

樹状細胞の成熟化および細胞生存率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3種の生薬エキス試料（センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ）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脛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, 10 ng/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 a-c)。LPS(0.5 μ g/mL)刺激によっても同様に成熟化が誘導され、抗原提示に必要な共刺激分子であるCD80, CD86分子およびMHC class IIを発現させた(データ未記載)。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および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)処理により、LPS(0.1 μ g/mL)刺激による樹状細胞のCD80, CD86, MHC class IIの各細胞表面分子の発現増加は、生薬未処理群と同様の増加を示した。また、その増加率は、処理群と未処理群で差は確認されなかった(図2 a-c)。また、LPS(0.5 μ g/mL)刺激による樹状細胞の各細胞表面分子の発現誘導に対しても、同様の検討を行った。その結果、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に、明らかな効果は確認されず、各細胞表面分子の発現が誘導された(データ未記載)。

さらに、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3)。

D. 考察

本研究は、免疫制御機構に対し重要な役割

を担う樹状細胞を用い、成熟化に伴う細胞表面分子の増加と細胞生存率を指標として、免疫系制御の観点から生薬エキスによる生理活性を測定した。

本年度のセンキュウ、ソヨウ、ブクリョウの3種の生薬エキスは、細胞表面抗原の発現変化を指標とした成熟化の測定により、いずれも有効な生理活性が確認されなかった。また、樹状細胞の生存率においても、有効な効果は確認されなかった。

3種の生薬は、漢方薬のなかでも免疫制御作用を示す方剤の構成生薬として使用されているが、樹状細胞に対する直接の生理活性は確認されなかった。

昨年度の他の生薬エキスにおいて、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が可能であったため、本年度の3種の生薬エキスは樹状細胞に対する生理活性が弱く、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

センキュウ、ソヨウ、ブクリョウは、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、生理活性を確認できなかった。別の観点からの試験による生理活性検定が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

H. 健康危険情報

なし

表1. 本研究に使用された生薬リスト

センキュウ

管理番号	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)
NIB-026	日本 北海道	原形	2010	
NIB-048	日本 北海道	原形	2010	
NIB-064	日本 北海道	原形	2010	
NIB-084	日本 北海道	原形	2009	栽培品(主に使用)
NIB-100	日本 北海道	原形	2010	
NIB-132	日本 北海道	原形	2010	栽培品
NIB-159	日本 北海道	原形	2010	
NIB-199	日本 北海道	刻み	2008	
NIB-214	日本 北海道	原形		

ソヨウ

管理番号	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)
NIB-027	山東産	原形	2010	
NIB-133	中国 河南省	原形	2010	栽培品
NIB-160	中国 河北省	原形	2010	和種
NIB-200	中国 浙江省	刻み	2010	
NIB-211	日本 岩手	原形		

ブクリョウ

管理番号	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)
NIB-031	北鮮産	碎	2008	碎
NIB-051	中国四川省	刻み	2010	
NIB-052	中国雲南省	刻み	2010	
NIB-087	中国四川省	刻み	2008	栽培品(主に使用)
NIB-140	中国安徽省	刻み	2009	栽培品(主に使用)
NIB-143	中国四川省	刻み	2003	
NIB-165	中国四川省	刻み	2009	
NIB-207	中国安徽省	角切	2010	白茯苓
NIB-221	中国四川省	原形		

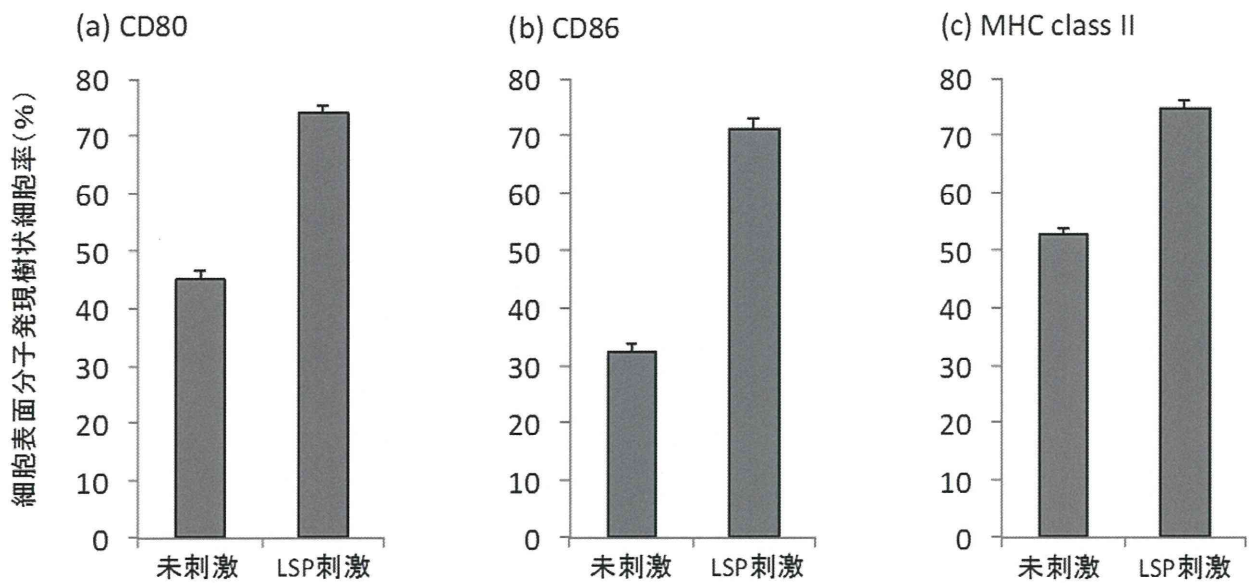


図1. (a)CD80、(b)CD86、(c)MHC class IIの各細胞表面分子が発現した樹状細胞の割合を示す。LPS刺激(0.1 μ g/ml、24時間)により、細胞表面分子が発現した樹状細胞は増加した。

