

表 3. モクツウ モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0252	刻み	日本徳島県		
NIB-0419	刻み	日本徳島県		2011
NIB-0461	刻み	日本		2010
NIB-0640	刻み	日本		2011
NIB-0718	刻	日本徳島県		2011
NIB-0719	刻	日本徳島県		2011
NIB-0720	刻	日本徳島県		2010
NIB-0721	刻	日本徳島県		2010
NIB-0722	刻	日本徳島県		2009
NIB-0723	刻	日本徳島県		2008
NIB-0724	刻	日本徳島県		2006
NIB-0725	刻	日本徳島県		2005
NIB-0726	刻	日本徳島県		2003
NIB-0727	刻	日本徳島県		1997
NIB-0728	刻	日本徳島県		1996
NIB-0754	輪切り	日本		

表 4. サンヤク モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0255	刻み	中国江蘇省		
NIB-0401	原形	中国江蘇省	毛条	2011
NIB-0456	生	中国河南省		2011
NIB-0566	生	中国河南省	毛条	2008
NIB-0567	刻み	中国福建省	ヤマイモ	2003
NIB-0568	生	中国河南省	8 支	2000
NIB-0748	原形	中国河南省		

表 5. チモ モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0259	刻み	中国河北省		
NIB-0410	原形	中国内蒙古自治区	野生	2009
NIB-0411	原形	中国河北省		2011
NIB-0453	生	中国河北省		2004
NIB-0523	生	中国河北省		2011
NIB-0524	生	中国河北省	毛	2011
NIB-0525	生	中国河北省		2010
NIB-0526	生	中国河北省		2010
NIB-0527	生	中国河北省		2009
NIB-0528	生	中国河北省	毛	2006
NIB-0529	生	中国河北省		2005
NIB-0530	生	中国河北省	光 1 級	2005
NIB-0531	生	中国河北省	光 1 級	2003
NIB-0532	生	中国河北省	光 1 級	2002
NIB-0533	生	中国河北省	毛	1995
NIB-0745	原形	中国河北省		

表 6. オンジ モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0260	刻み	中国陝西省		
NIB-0436	原形	中国山西省	中筒	2011
NIB-0488	生	中国陝西省	通	2010
NIB-0489	生	中国陝西省	通	2007
NIB-0490	生	中国陝西省	通	2007
NIB-0491	生	中国陝西省	通	2006
NIB-0492	生	中国陝西省	通	2005
NIB-0493	生	中国陝西省	通	1997
NIB-0742	原形	中国山西省		

表 7. キキョウ モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0258	刻み	中国安徽省		
NIB-0409	原形	中国陕西省	大条	2010
NIB-0455	生	中国陕西省		2011
NIB-0553	生	中国安徽省		2011
NIB-0554	生	中国安徽省		2010
NIB-0555	生	中国遼寧省		2009
NIB-0556	生	中国安徽省		2009
NIB-0557	生	中国安徽省		2008
NIB-0558	生	中国安徽省		2008
NIB-0559	生	中国安徽省		2007
NIB-0560	生	中国安徽省		2007
NIB-0561	生	中国安徽省		2007
NIB-0562	生	中国安徽省		2007
NIB-0563	生	中国安徽省		2007
NIB-0564	生	中国陕西省		2007
NIB-0565	生	中国安徽省		2007
NIB-0635	刻み	中国安徽省		2011
NIB-0747	原形	中国湖北省		

表 8. エンゴサク モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0783	刻	中国浙江省		2011.09
NIB-0784	原形	中国浙江省		
NIB-0785	生	中国浙江省		2011
NIB-0786	刻み	中国浙江省		2013
NIB-0890	原形	中国浙江省	乙級	1987
NIB-0891	原形	中国浙江省		2001.03
NIB-0892	原形	中国浙江省	甲	2003.04
NIB-0982	原形	中国浙江省	乙級	2005.08
NIB-0983	原形	中国浙江省	甲	2006.02
NIB-0984	原形	中国浙江省	甲	2011.12
NIB-0985	原形	中国浙江省	甲	2012.04
NIB-0986	原形	中国浙江省	甲	2013.01
NIB-0987	原形	中国浙江省	甲	2013.03
NIB-0988	原形	中国浙江省	甲	2013.05
NIB-1131	刻み	中国浙江省		2012

表 9. カンキョウ モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-787	生		16126	
NIB-788	原形	中国広西省		
NIB-789	刻み	中国広西壮族自治区		2013.01
NIB-790	原形	中国四川省		1990 年頃
NIB-791	原形	中国広東省	赤肉	1996.05
NIB-792	原形	中国広東省	赤肉	2002.03
NIB-793	原形	中国広東省	赤肉	2002.01
NIB-794	原形	中国四川省	赤肉	2002.12
NIB-795	原形	中国広東省	赤肉	2006.01
NIB-796	原形	中国広東省	赤肉	2009.03
NIB-797	原形	中国広東省	赤肉	2009.11
NIB-798	原形	中国広東省	赤肉	2010.04
NIB-799	原形	中国広東省	赤肉	2011.06
NIB-800	原形	中国広東省	赤肉	2012.08
NIB-801	刻み	中国雲南省		2013
NIB-802	刻	中国広西省	赤肉	2013.01
NIB-1115	刻み	中国広西壮族自治区		2012

表 10. キクカ モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0803	原形	中国湖南省		
NIB-0804	刻み	中国浙江省	K070066-2	
NIB-0805	原形	中国広東省	甘	2010
NIB-0806	原形	中国広東省	甘	2011
NIB-0807	原形	中国広東省	甘	2012
NIB-0808	原形	中国広東省	甘	2013
NIB-0809	原形	中国河南省	漢菊花(野生品)	2013
NIB-0810	刻み	中国浙江省	杭菊花(栽培品)	2013
NIB-0811	全形	中国広東省	甘	2012
NIB-0812	全形	中国浙江省	杭	2012
NIB-1120	刻み	中国安徽省	甘	2012
NIB-1121	刻み	中国山西省	杭	2012

表 11. コウジン モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0862	刻	中国吉林省		2007
NIB-0863	刻	日本長野県		2010
NIB-0864	原形	中国吉林省	主根	
NIB-0865	原形	中国吉林省	支根	
NIB-0866	刻み	中国吉林省		2013
NIB-0867	原形	中国吉林省		2007
NIB-0868	原形	中国吉林省	丁	2008
NIB-0869	刻み	中国吉林省		2011
NIB-0870	刻み	中国吉林省		2012
NIB-0871	原形	中国吉林省	小枝	2013
NIB-0872	原形	中国吉林省		2011
NIB-1118	刻み	中国吉林省		2011

