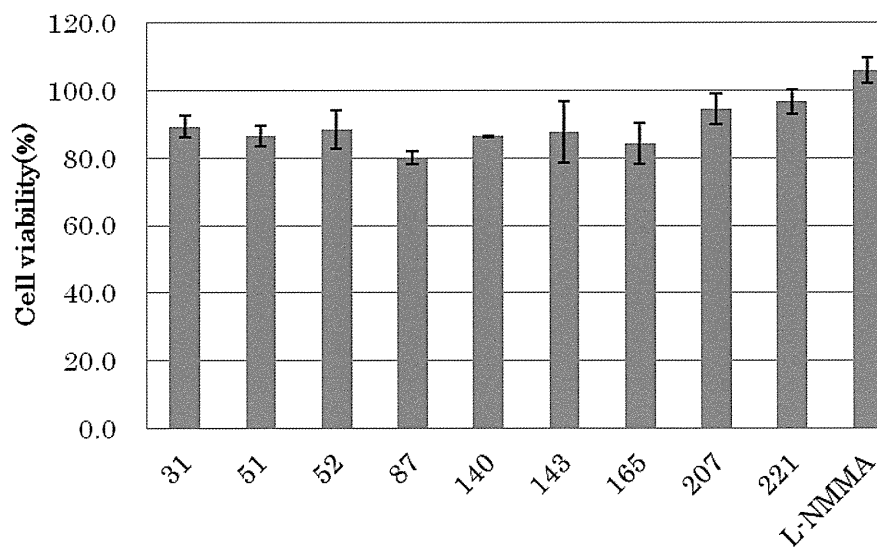


図 14 ブクリョウ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

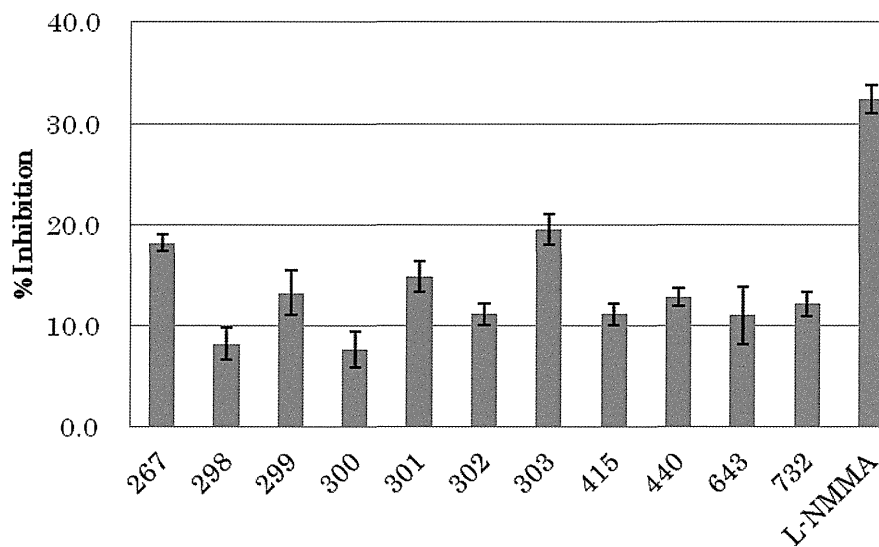


図 15 オウギ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

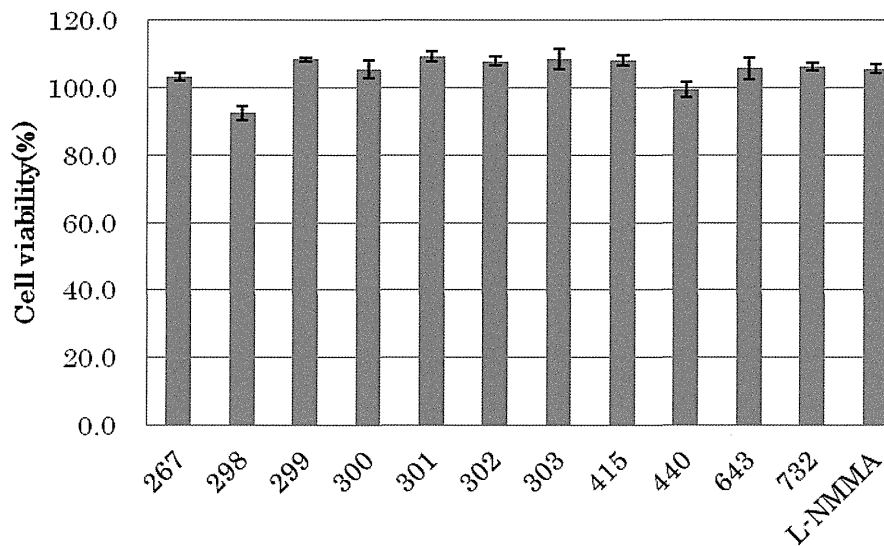