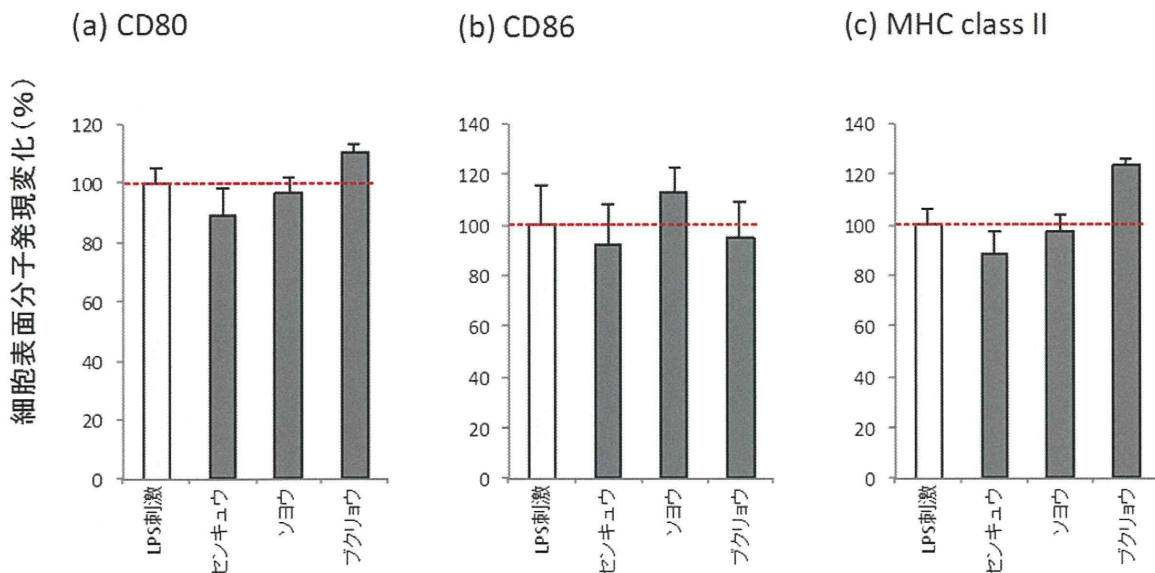


図2. (a)CD80、(b)CD86、(c)MHC class IIの各細胞表面分子のLPS刺激(0.1 μ g/ml、24時間)による発現増加率を示す。各生薬処置により細胞表面抗原の発現増加に対する効果は検出されなかった。

(a) viability

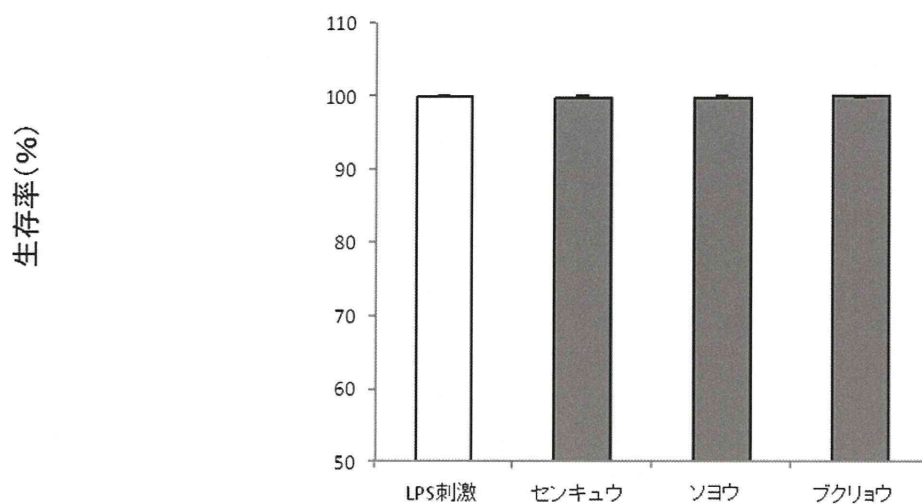


図3. (a) LPS刺激(0.1 μ g/ml、24時間)による生存率の変化を示す。各生薬処置により生存率に対する効果は検出されなかった。

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 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・神経機能学分野 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。サンシシには amyloid β 誘発の細胞死を抑制する作用、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウには、amyloid β によって萎縮した軸索を伸展させる作用が認められた。

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。

B. 研究方法

1. 生薬エキス

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。

今年度は、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウの3種について活性を検討した。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. 実験方法

Calpain 酵素阻害活性

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 μ g/mL, 10 μ g/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 (1 μ M) 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。

Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制作用

動物の取り扱いに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、 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。

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、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 (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 $648\ \mu\text{m} \times 860\ \mu\text{m}$ 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

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 (生薬混合エキス)。有効性が認められた場合は個別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。

Calpain 酵素阻害活性

本アッセイでは、30%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。本年度検討した3種の生薬混合エキスのうち、Calpain 活性を有意に変動させたものはなかった (Fig. 1)。

Amyloid 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。本アッセイでは、30%以上の阻害活性を示すエキスを「Amyloid β 誘発神経細胞死を抑制する活性が認められる」と判断することとした。本年度検討した3種の生薬混合エキスのうち、Amyloid β 誘発神経細胞死を抑制したものはなかった (Fig. 2)。また、昨年度報告したように、サンシシは細胞死阻害活性を有意に示した。そこでサンシシの個別サンプ

ルについて、活性を検討した (Fig. 3)。どのサンシシサンプルも細胞死抑制活性を示したが、特に NIB-081 は活性が高く、NIB-192, NIB-193 は比較的活性が弱かった。

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日間後に生薬混合エキスを処置し、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。本アッセイでは、樹状突起および軸索の伸展活性がともに30%以上のものを「活性あり」と判断することとした。本年度の3種の生薬エキスのうち、樹状突起を30%以上伸展させたのはなかった。一方、軸索を30%以上伸展させたのは、センキュウ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ソヨウ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ブクリョウ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) だった (Fig. 4)。

D. 考察

Calpain 活性の阻害に関しては、今年度も、ポジティブコントロールの酵素阻害剤 MDL28170 の阻害活性の30%以上の活性を有する生薬エキスが見出されなかった。MDL28170 のように calpain タンパクに直接結合して活性を阻害する化合物の、生薬中での存在確率は高くないのかもしれない。