表 12. シンイ モデル試料

管理番号	形態	産地	等級等	入手年
NIB-0916	生	中国	22141	
NIB-0917	全形	中国河南省		2012
NIB-0918	原形	中国河南省		
NIB-0919	全形	中国河南省	K070066-6	
NIB-0920	刻み	中国河南省		2013.02
NIB-0921	生	日本福井県		2011
NIB-0922	生	日本福井県		2011
NIB-0923	生	日本福井県		2011
NIB-0926	原形	中国河南省		1996.03
NIB-0927	原形	中国河南省		1999.12
NIB-0928	原形	中国河南省		2000.08
NIB-0929	原形	中国河南省		2002.06
NIB-0930	原形	中国河南省		2005.07
NIB-0931	原形	中国河南省		2007.05
NIB-0933	原形	中国河南省		2008.11
NIB-0934	原形	中国河南省		2008.01
NIB-0936	原形	中国河南省		2010.12
NIB-0937	原形	中国河南省		2011.07
NIB-0938	刻み	中国河南省		2012

展開溶媒 *n*-ヘキサン/酢酸エチル (2:1)

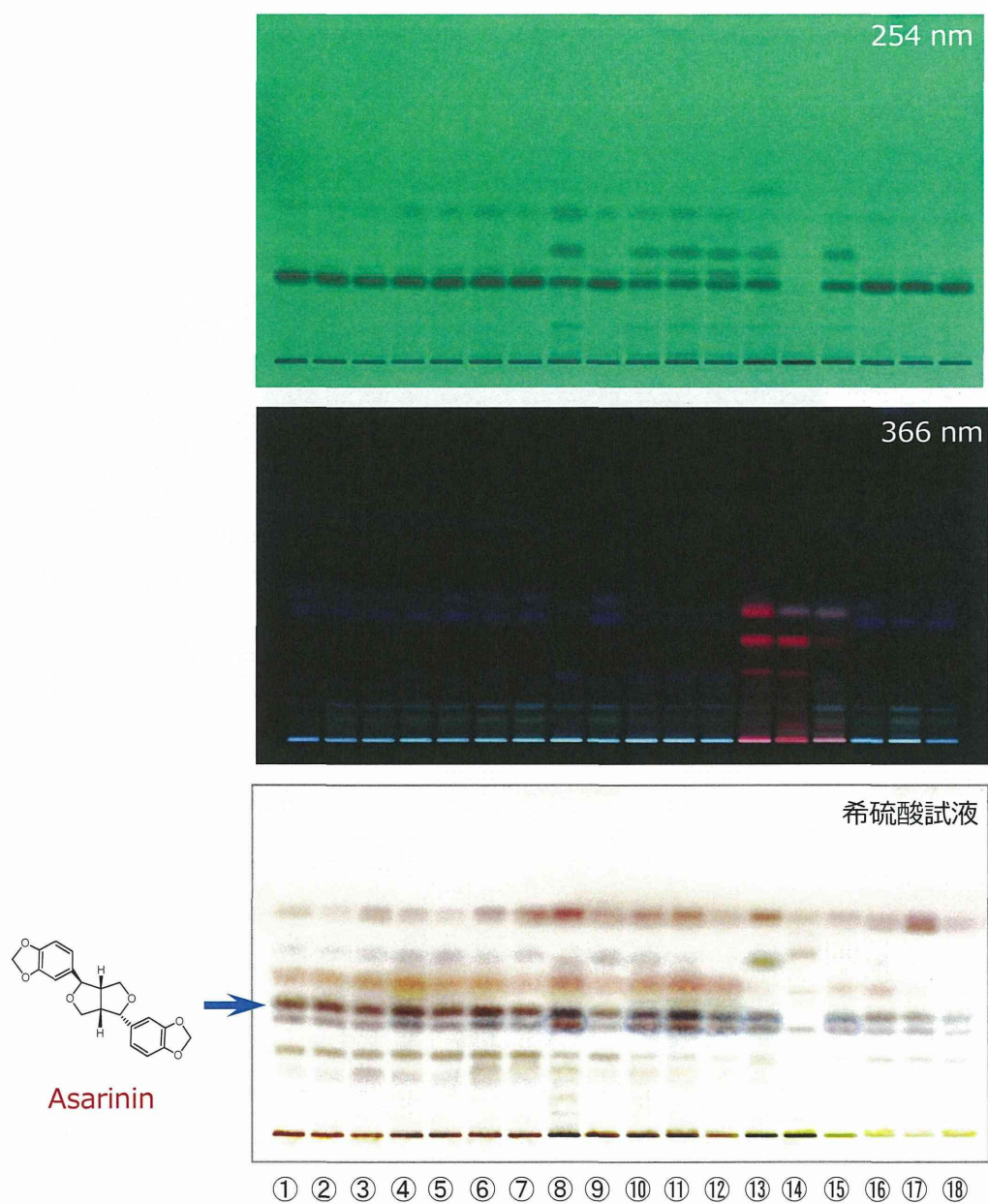


図 1. サイシン試料の HPTLC 分析

- | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ① NIB-273 | ② NIB-304 | ③ NIB-305 | ④ NIB-306 | ⑤ NIB-307 | ⑥ NIB-308 |
| ⑦ NIB-309 | ⑧ NIB-310 | ⑨ NIB-311 | ⑩ NIB-312 | ⑪ NIB-313 | ⑫ NIB-315 |
| ⑬ NIB-318 | ⑭ NIB-319 | ⑮ NIB-320 | ⑯ NIB-424 | ⑰ NIB-441 | ⑱ NIB-733 |