図 16 オウギ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

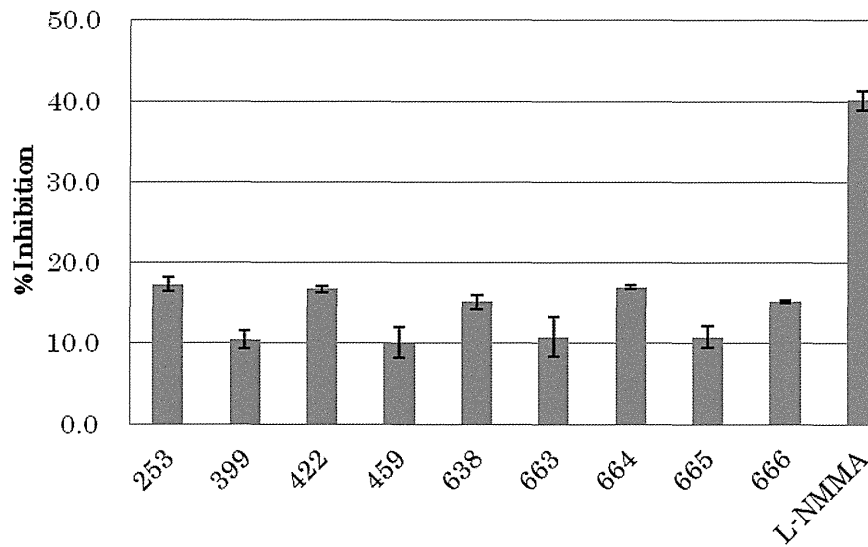


図 17 チンピ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

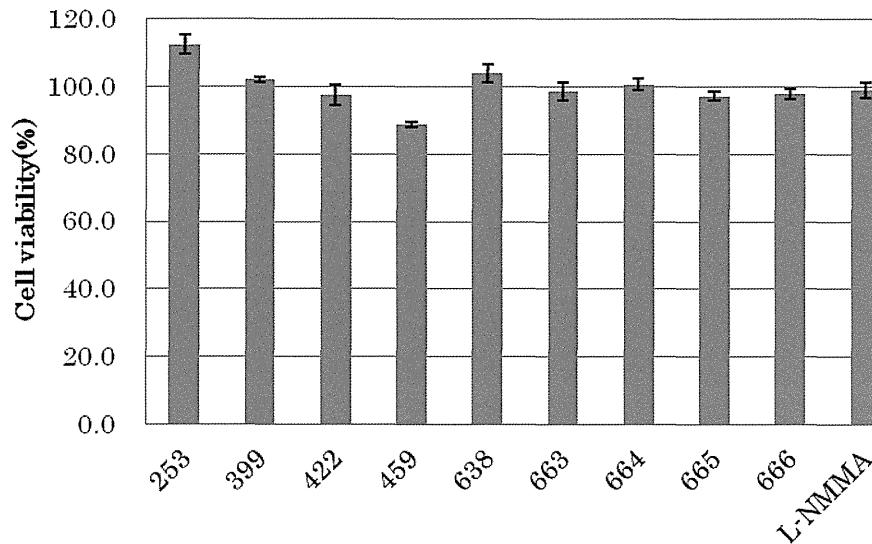


図 18 チンピ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

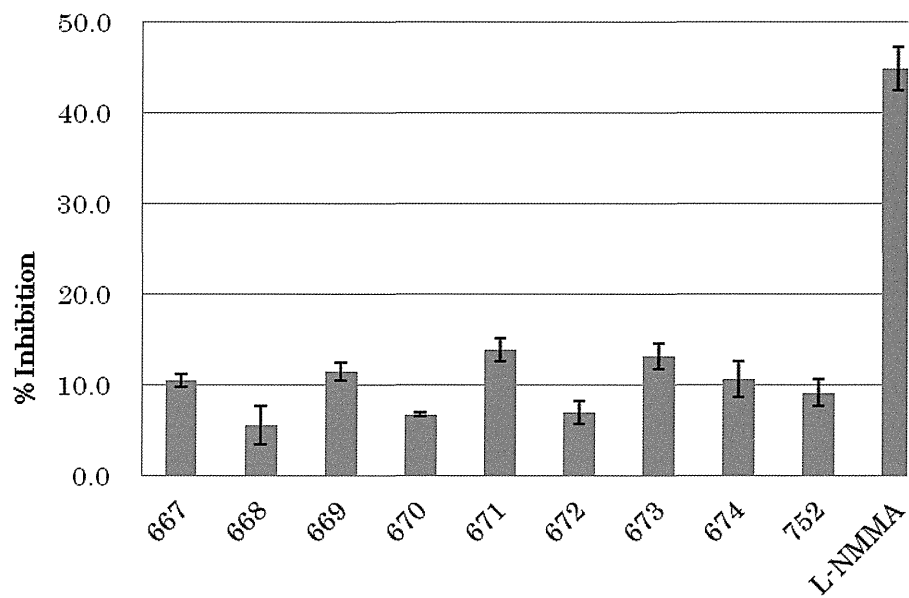


図 19 チンピ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

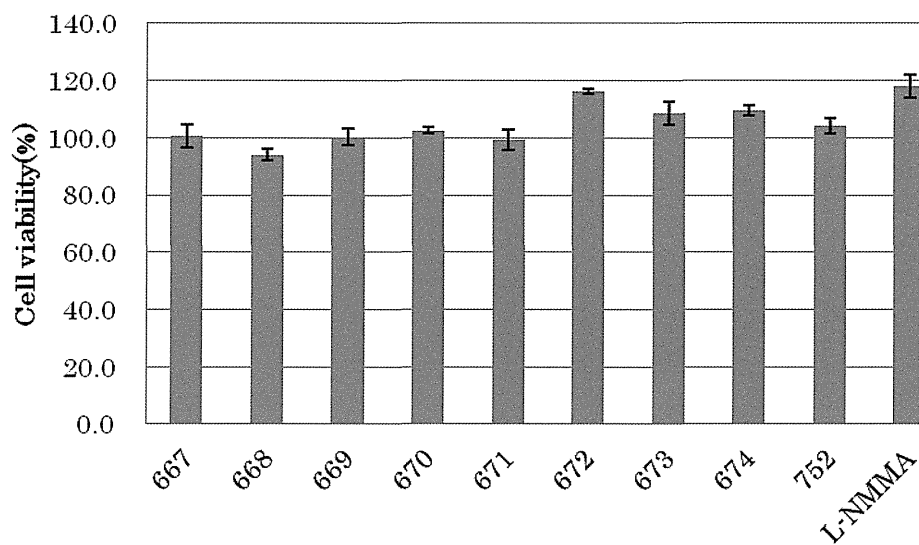


図 20 チンピ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

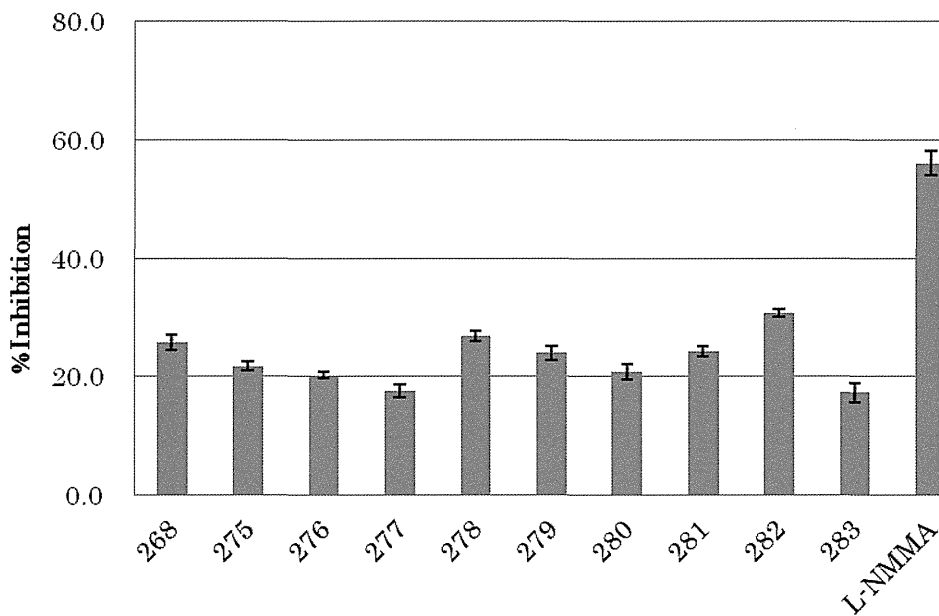


図 21 ボタンピ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

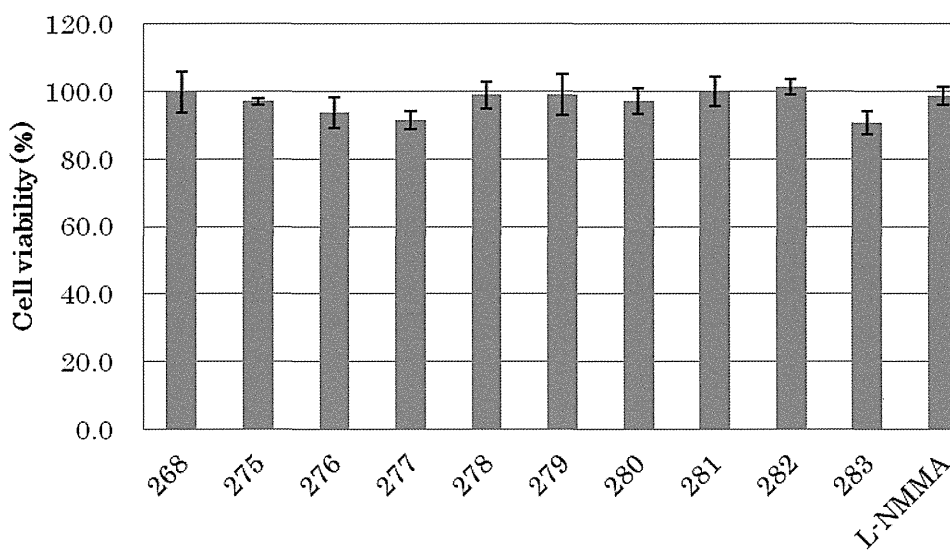


図 22 ボタンピ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

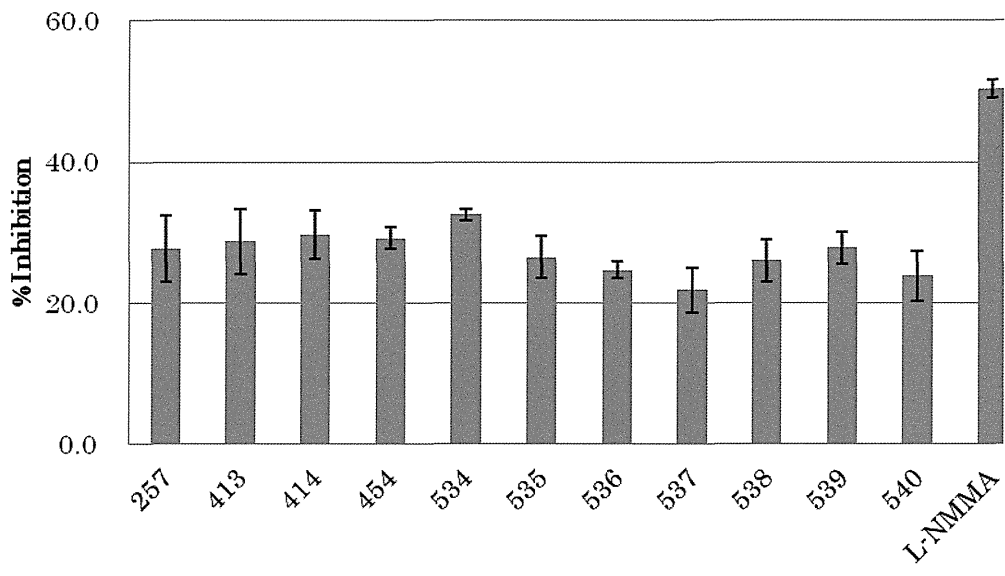


図 23 カッコン熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

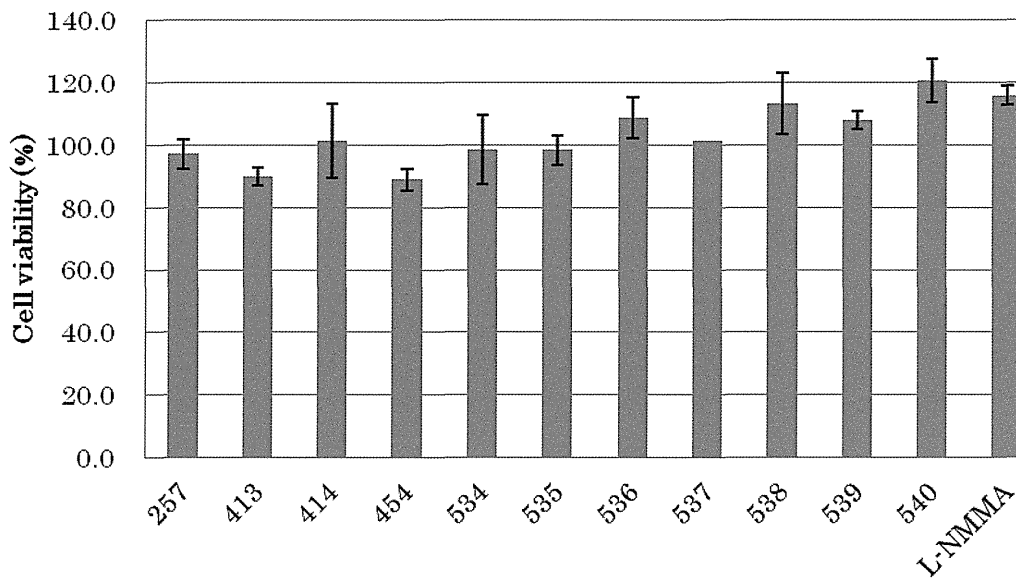


図 24 カッコン熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

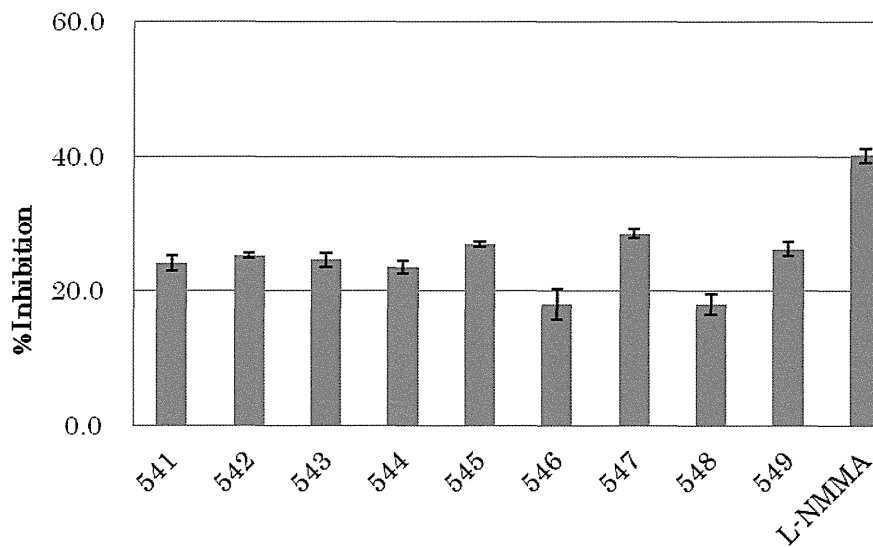


図 25 カッコン熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

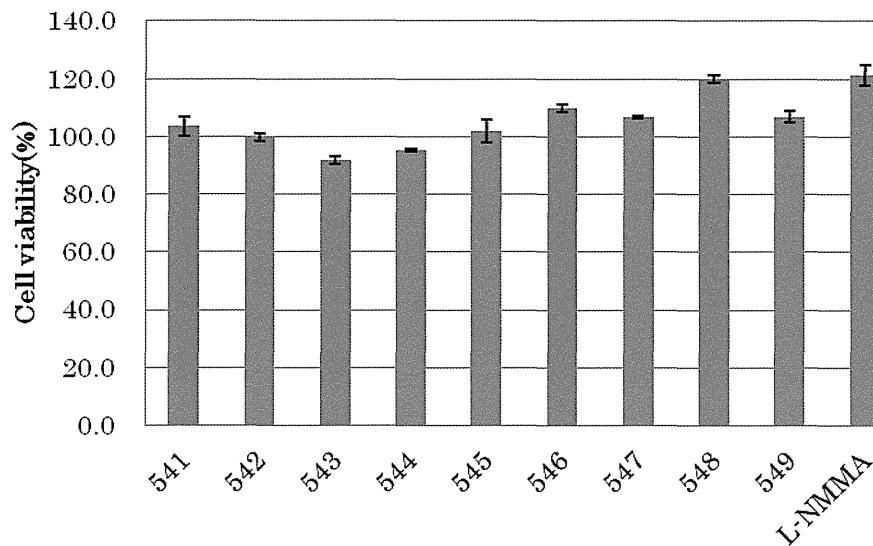


図 26 カッコン熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

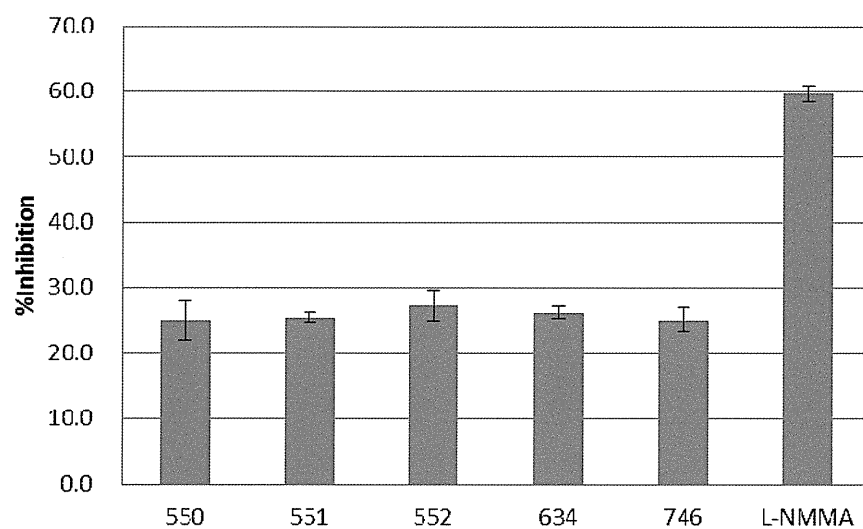


図 27 カッココン熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

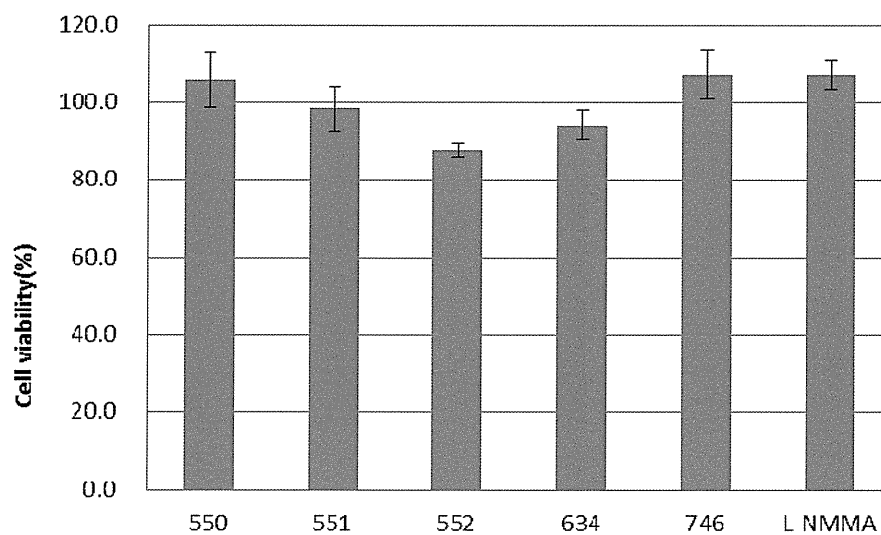


図 28 カッココン熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

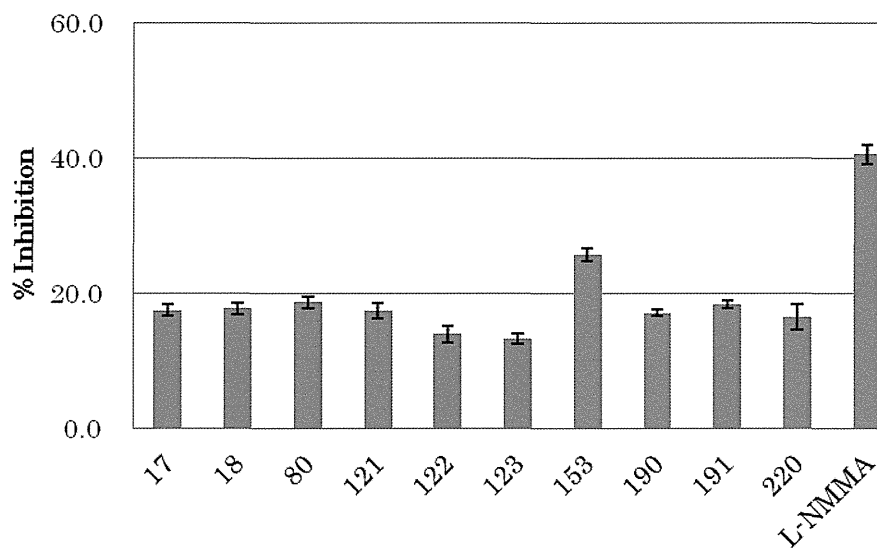


図 29 サイコ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

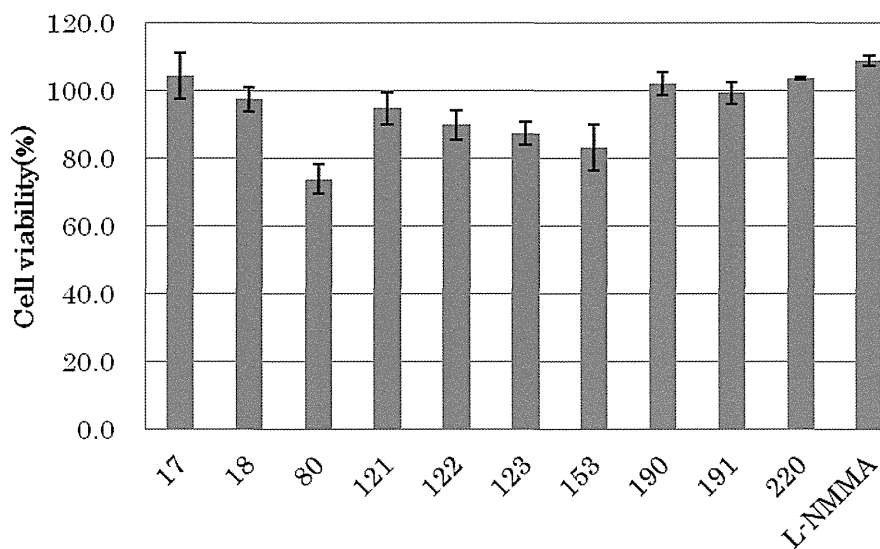


図 30 サイコ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)

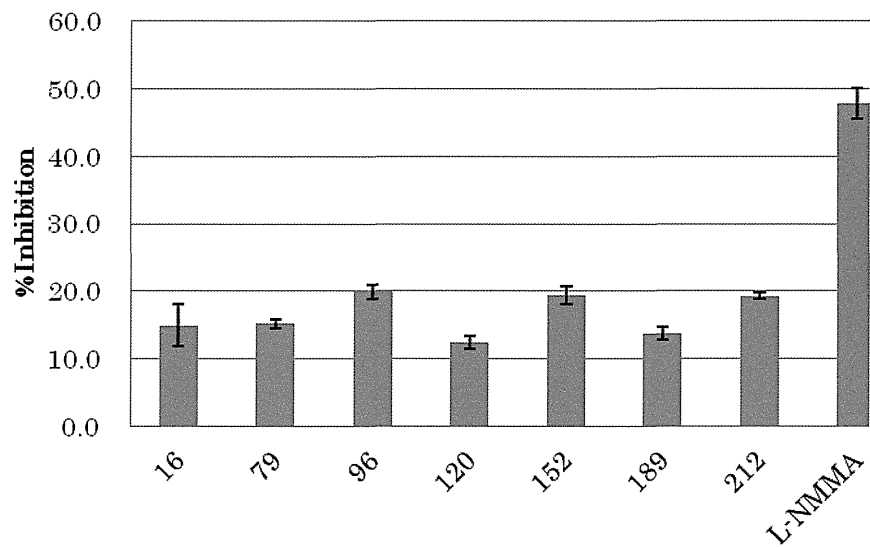


図 31 ゴシツ熱水抽出エキスの NO 産生抑制率 (%)

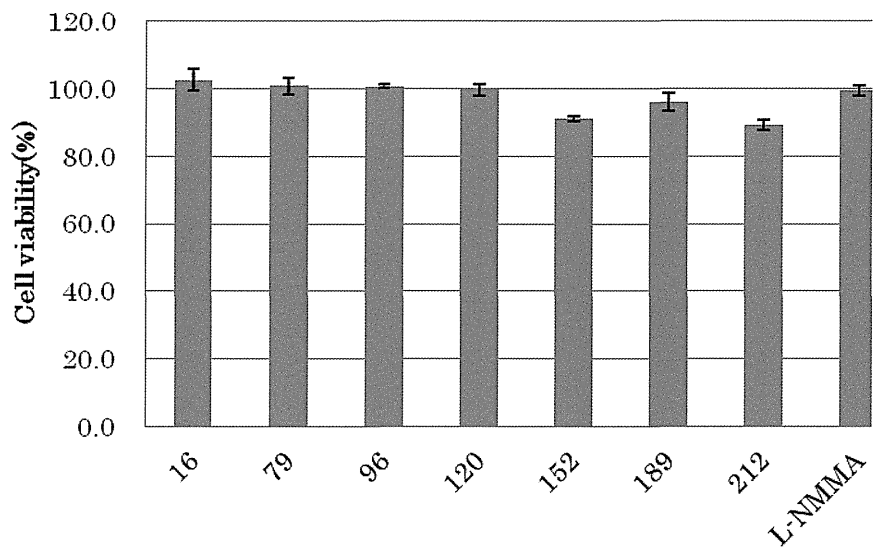


図 32 ゴシツ熱水抽出エキスの細胞生存率 (%)