Amyloid β 誘発神経細胞死を抑制する活性に関しては、昨年度の検討でサンシシ (生薬混合サンプル) が示されたので今年度はサンプル別の検討を実施したところ、ほぼどのサンプルにも細胞死抑制作用が再現されたが作用の強弱は認められた。サンシシ個別サンプルの LC-MS クロマトグラム (平成23年度 総括・分担研究報告書、p315-p317) では、サンプル間で成分組成の差はほとんどないため、活性の強さと担当成分の関係については今後の検討が必要である。

Amyloid β 誘発軸索萎縮に関しては、センキュ

ウ、ソヨウ、ブクリョウのいずれも混合エキスでの活性が示された。今後、個別サンプルでの検討が必要である。

E. 結論

今年度の検討では、サンシシには Amyloid β 誘発の細胞死を抑制する作用が認められ、サンプルの違いによる活性の差異も示された。センキュウ、ソヨウ、ブクリョウには、Amyloid β によって萎縮した軸索を伸展させる作用が認められた。

F. 研究発表

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. 本研究に使用された生薬リスト

センキュウ

管理番号	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)
NIB-026	日本 北海道	原形	2010	
NIB-048	日本 北海道	原形	2010	
NIB-064	日本 北海道	原形	2010	
NIB-084	日本 北海道	原形	2009	栽培品(主に使用)
NIB-100	日本 北海道	原形	2010	
NIB-132	日本 北海道	原形	2010	栽培品
NIB-159	日本 北海道	原形	2010	
NIB-199	日本 北海道	刻み	2008	
NIB-214	日本 北海道	原形		

ソヨウ

管理番号	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)
NIB-027	山東産	原形	2010	
NIB-133	中国 河南省	原形	2010	栽培品
NIB-160	中国 河北省	原形	2010	和種
NIB-200	中国 浙江省	刻み	2010	
NIB-211	日本 岩手	原形		

ブクリョウ

管理番号	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)
NIB-031	北鮮産	碎	2008	碎
NIB-051	中国四川省	刻み	2010	
NIB-052	中国雲南省	刻み	2010	
NIB-087	中国四川省	刻み	2008	栽培品(主に使用)
NIB-140	中国安徽省	刻み	2009	栽培品(主に使用)
NIB-143	中国四川省	刻み	2003	
NIB-165	中国四川省	刻み	2009	
NIB-207	中国安徽省	角切	2010	白茯苓
NIB-221	中国四川省	原形		