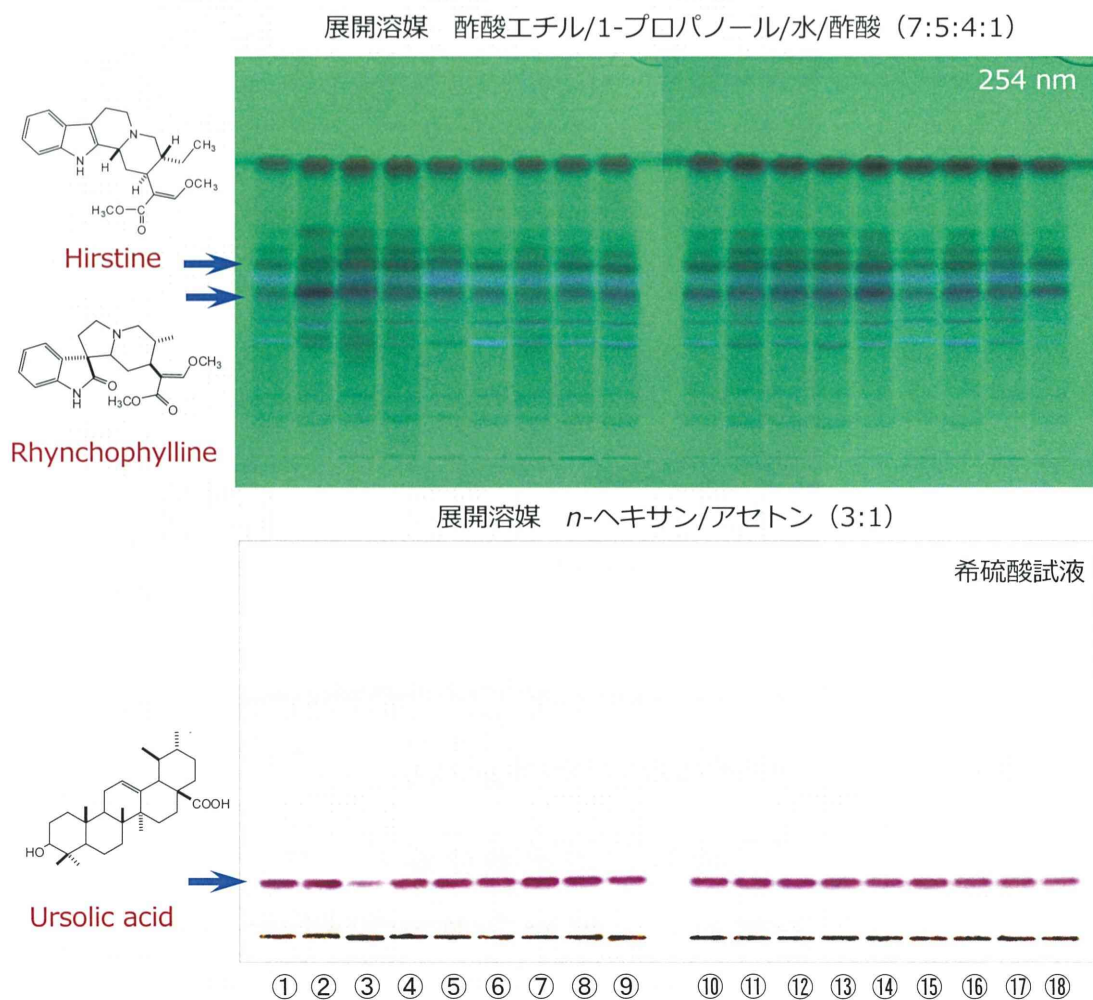


図 2. チョウトウコウ試料の HPTLC 分析

- ① NIB-262 ② NIB-405 ③ NIB-406 ④ NIB-449 ⑤ NIB-463 ⑥ NIB-464
 ⑦ NIB-465 ⑧ NIB-466 ⑨ NIB-467 ⑩ NIB-468 ⑪ NIB-469 ⑫ NIB-470
 ⑬ NIB-471 ⑭ NIB-472 ⑮ NIB-473 ⑯ NIB-474 ⑰ NIB-475 ⑱ NIB-740

展開溶媒 酢酸エチル/1-プロパノール/水/酢酸 (7:5:4:1)

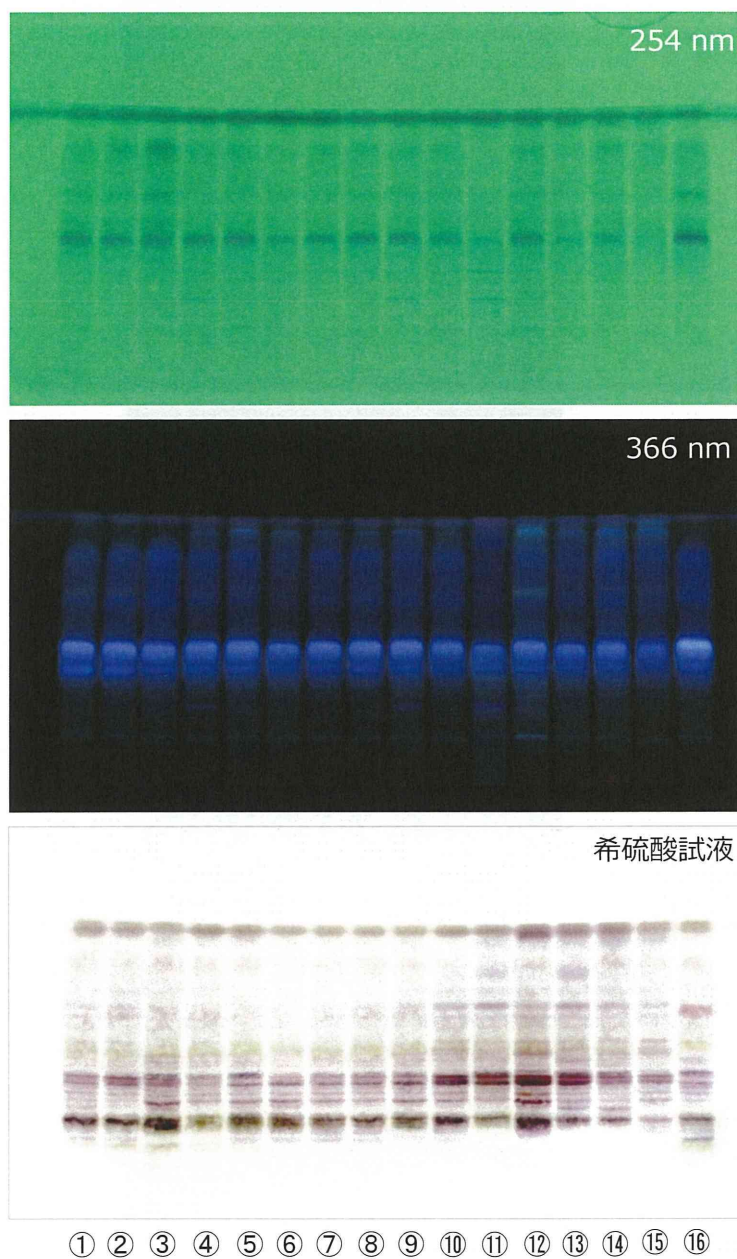


図 3. モクツウ試料の HPTLC 分析

- ① NIB-252 ② NIB-419 ③ NIB-461 ④ NIB-640 ⑤ NIB-718 ⑥ NIB-719
⑦ NIB-720 ⑧ NIB-721 ⑨ NIB-722 ⑩ NIB-723 ⑪ NIB-724 ⑫ NIB-725
⑬ NIB-726 ⑭ NIB-727 ⑮ NIB-728 ⑯ NIB-754

展開溶媒 酢酸エチル/メタノール/水 (7:3:1)



図 4. サンヤク試料の HPTLC 分析

① NIB-255 ② NIB-401 ③ NIB-456 ④ NIB-566 ⑤ NIB-567 ⑥ NIB-568 ⑦ NIB-748

展開溶媒 *n*-ヘキサン/酢酸エチル (2:1)

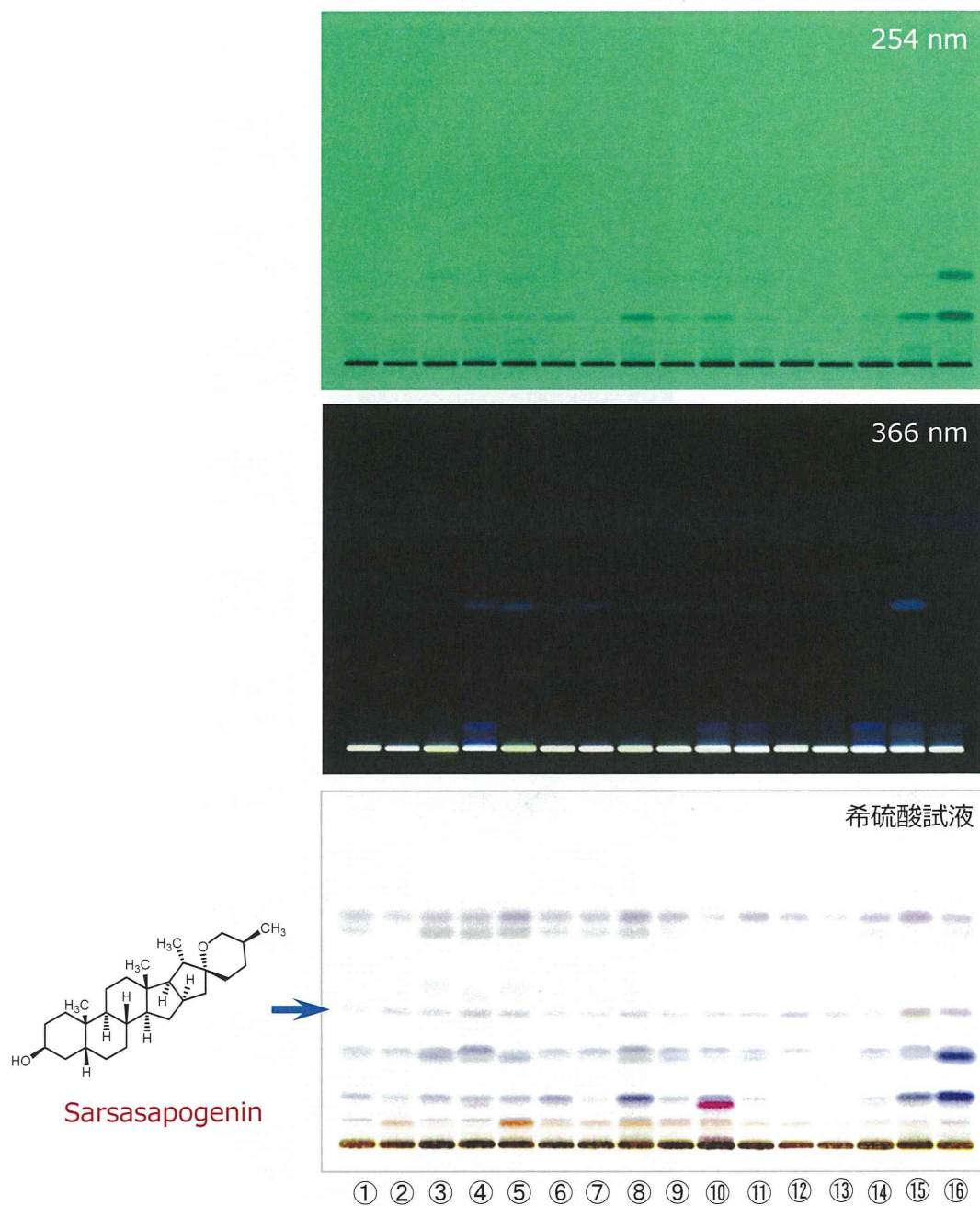


図 5. チモ試料の HPTLC 分析

- ① NIB-259 ② NIB-410 ③ NIB-411 ④ NIB-453 ⑤ NIB-523 ⑥ NIB-524
 ⑦ NIB-525 ⑧ NIB-526 ⑨ NIB-527 ⑩ NIB-528 ⑪ NIB-529 ⑫ NIB-530
 ⑬ NIB-531 ⑭ NIB-532 ⑮ NIB-533 ⑯ NIB-745

展開溶媒 酢酸エチル/メタノール/水 (6:1:1)