Inhibition of calpain activity (Cell-free assay) – 阻害率 –

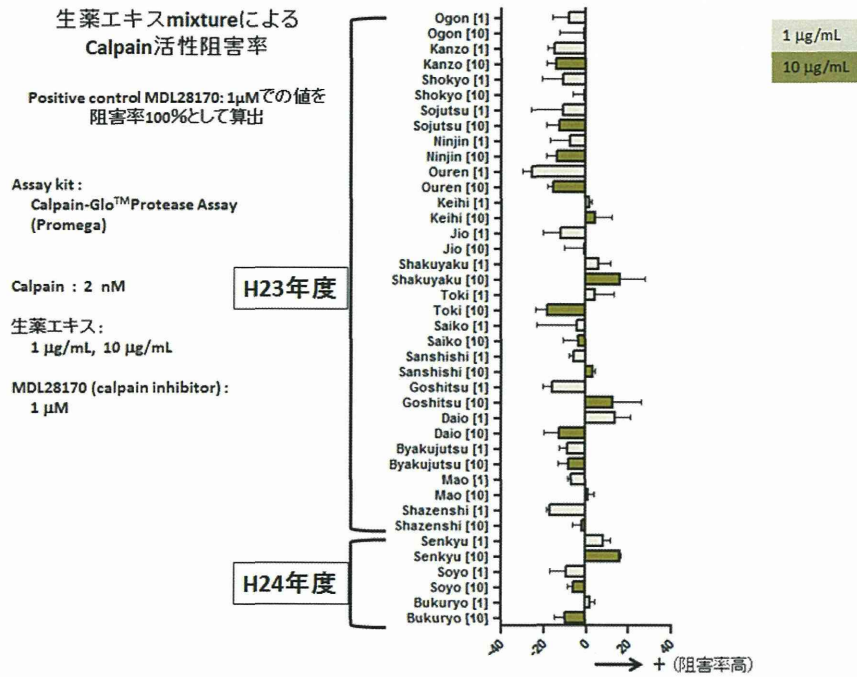


Fig. 1. 生薬エキスの Calpain 活性に対する作用

Protection of A β (25-35)-induced neuronal death – 阻害率 –

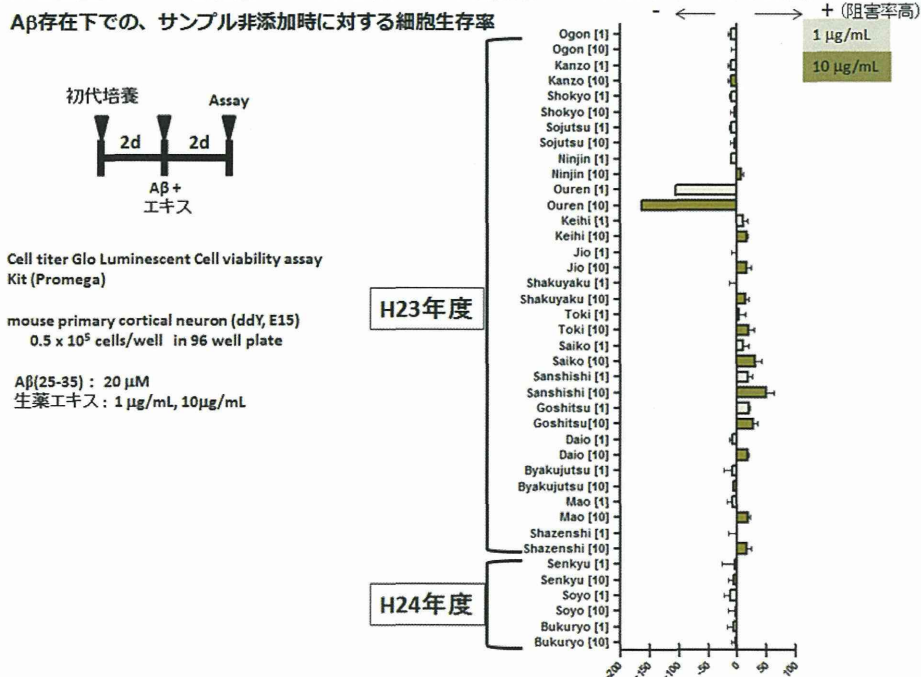


Fig. 2. A β (25-35)誘発の神経細胞死に対する生薬エキスの作用

Protection of A β (25-35)-induced neuronal death – 阻害率 –

サンシシ個別サンプル

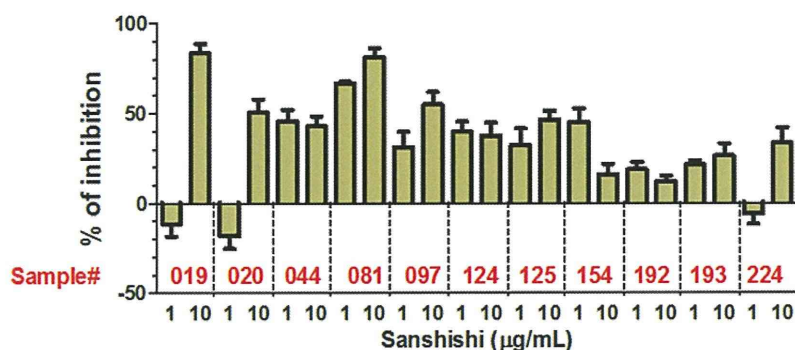


Fig. 3. A β (25-35)誘発の神経細胞死に対するサンシシ個別エキスの阻害率

Recovery from A β (25-35)-induced axon/dendrite atrophy

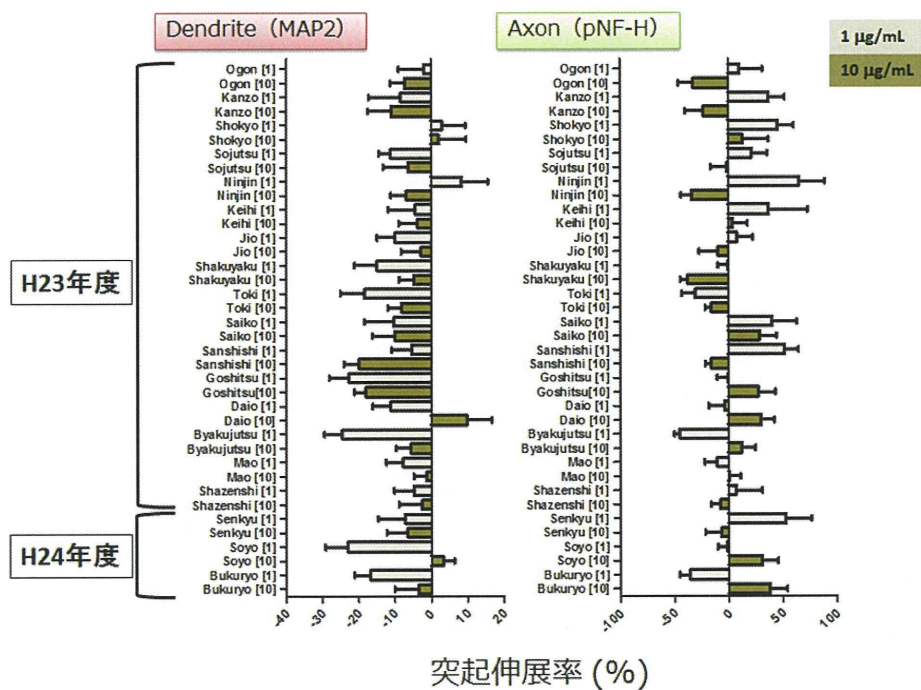


Fig. 4. A β (25-35)誘発の神経突起萎縮に対する生薬エキスの作用

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 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

LS-MS 分析による成分プロファイル比較

研究協力者 富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野 田中 謙

生薬ケイヒについて、成分解析情報の整備を目的に、わが国で流通する複数の試料を収集し、水抽出エキスを調製して、それらの LC-MS 分析を行った。産地、メーカーの異なる供試生薬試料内で成分組成を比較したところ、産地による違いで含有成分量に差異が認められた。LC-MS データを計量化学的に解析したところ、中国産ではタンニン類が多く、ベトナム産ではジテルペンが多いことが明らかとなった。指標となるジテルペンを単離・同定した。

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、市場流通生薬試料の化学的成分情報の集積により、生薬の含有成分に関する情報の整備を目的とする。

成分情報等生薬に関する多角的な情報のデータベース化を行うことは、国内に流通する生薬の安全性の確保ならびに品質の向上に貢献するものと期待される。

本報告書では、生薬ケイヒ LC-MS による成分分析情報を計量化学的に解析し、産地特有のマーカ化合物を同定した結果について報告する。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された試料は、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を同センターで抽

出したエキスである。

さらに、別途中国産ケイヒ 3 種、ベトナム産ケイヒ 2 種を入手し、水エキスを調製した。

分析試料を表 1 に示す。

2. 実験方法

分析装置は Shimadzu LC-IT-TOF MS ESI を使用した、LC 条件は以下のとおり：

分析条件

カラム Waters Atlantis T3 (2.1 mm x 100 mm, 3 micron), カラム温度 40°C、移動相 A 5 mM Ammonium acetate solution、移動相 B acetonitrile, Gradient 溶出 10 % to 100 % Solvent B (0-30 min), 100% Solvent B (30-40 min), 1.5 mL/min.