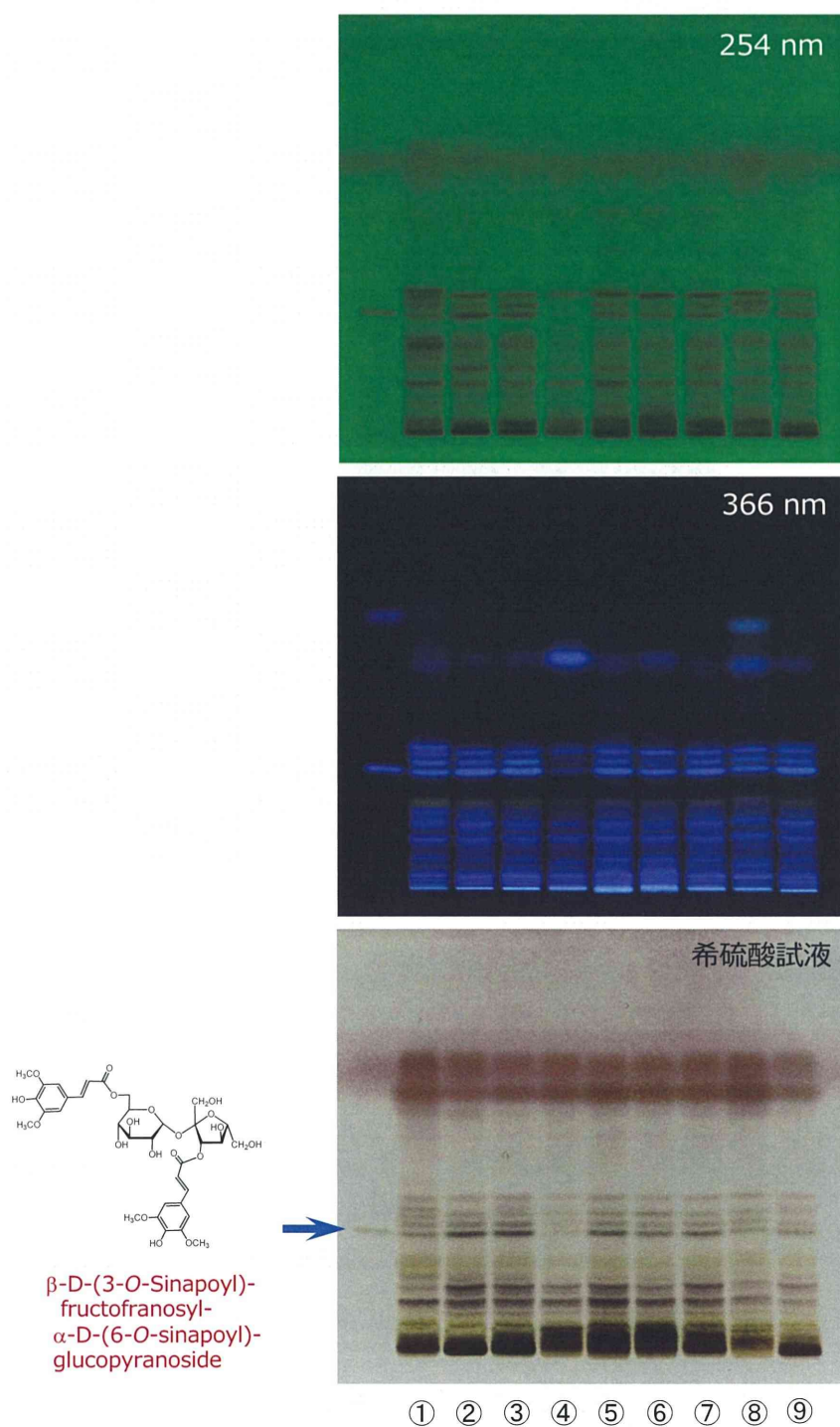


図 6. オンジ試料の HPTLC 分析

- ①NIB-0260 ②NIB-0436 ③NIB-0488 ④NIB-0489 ⑤NIB-0490 ⑥NIB-0491
 ⑦NIB-0492 ⑧NIB-0493 ⑨NIB-0742

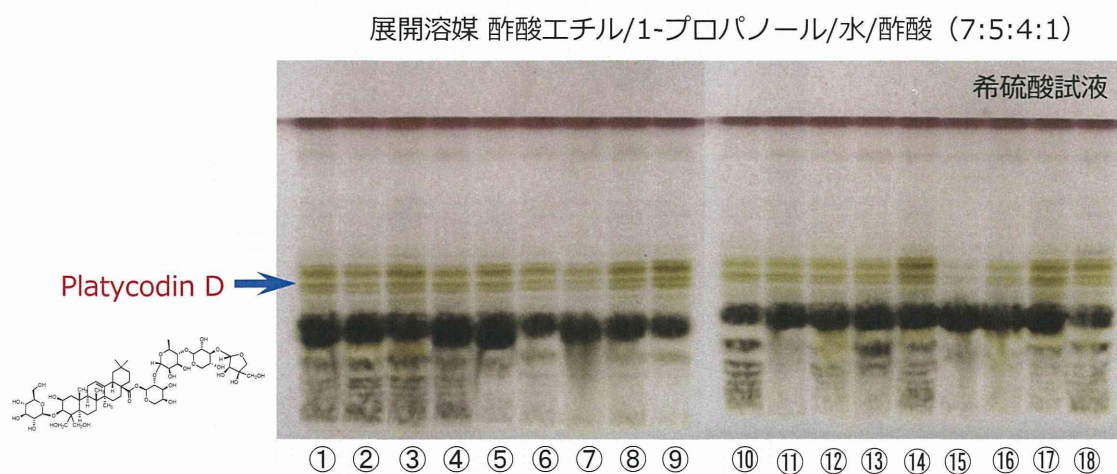


図 7. キキョウ試料の HPTLC 分析

- | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ①NIB-0258 | ②NIB-0409 | ③NIB-0455 | ④NIB-0553 | ⑤NIB-0554 | ⑥NIB-0555 |
| ⑦NIB-0556 | ⑧NIB-0557 | ⑨NIB-0558 | ⑩NIB-0559 | ⑪NIB-0560 | ⑫NIB-0561 |
| ⑬NIB-0562 | ⑭NIB-0563 | ⑮NIB-0564 | ⑯NIB-0565 | ⑰NIB-0635 | ⑱NIB-0747 |

展開溶媒 メタノール/酢酸アンモニウム (3→10) /酢酸 (20:1:1)

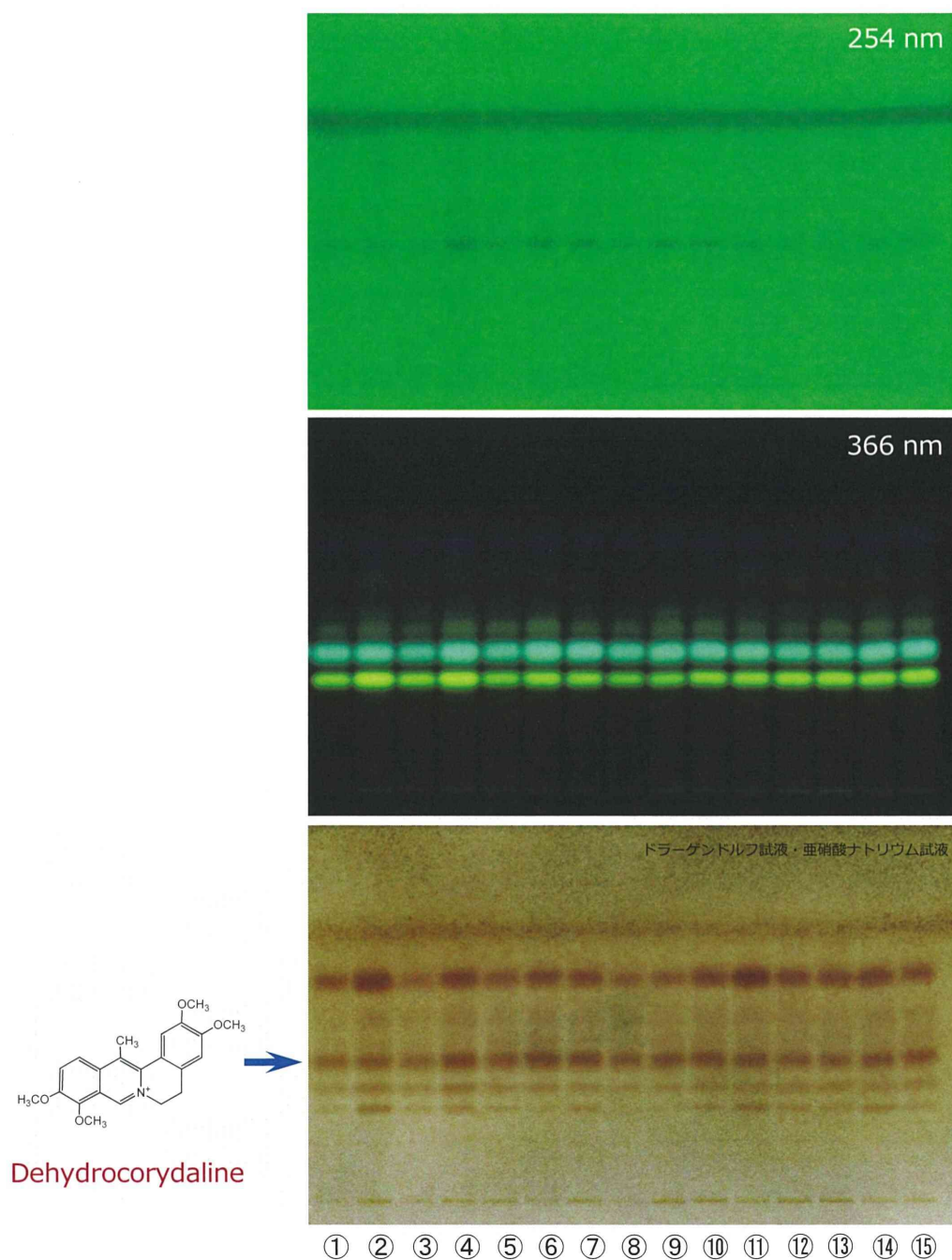


図 8. エンゴサク試料の HPTLC 分析

- ①NIB-0783 ②NIB-0784 ③NIB-0785 ④NIB-0786 ⑤NIB-0890 ⑥NIB-0891
 ⑦NIB-0892 ⑧NIB-0982 ⑨NIB-0983 ⑩NIB-0984 ⑪NIB-0985 ⑫NIB-0986
 ⑬NIB-0987 ⑭NIB-0988 ⑮NIB-1131

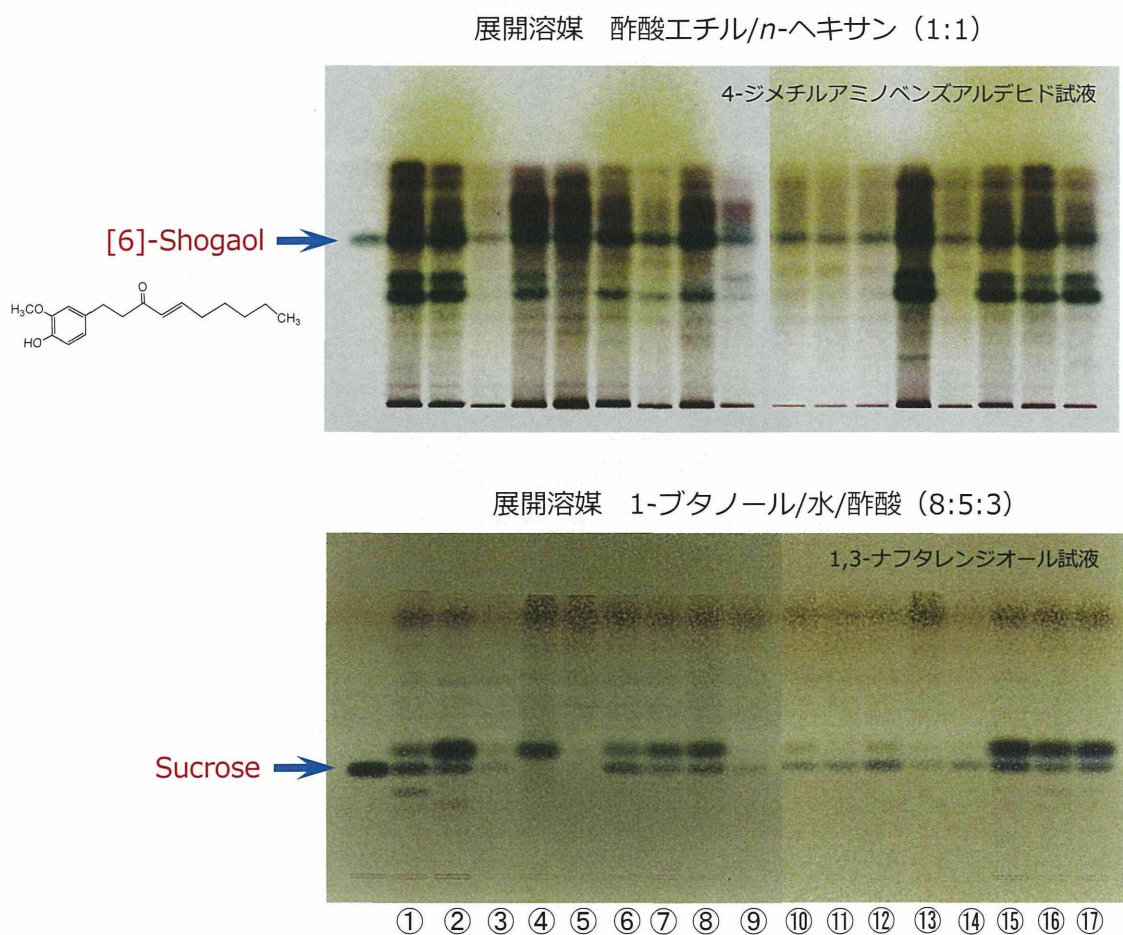


図 9. カンキョウ試料の HPTLC 分析

- | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ① NIB-0787 | ② NIB-0788 | ③ NIB-0789 | ④ NIB-0790 | ⑤ NIB-0791 | ⑥ NIB-0792 |
| ⑦ NIB-0793 | ⑧ NIB-0794 | ⑨ NIB-0795 | ⑩ NIB-0796 | ⑪ NIB-0797 | ⑫ NIB-0798 |
| ⑬ NIB-0799 | ⑭ NIB-0800 | ⑮ NIB-0801 | ⑯ NIB-0802 | ⑰ NIB-1115 | |

展開溶媒 酢酸エチル/2-ブタノン/水/ギ酸 (25:3:1:1)