生薬エキスは、10 mg/mL の濃度で溶解して LC-MS 分析を行なった。

C. 研究結果

図 1 に中国産およびベトナム産ケイヒの

代表的な負イオン LC-MS クロマトグラムを示す。

さらに、cinncasinol A (4) の (M-H)⁻イオン (m/z 381.1919), cinnzeylanol (2) の (M-H)⁻イオン (m/z 382.2075), anhydrocinnzeylanol (3) の (M-H)⁻イオン (m/z 365.1970), cinnzeylanin (1) の (M-H)⁻イオン (m/z 425.2181), epicatechin (5) の (M-H)⁻イオン (m/z 289.0706), procyanidin B2 (6) の (M-H)⁻イオン (m/z 577.1340) でモニターしたマスクロマトグラムを示す。

マスクロマトグラムの比較で明らかとなり、中国産ではタンニン類が多く、ベトナム産ではジテルペン類が多いことが明らかとなった。これをさらに詳細に解析するため、LC-MS データをマスアレイデータに変換後、主成分分析(PCA)を用いて産地による成分組成の特徴を分析した。

PCA で得られたスコアプロットを図 2 に、ローディングを図 3 に示す。ローディングの解析結果及び LC-MS のデータから、cinnzeylanine (1), cinnzeylanol (2), anhydrocinnzeylanol (3), cinncasinol A (4), epicatechin (5) 及び procyanidin B2 (6) と推定される化合物が中国産とベトナム産ケイヒを識別するマーカー化合物として重要であることが明らかとなった。各マーカー化合物の構造を図 4 に示す。

これらの化合物を確認するため、ジテルペン類の単離・同定を行った。単離したジテルペン類の NMR データを図 5~12 及び MS データを図 13 に示す。いずれも文献記載のスペクトルデータと一致し、単離したジテルペン類は cinnzeylanine (1), cinnzeylanol (2), anhydrocinnzeylanol (3), cinncasinol A (4) と同定された。

D. 考察

我が国で使用されるケイヒは、主として中国あるいはベトナムで栽培されたもので

あるが、両者に植物的な違いは無く、品質の差異は栽培方法に由来すると考えられている。中国では、栽培期間が比較的短いもの(樹齢 15 年未満)が利用されるのに対し、ベトナムでは栽培期間の長いもの(樹齢 15 年以上)を使用するとされている。図 2 に示すスコアプロットで、試料番号 16 のベトナム産ケイヒ(等級 YBV)が中国産ケイヒのグループと重なっている。YBV 等級のケイヒはベトナム産の中では比較的若い木から得られたものであるとされている。このことからジテルペン類の含量の差異は、基原植物の栽培期間と関係があるのではないかと推定された。

また、近年、折原らは cinnzeylanine (1) が抗ウイルス活性を有することを報告している。このような抗ウイルス活性を有するジテルペンの含有量がケイヒの品質に関係するか興味を持たれる。

E. 結論

生薬ケイヒについて、成分解析情報の整備を目的に、わが国で流通する複数の試料を収集し、水抽出エキスを調製して、それらの LC-MS 分析を行った。産地、メーカーの異なる供試生薬試料内で成分組成を比較したところ、産地による違いで含有分量に差異が認められた。LC-MS データを計量化学的に解析したところ、中国産では procyanidin B2 (6) 等のタンニン類が多く、ベトナム産では cinnzeylanine (1), cinnzeylanol (2), anhydrocinnzeylanol (3), cinncasinol A (4) 等のジテルペン類が多いことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka K., Li F., Tezuka Y., Watanabe S., Kawahara N., Kida H., Evaluation of the quality of Chinese and Vietnamese cassia using

LC-MS and multivariate analysis. Nat. Prod. 2012.
Comm., 8, 75-78 (2013).

2. 学会発表

Tanaka K., Quality evaluation of Cinnamomi Cortex by metabolomics approach. The 24th Federation of Asian Pharmacist Association (FAPA) Congress, Bali, Indonesia 9/13-16,

G. 知的財産権の出願, 登録状況
無し

H. 健康危険情報
無し

表 1 分析した試料

Sample No.	Production area	Collected year	Voucher No.*
Chinese cassia			
1	Guangxi, China	2010	NIB-015
2	Guangxi, China	2010	NIB-043
3	Guangxi, China	2009	NIB-062
4	Guangdong, China	2007	NIB-068
5	Guangxi, China	2009	NIB-069
6	Guangdong, China	2008	NIB-078
7	Guangxi, China	2009	NIB-117
8	Guangxi, China	2009	NIB-119
9	Guangxi, China	2010	NIB-151
10	Guangxi, China	2009	NIB-171
11	Guangxi, China	2009	NIB-187
12	Guangxi, China	Unknown	NIB-222
13	Guangxi, China	Unknown	TMPW-27700
14	Guangxi, China	Unknown	TMPW-27701
15	Guangxi, China	Unknown	TMPW-27702
Vietnamese cassia			
16	Yen Bai, Vietnamese, YB-V	2009	NIB-014
17	Vietnamese	2009	NIB-070
18	Vietnamese	2009	NIB-095
19	Vietnamese	2010	NIB-118
20	Yen Bai, Vietnamese, YB-III	2010	NIB-188
21	Vietnamese	Unknown	TMPW-27703
22	Vietnamese	Unknown	TMPW-27704

*試料の voucher number は、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター (NIB) と富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物資料館 (TMPW) による。

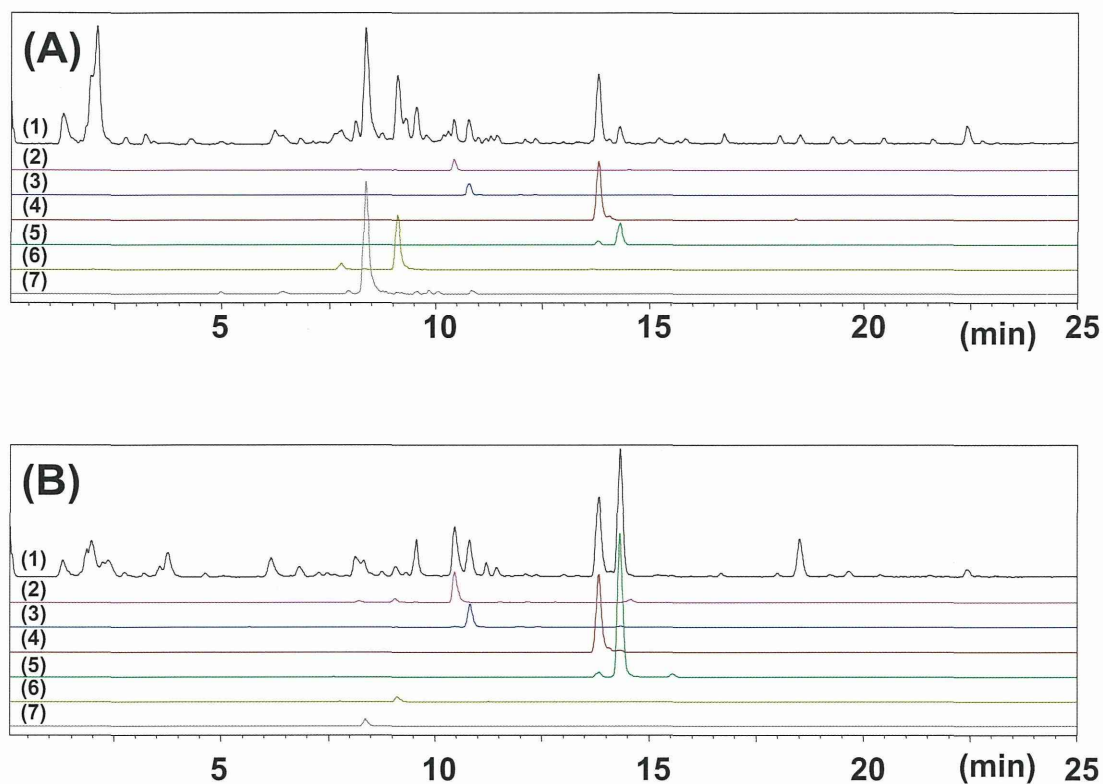


図1 中国産およびベトナム産ケイヒの代表的な負イオンLC-MSクロマトグラム.
 (1) トータルイオンクロマトグラム; (2) cinncasinol A (4) の(M-H)⁻イオン(m/z 381.1919);
 (3) cinnzeylanol (2)の(M-H)⁻イオン(m/z 382.2075);
 (4) anhydrocinnzeylanol (3)の(M-H)⁻イオン(m/z 365.1970); (5) cinnzeylanin (1)の(M-H)⁻
 イオン(m/z 425.2181); (6) epicatechin (5) の(M-H)⁻イオン(m/z 289.0706); (7) procyanidin
 B2 (6)の(M-H)⁻イオン(m/z 577.1340)でモニターしたマスクロマトグラム.

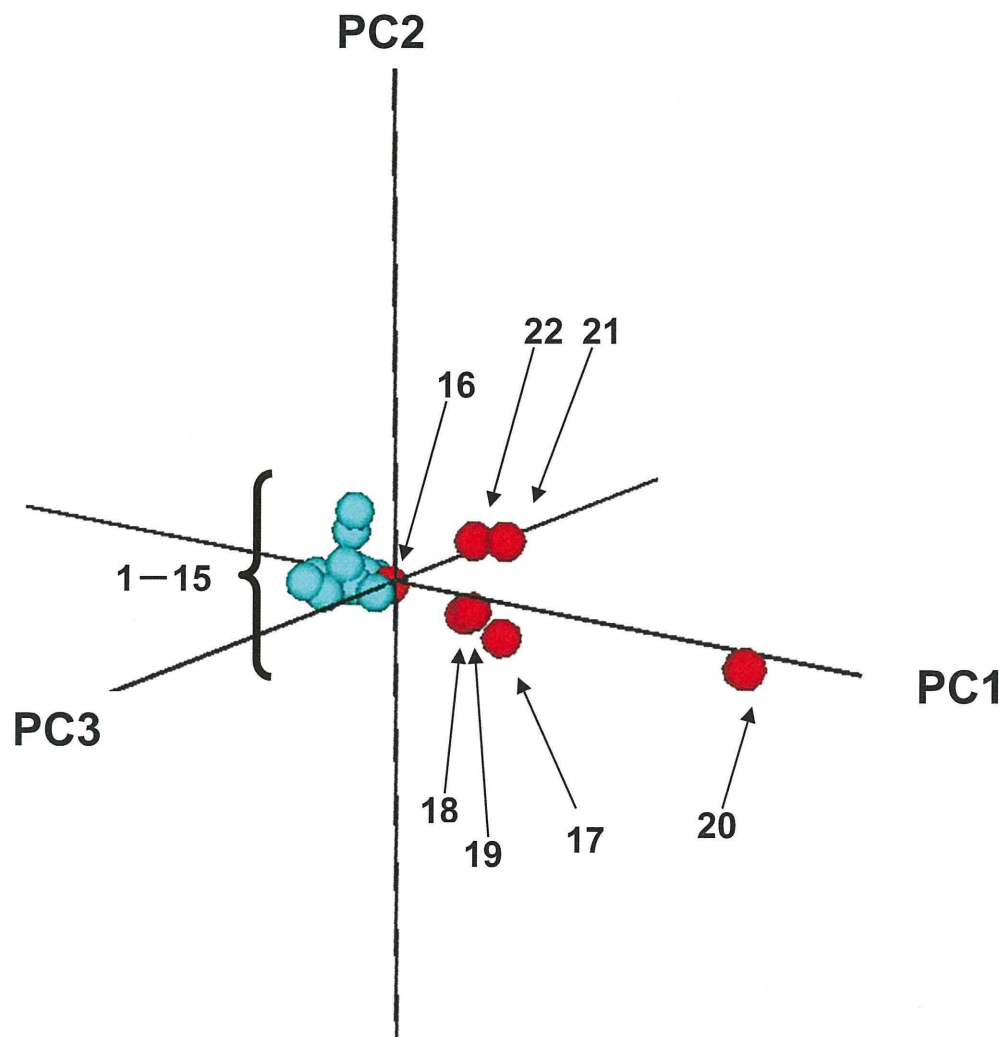


図2 中国産およびベトナム産ケイヒ 22 試料の LC-MS データを主成分分析したスコアプロット。

青丸 中国産; 赤丸 ベトナム産
 図中番号は表 1 の試料番号を示す。

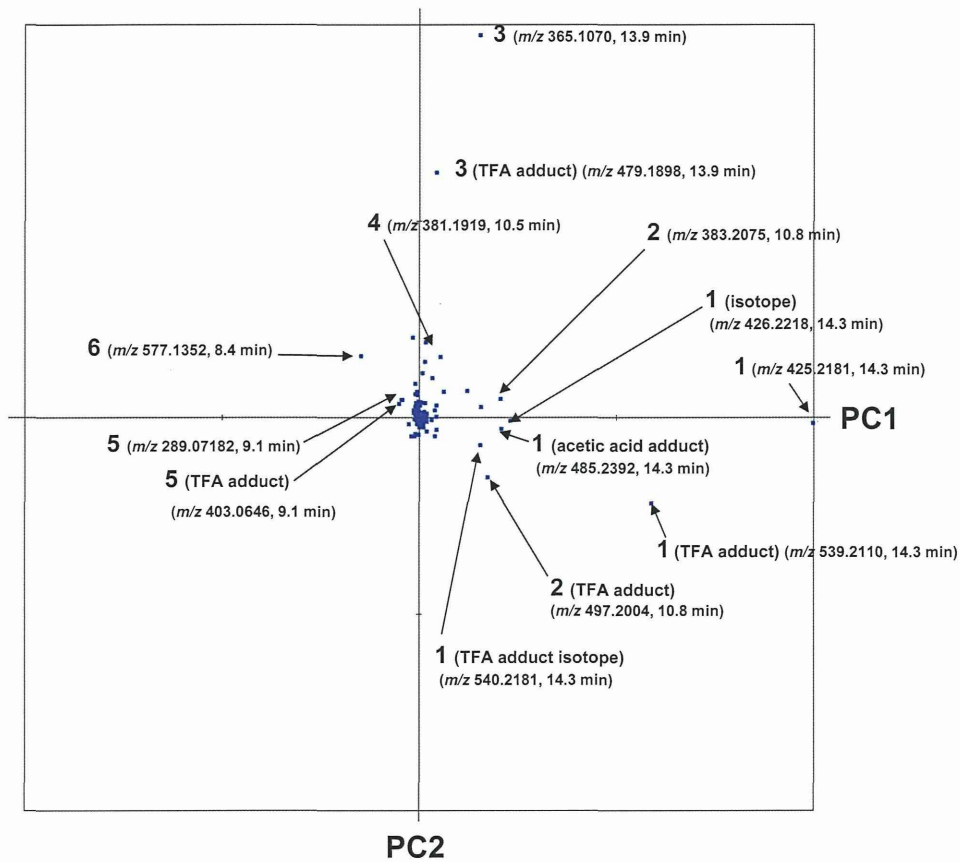


図3 中国産およびベトナム産ケイヒ 22 試料の LC-MS データを主成分分析したローディングプロット. 図中番号は表 1 の図 4 の化合物番号を示す.

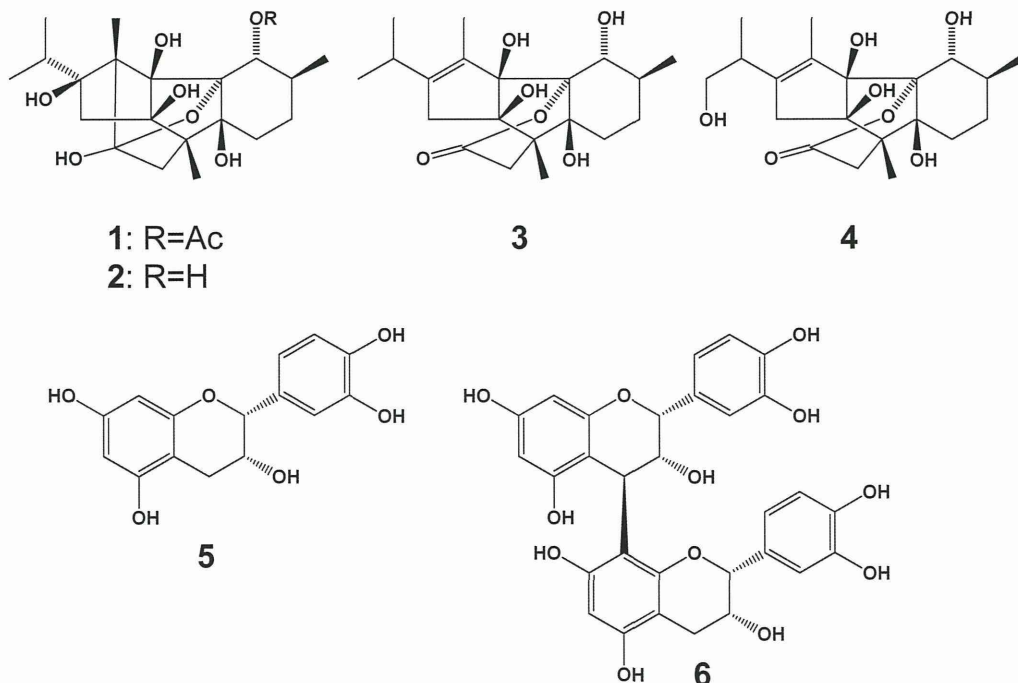


図4 中国産およびベトナム産ケイヒ 22 試料の LC-MS データを主成分分析した結果特定されたマーカー化合物の構造

- 1, cinnzeylanine; 2, cinnzeylanol; 3, anhydrocinnzeylanol; 4, cinncasinol A;
5, epicatechin; 6, procyanidin B2

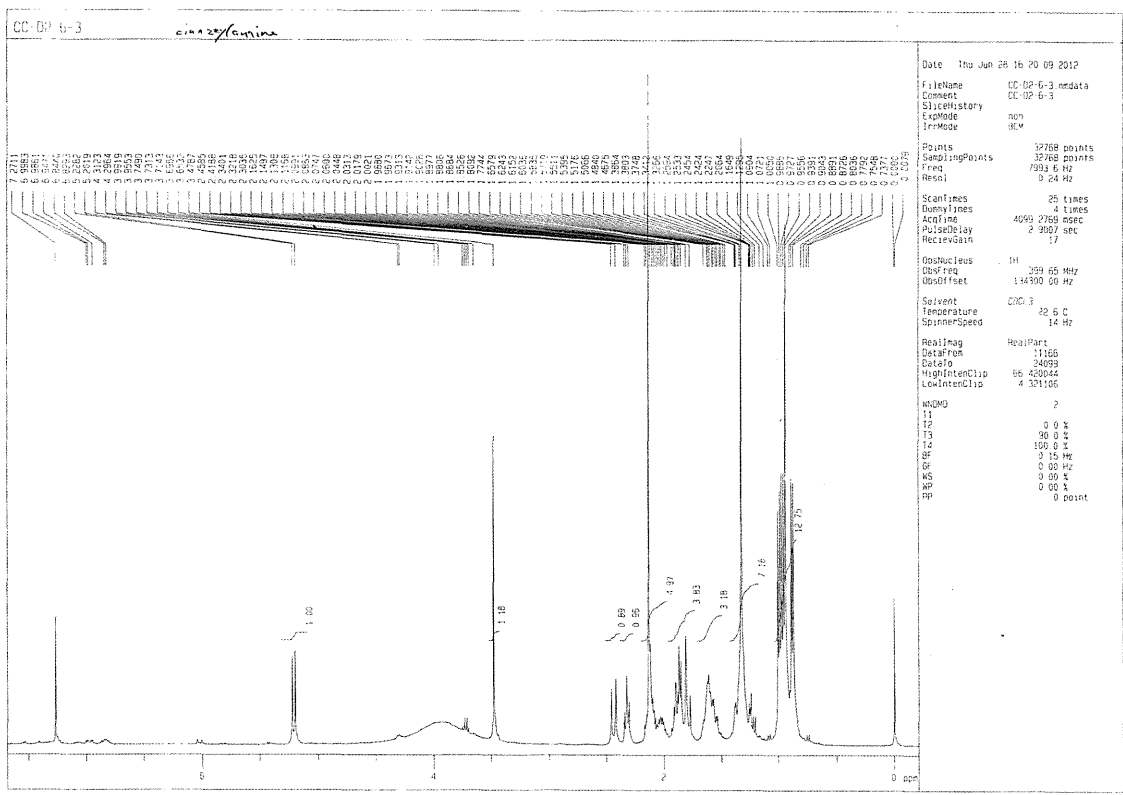


図 5 cinnzeylanine (1)の ¹H-NMR スペクトル

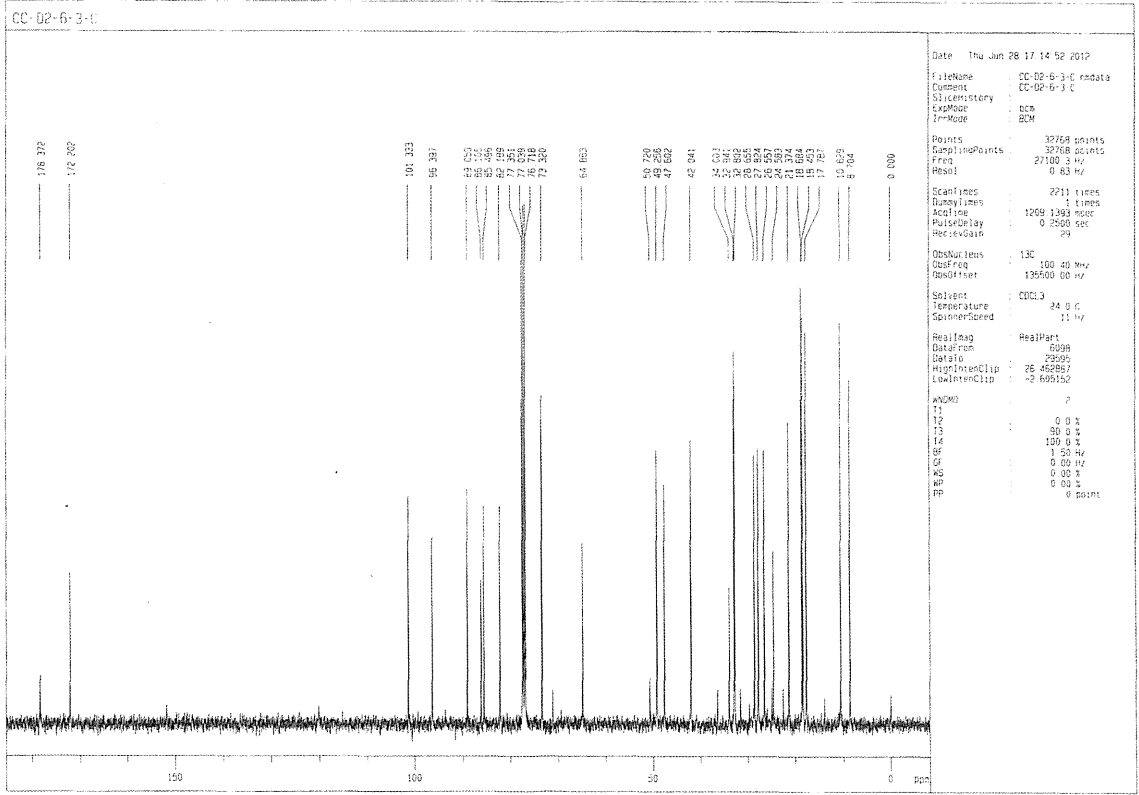


図 6 cinnzeylanine (1)の ¹³C-NMR スペクトル