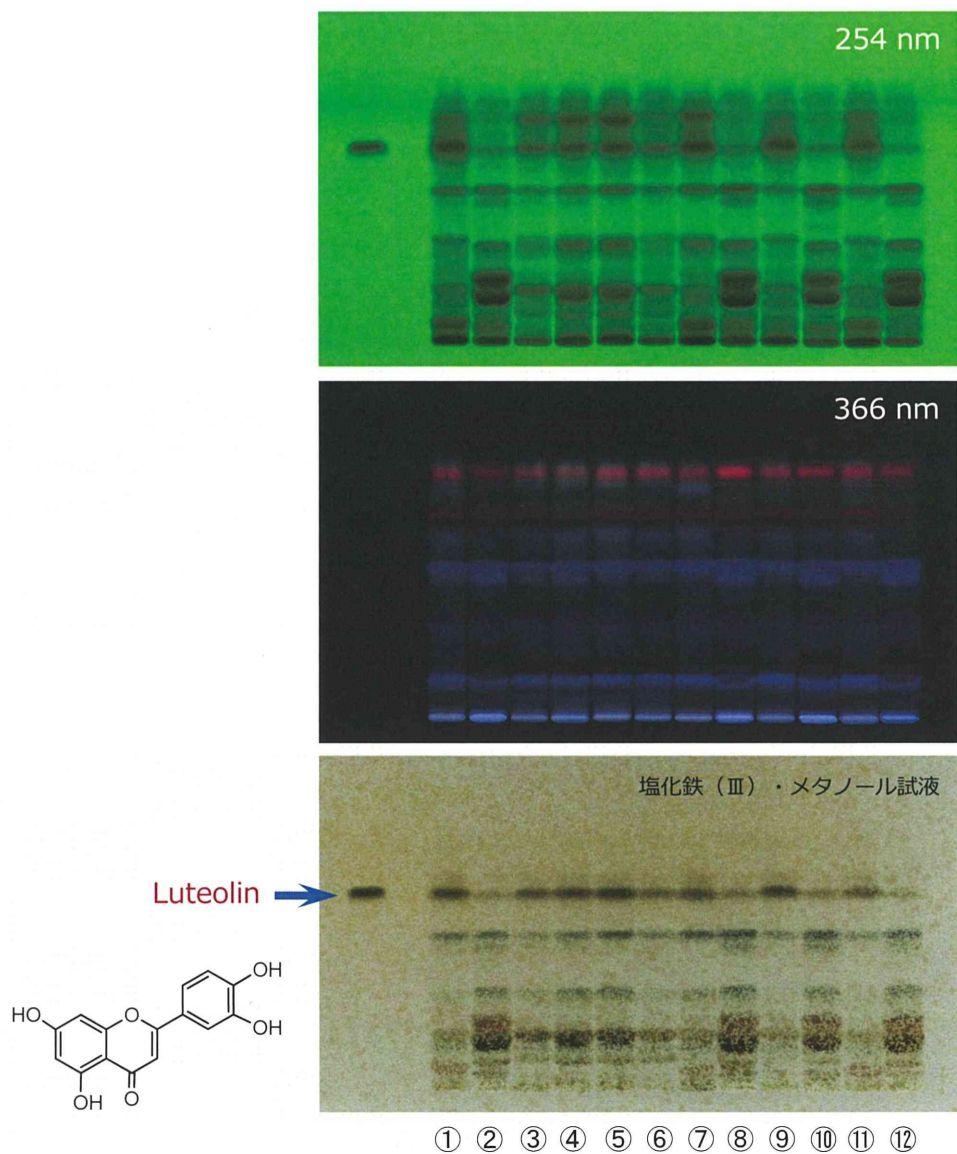


図 10. キクカ試料の HPTLC 分析

①NIB-0803 ②NIB-0804 ③NIB-0805 ④NIB-0806 ⑤NIB-0807 ⑥NIB-0808
⑦NIB-0809 ⑧NIB-0810 ⑨NIB-0811 ⑩NIB-0812 ⑪NIB-1120 ⑫NIB-1121

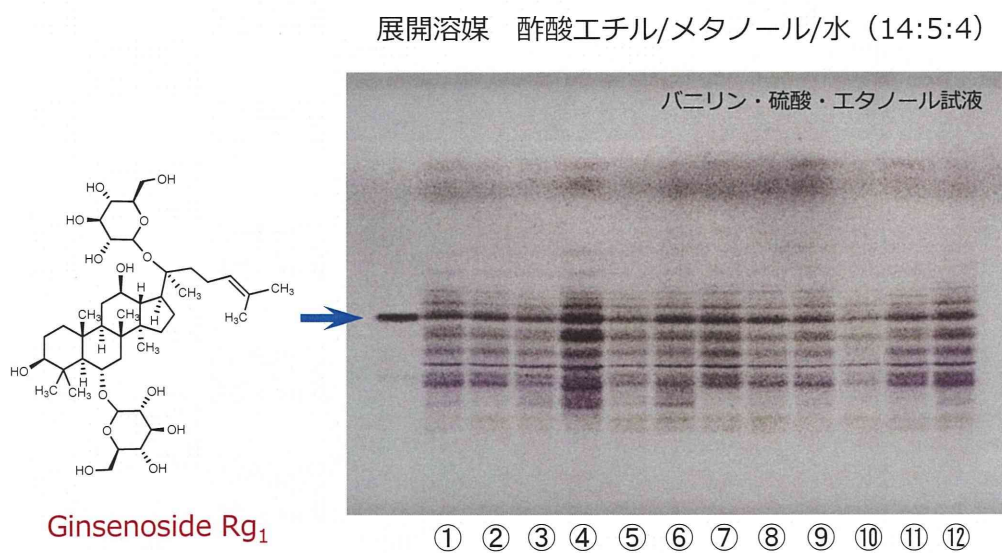


図 11. コウジン試料の HPTLC 分析

①NIB-0862 ②NIB-0863 ③NIB-0864 ④NIB-0865 ⑤NIB-0866 ⑥NIB-0867
⑦NIB-0868 ⑧NIB-0869 ⑨NIB-0870 ⑩NIB-0871 ⑪NIB-0872 ⑫NIB-1118

展開溶媒 酢酸エチル/アセトン/水/ギ酸 (5:3:1:1)

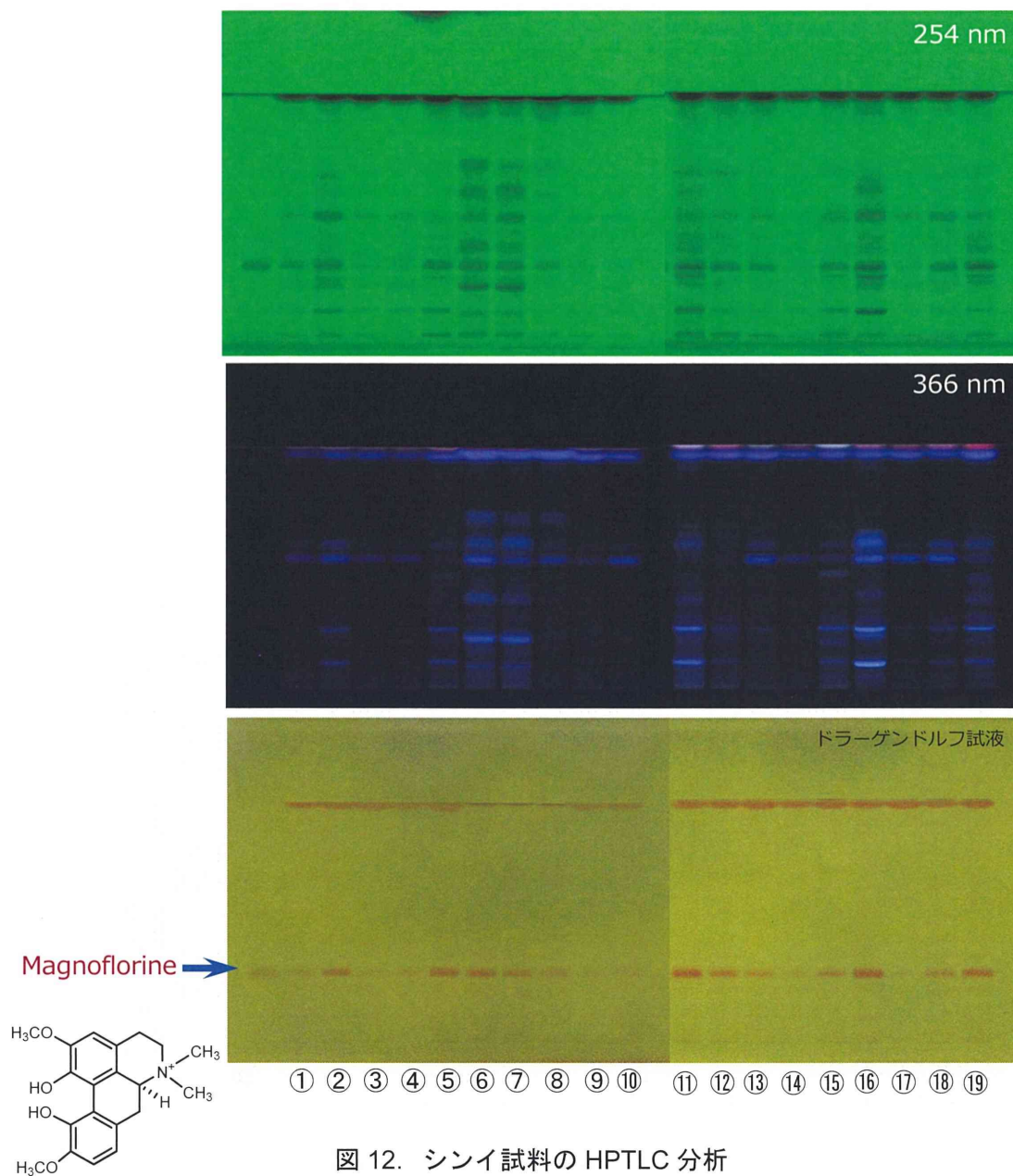


図 12. シンイ試料の HPTLC 分析

- ①NIB-0916 ②NIB-0917 ③NIB-0918 ④NIB-0919 ⑤NIB-0920 ⑥NIB-0921
 ⑦NIB-0922 ⑧NIB-0923 ⑨NIB-0926 ⑩NIB-0927 ⑪NIB-0928 ⑫NIB-0929
 ⑬NIB-0930 ⑭NIB-0931 ⑮NIB-0933 ⑯NIB-0934 ⑰NIB-0936 ⑱NIB-0937
 ⑲NIB-0938

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの
拡充と情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 成分分析データ情報、カテゴリー横断研究及びさく葉標本に関する研究
—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
栽培研究室長

研究協力者 高橋みき子 （独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
技術補助員

蓮沼 タミ （独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

10 品目の国内市場品（イレイセン、エンゴサク、カンキョウ、キジツ、シコン、
コウジン、ケイガイ、ブシ、サンショウ、キクカ）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、キクカ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。キクカについて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。その結果、
Linarin とと思われる化合物が活性化化合物として推定された。

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

今年度は 10 品目の生薬 (イレイセン、エンゴサク、カンキョウ、キジツ、シコン、コウジン、ケイガイ、ブシ、サンショウ、ククカ) について検討を行った。各生薬ごとの平均 NO 産生抑制率 (%) 及び平均細胞生存率 (%) は表に示した。その中ではククカの NO 産生抑制率は 40.1%、エンゴサクが 34.4%、イレイセンが 29.3%、サンショウが 27.8%と比較的強い活性を示した。またロット間の活性の差異が大きな生薬としては、サンショウ、ブシ、キジツ、シコン、ククカであった。

そこで今回はククカについて ESI-orbitrap MS のデータと活性データとの多変量解析を行い、活性化合物の推定を行うこととした。

ククカは 12 種類のロットが収集されており、産地は湖南省、浙江省、広東省、安徽省、山西省、河南省と 6 つの産地のロットが集められている。各産地毎に NO 産生抑制活性を見てみると特に産地ごとに特徴はなく、主成分分析 (PCA) においても明確なグループ分けはできなかった。ククカの細胞生存率はいずれのロットもほぼ 100%以上と毒性は認められなかった。産生抑制率の平均値より強いものを活性の強い

グループ、弱いものを活性の弱いグループに分け、判別分析 (OPLS-DA) を行った。この場合 score plot 上では比較的きれいな分離が行われた。そこで loading s-plot を解析し、活性の発現に寄与していると思われるプロットを解析した。S-plot において、活性に寄与していると推定されるプロットの拡大では、positive mode では保持時間 5.5 分の m/z 285, 593 であった。同保持時間の negative mode においては m/z 637, 591, 445, 283 にピークが見られた。

Positive mode において m/z 447 は 593-146 であることから、593 が $[M+H]^+$ とすると、それから pentose が抜けた値と一致する。さらに 285 は 447-162 であることから、447 の分子からさらに hexose が抜けた値と一致する。このことは negative mode でも同様にみられ、591 $[M-H]^-$ とすると 637 $[M+HCCOH-H]^-$, 445 $[M\text{-pentose-H}]^-$, 283 $[M\text{-pentose-hexose-H}]^-$ と考えられ、positive mode の推定と一致する。さらに精密質量分析の結果、分子式は $C_{28}H_{32}O_{14}$ と考えられ、キクカの成分として報告されている化合物では Linarin (Acasin) が唯一一致する。本化合物は市販されているため、入手後に化合物単体での活性を検証する予定である。

D. 考察

生薬 10 種類について NO 産生抑制活性の検討を行ったが、キクカにおいては比較的強い活性をすべてのロットで示し、多変量解析による結果、活性化合物が Linarin と推定された。この化合物の構造は非糖部は 4'-*O*-methoxyl-5,7-dihydroxyflavone であり、糖部として (6'-*O*-rhamonosyl)glucose=rutinose

が flavone の 7 位に結合した構造であるが、LC/MS のフラグメントからはこの構造を支持した。

E. 結論

10 種類の生薬に関して NO 産生抑制活性の検討を行い、キクカから活性化合物と思われる Linarin を推定したが、今後市販化合物を用いて最終的に化合物の構造を確定し、単体での活性の検証を行っていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroyuki Fuchino, Kana Tanouchi, Akihiro Daikonya, Hiroshi Wada, Osamu Iida, Koji Sugimura, Nobuo Kawahara Relationship between the inhibitory effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on nitric oxide production and the drying conditions after harvest, Jpn. J. Food Chem. Safety 21(1), 8-14 (2014)

2. 学会発表

- 1) 渕野裕之, 高橋みき子, 新井玲子, 川崎武志, 川原信夫: シコン中に含まれるピロリチジナルカロイドについて. 日本生薬学会第 61 回年会 (2014. 9. 13-14, 福岡)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし