

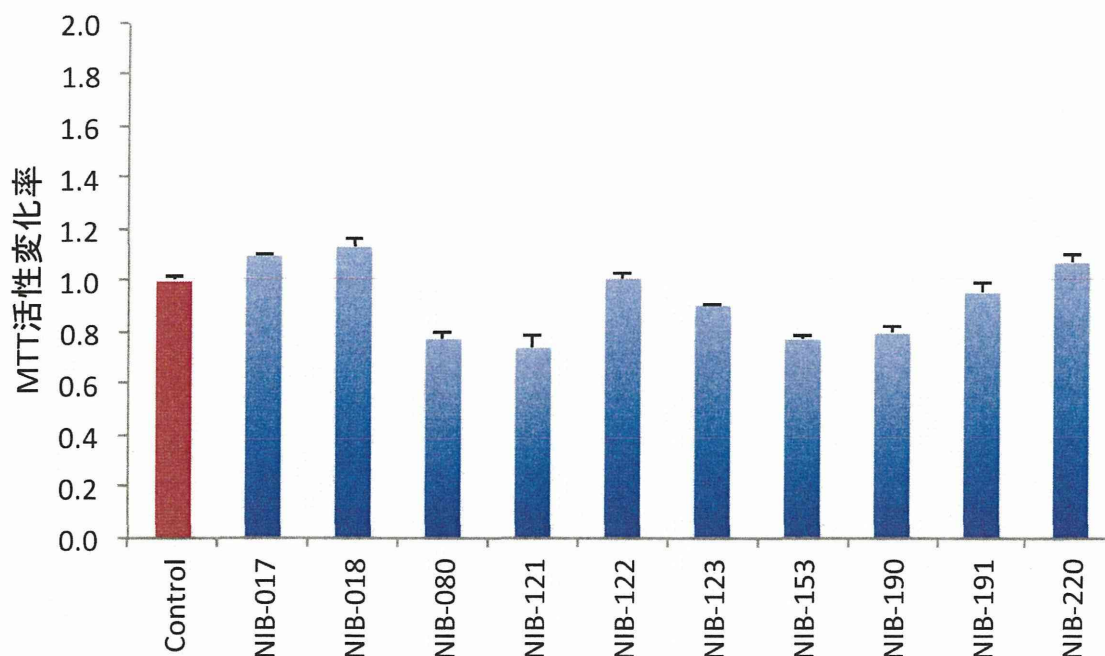


図 13. サイケエクス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ well で播種し、サイコエクス (100 μ g/ml) 添加後48時間培養し、MTT 活性を吸光度 (570 nm / 690 nm) にて測定した。サイコエクスの各ロット処置による MTT 活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群の MTT 活性値を基準とした。

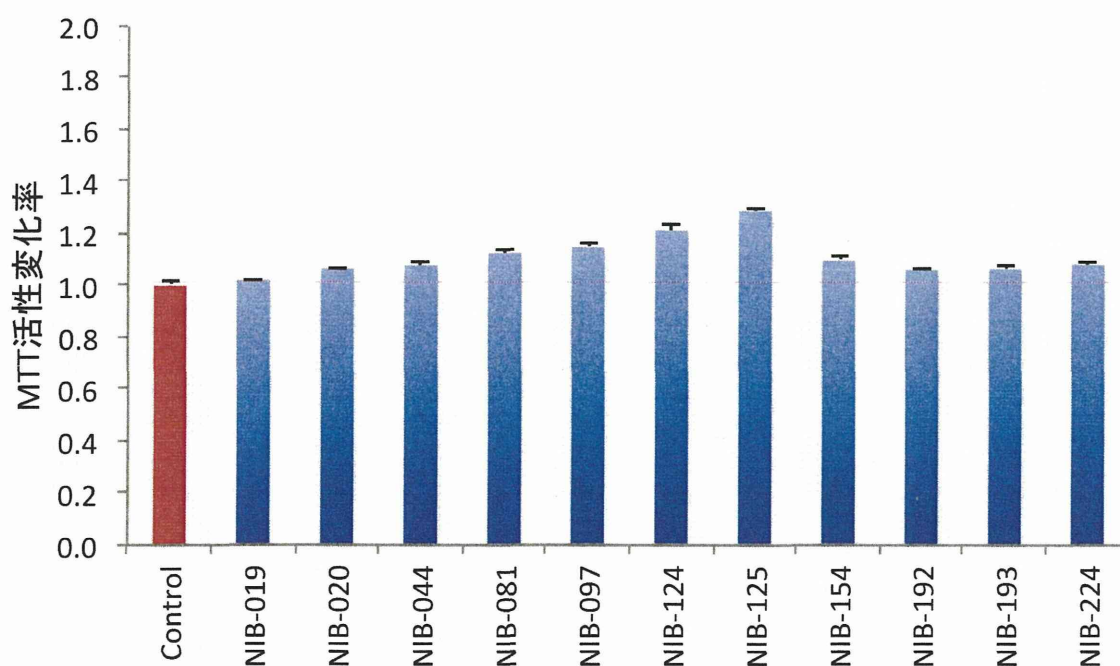


図 14. サンシシエクス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ well で播種し、サンシシエクス (100 μ g/ml) 添加後48時間培養し、MTT 活性を吸光度 (570 nm / 690 nm) にて測定した。サンシシエクスの各ロット処置による MTT 活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群の MTT 活性値を基準とした。

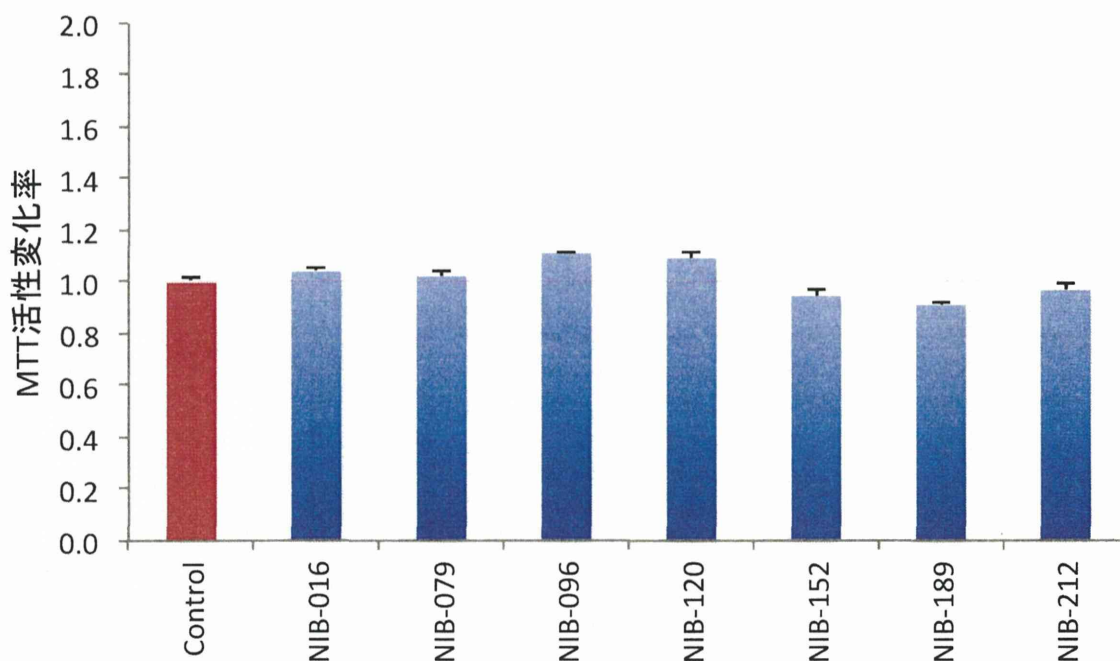


図 15. ゴシツエキス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、ゴシツエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。ゴシツエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

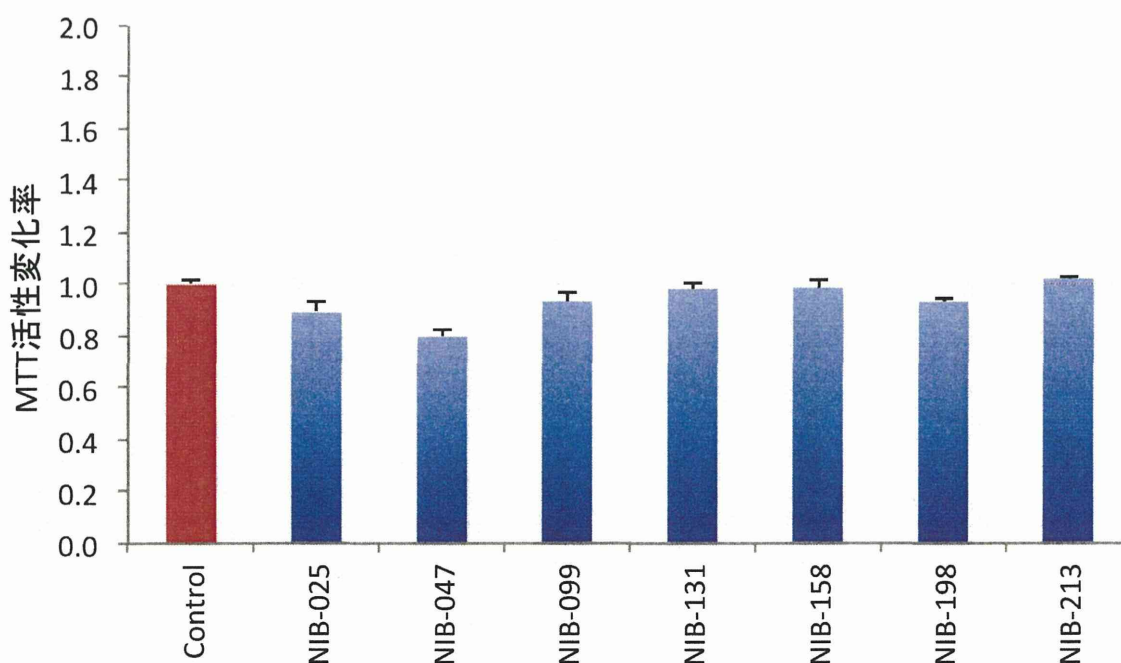


図16. シャゼンシエキス処置によるMTT活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、シャゼンシエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。シャゼンシエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

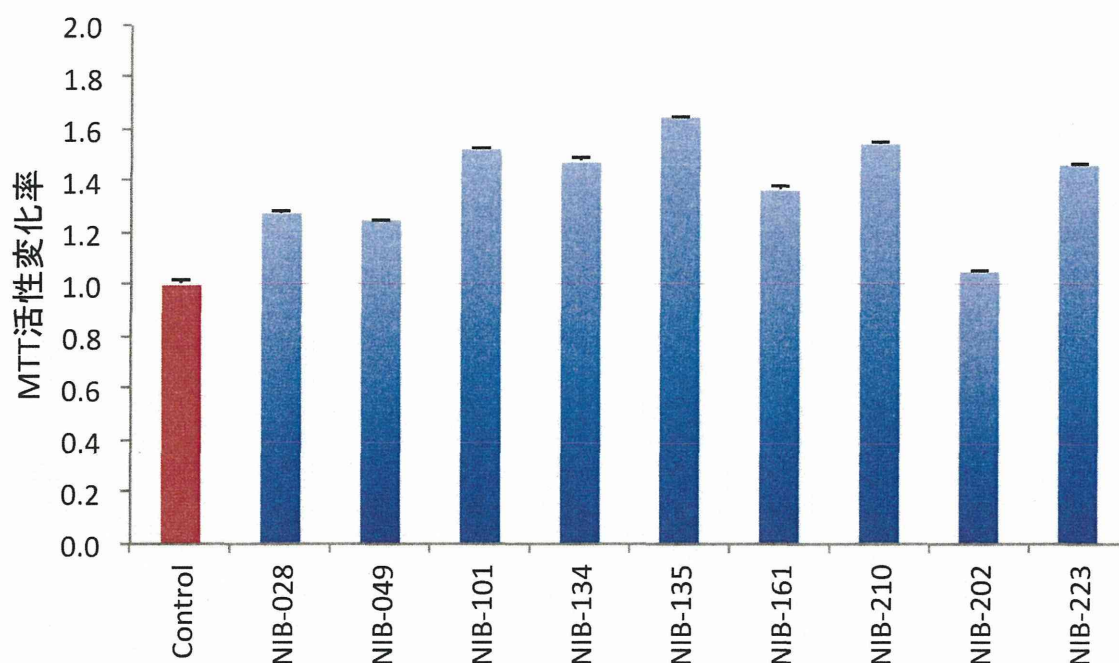


図 17. ダイオウエキス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ well で播種し、ダイオウエキス (100 μ g/ml) 添加後48時間培養し、MTT 活性を吸光度 (570 nm / 690 nm) にて測定した。ダイオウエキスの各ロット処置による MTT 活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群の MTT 活性値を基準とした。

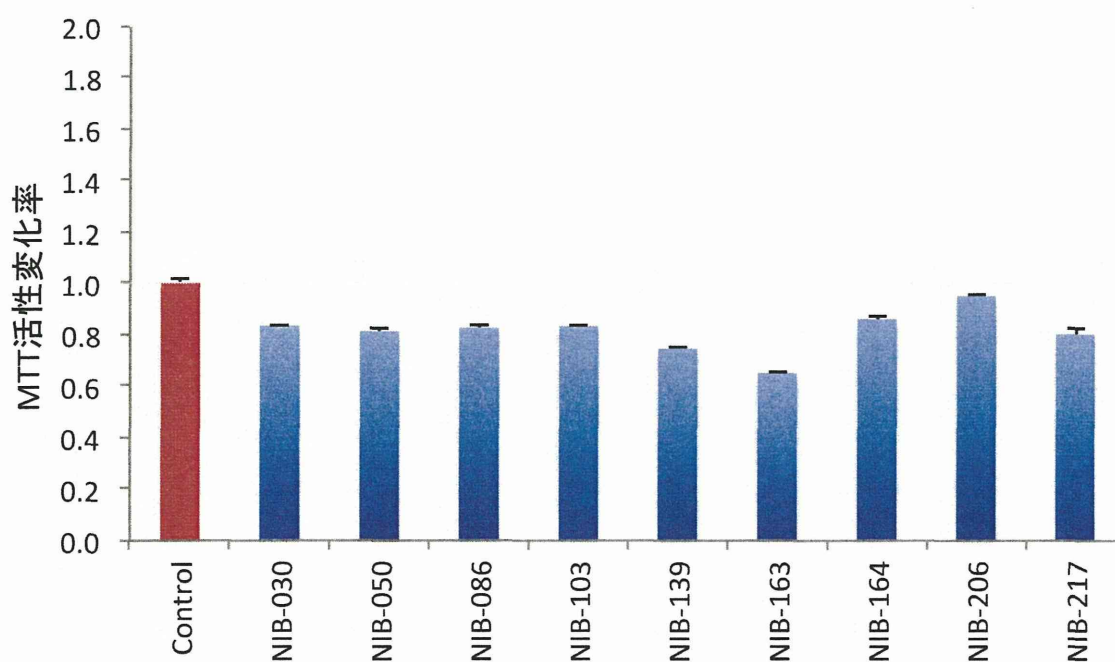


図 18. バクジュツエキス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ well で播種し、バクジュツエキス (100 μ g/ml) 添加後48時間培養し、MTT 活性を吸光度 (570 nm / 690 nm) にて測定した。バクジュツエキスの各ロット処置による MTT 活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群の MTT 活性値を基準とした。

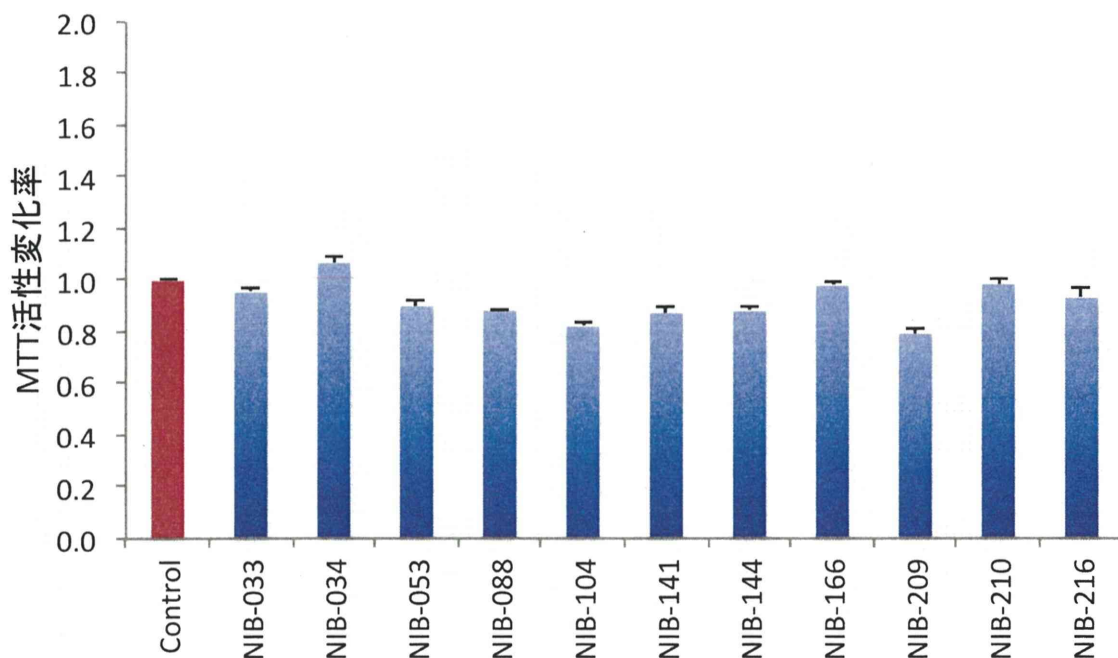


図 19. マオウエキス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、マオウエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。マオウエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

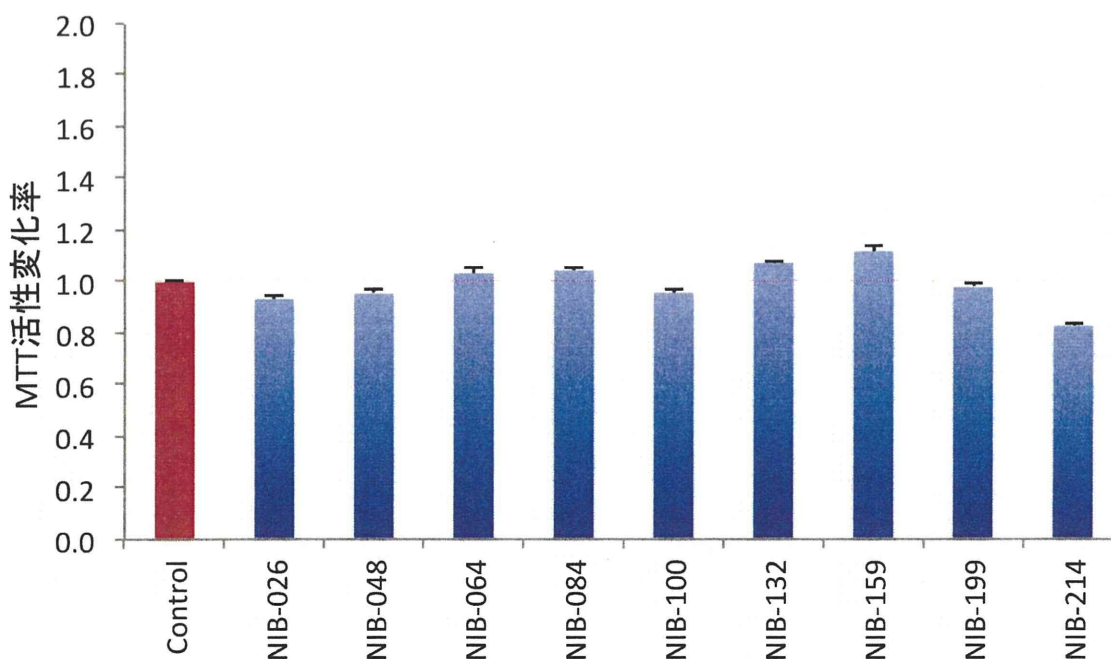


図20. センキュウエキス処置によるMTT活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、センキュウエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。センキュウエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

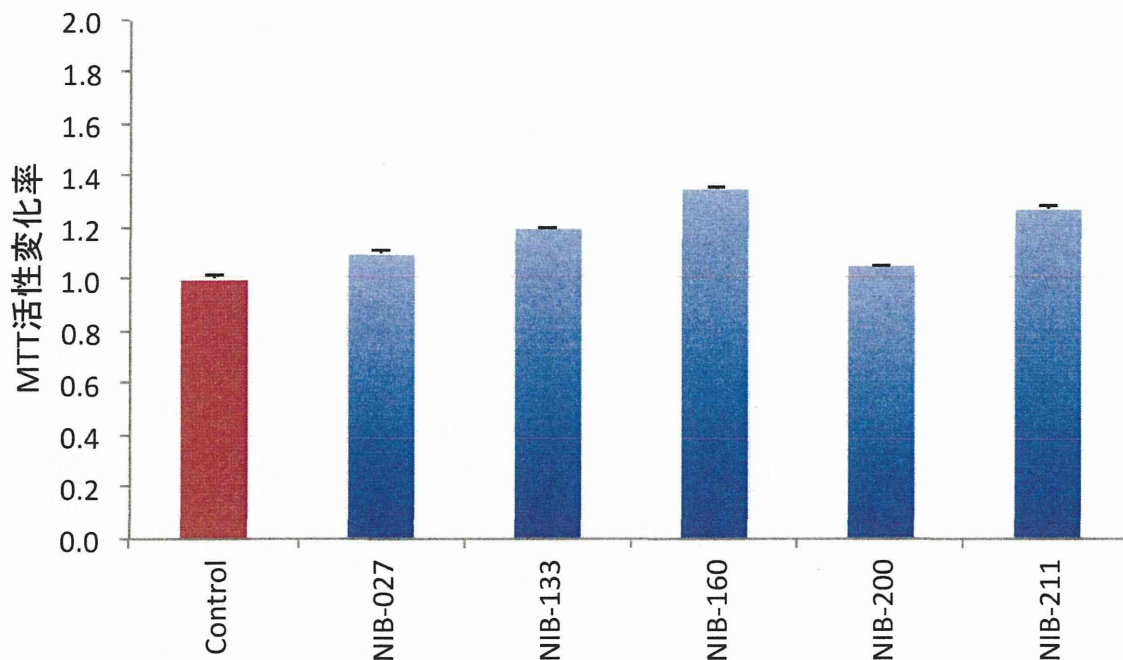


図 21. ソヨウエキス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ well で播種し、ソヨウエキス (100 μ g/ml) 添加後48時間培養し、MTT 活性を吸光度 (570 nm / 690 nm) にて測定した。ソヨウエキスの各ロット処置による MTT 活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群の MTT 活性値を基準とした。

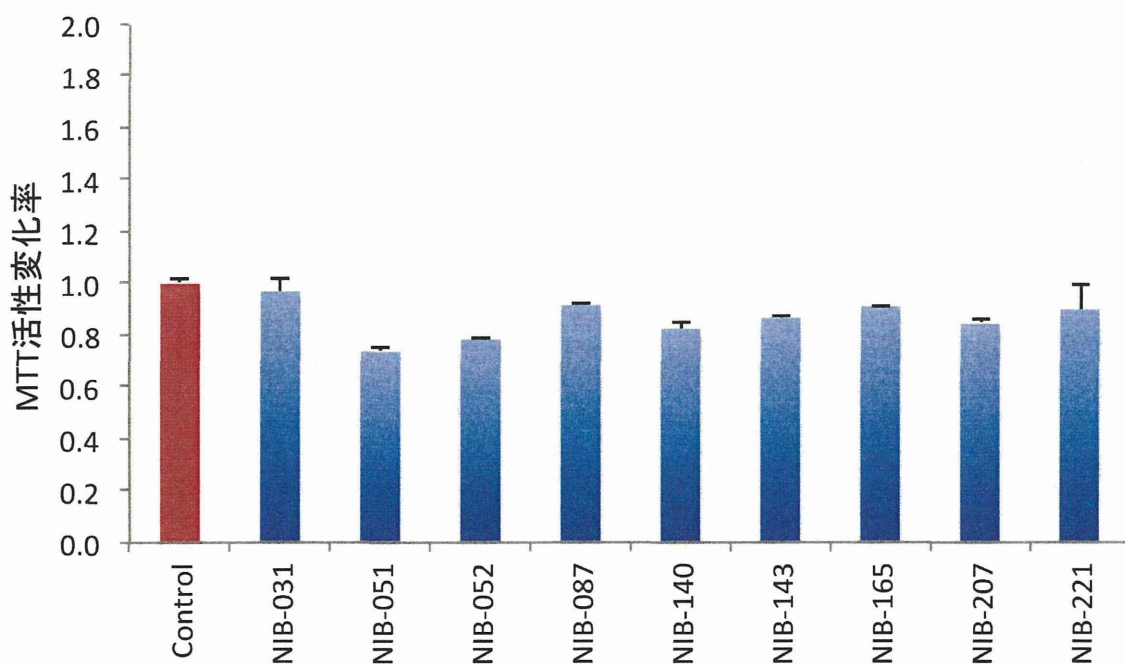


図22. ブクリョウエキス処置によるMTT活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ well で播種し、ブクリョウエキス (100 μ g/ml) 添加後48時間培養し、MTT 活性を吸光度 (570 nm / 690 nm) にて測定した。ブクリョウエキスの各ロット処置による MTT 活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群の MTT 活性値を基準とした。

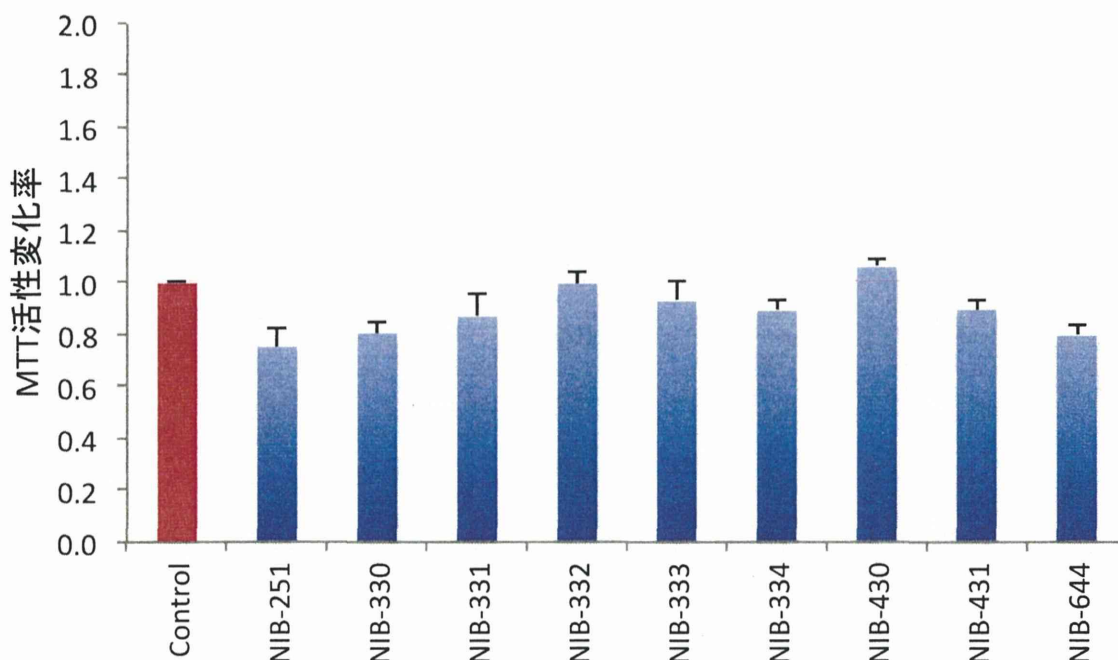


図 23. ハンゲエキス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、ハンゲエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。ハンゲエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

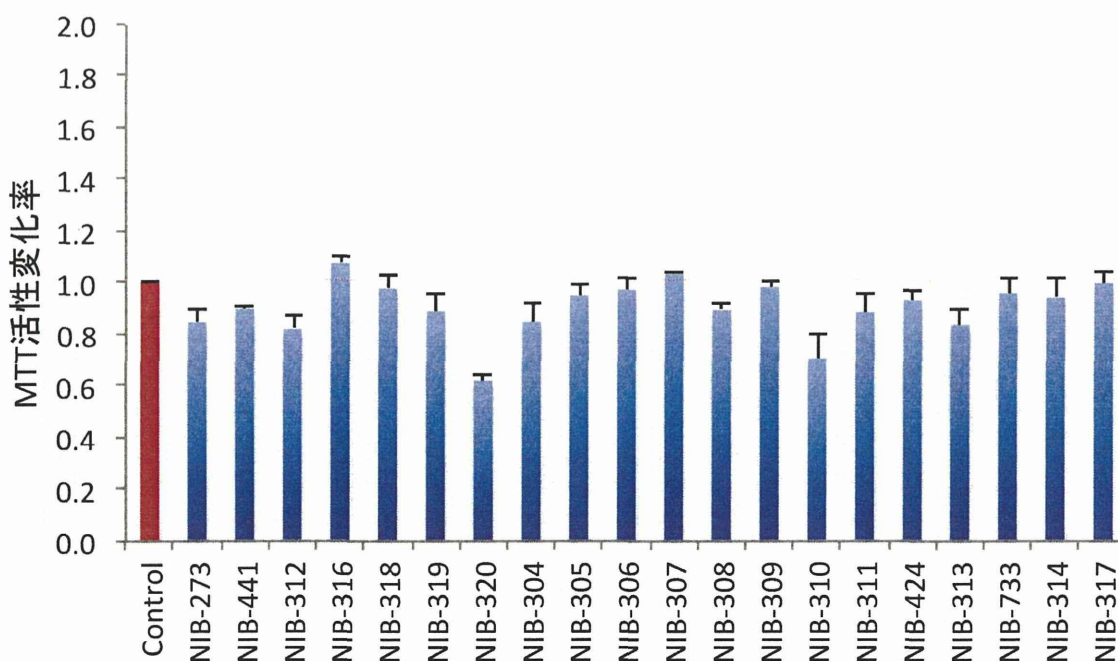


図24. サイシンエキス処置によるMTT活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、サイシンエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。サイシンエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

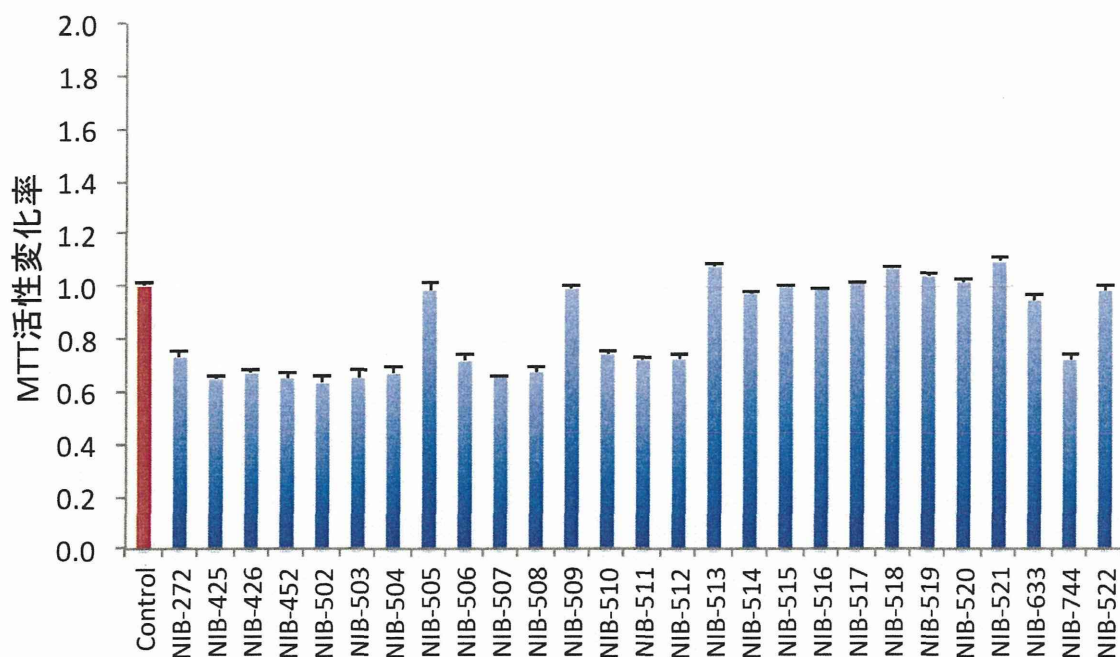


図25. キョウニンエキス処置によるMTT活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、キョウニンエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。キョウニンエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

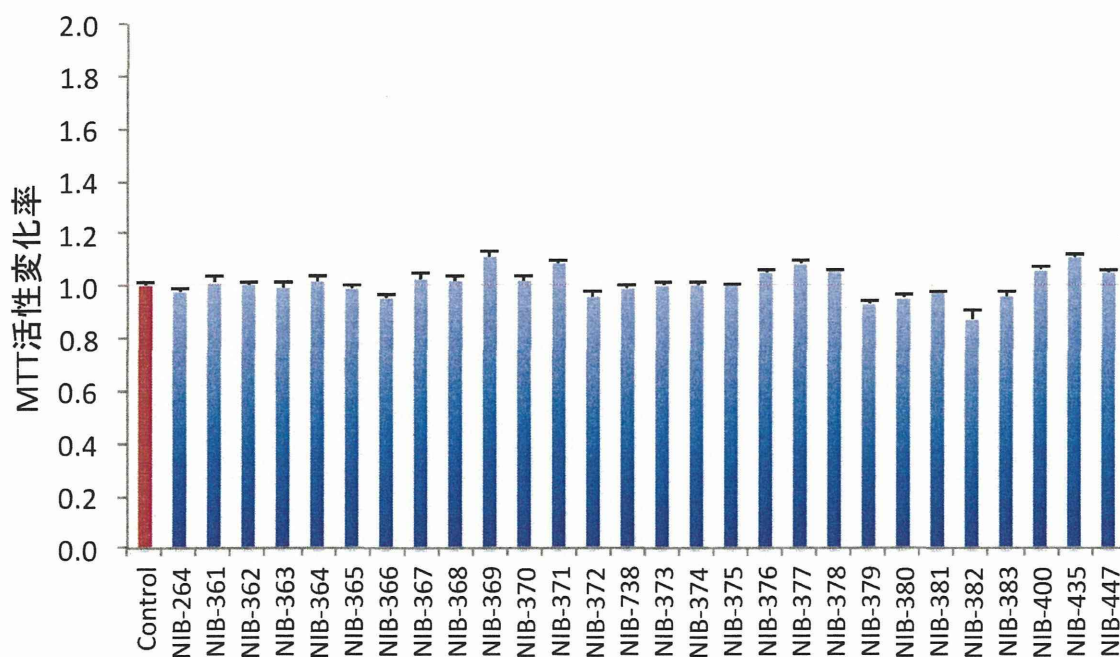


図26. タクシャエキス処置によるMTT活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/ wellで播種し、タクシャエキス（100 μ g/ml）添加後48時間培養し、MTT活性を吸光度（570 nm / 690 nm）にて測定した。タクシャエキスの各ロット処置によるMTT活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群のMTT活性値を基準とした。

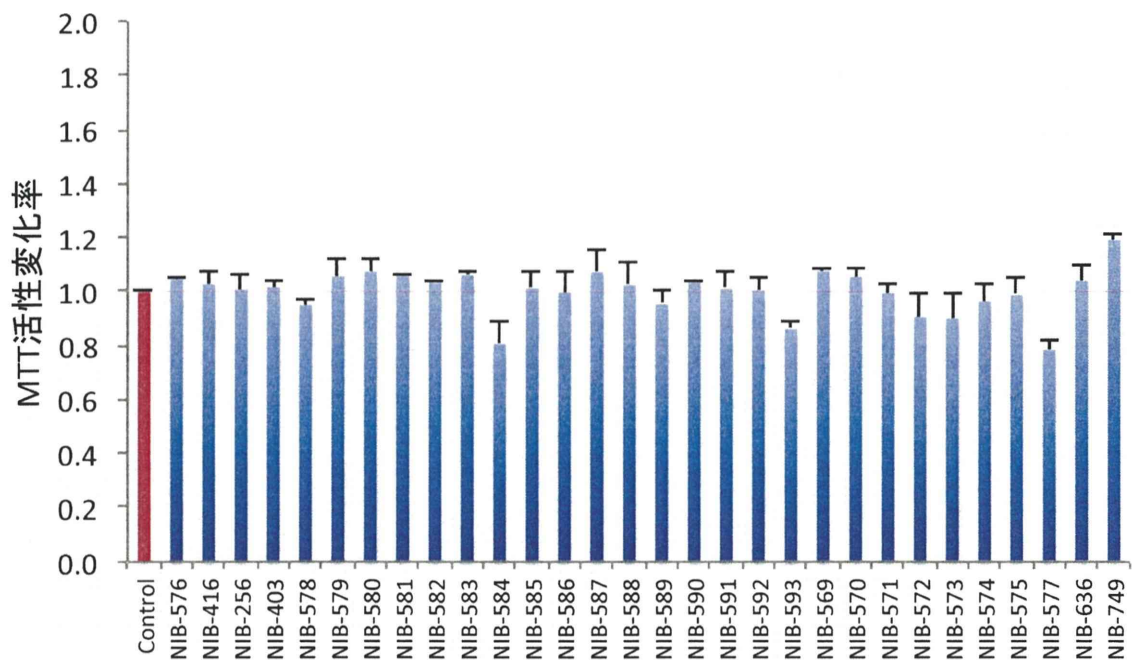


図 27. ボウイエキス処置による MTT 活性の変化

樹状細胞を 1.0×10^5 cell/well で播種し、ボウイエキス (100 μ g/ml) 添加後48時間培養し、MTT 活性を吸光度 (570 nm / 690 nm) にて測定した。ボウイエキスの各ロット処置による MTT 活性の変化率を示す。生薬エキス未処置群の MTT 活性値を基準とした。

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 生物活性情報に関する研究

研究分担者 柴原 直利 富山大学和漢医薬学総合研究所 所長

Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制活性

研究協力者 東田 千尋 富山大学和漢医薬学総合研究所・神経機能学分野 准教授

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に関わる *in vitro* アッセイ系を実施した。Amyloid β 誘発の細胞死を抑制する作用を呈するサンプルがあった生薬は、カンゾウ、ボウイ、ビャクジュツ、ダイオウ、サンシシ、サイコ、トウキ、ニンジン、マオウ、キョウニン、ショウキョウ、ソヨウ、タクシャ、シャクヤク、ソウジュツ、センキュウだった。逆に、細胞死をさらに強める活性がすべてのサンプルに見られたのはオウレンだった。

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に関連する1種の *in vitro* アッセイ系を用いて個々の生薬サンプルにつ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。

今年度は、オウゴン、カンゾウ、ボウイ、オウレン、ブクリョウ、ビャクジュツ、ダイオウ、サンシシ、サイシン、サイコ、トウキ、ニンジン、マオウ、キョウニン、ケ

イヒ、ジオウ、ハング、ゴシツ、ショウキョウ、シャゼンシ、ソヨウ、タクシャ、シャクヤク、ソウジュツ、センキュウの25種について活性を検討した。

2. 実験方法

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、次に HBSS バッファーを 4 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心した。沈殿に培地を 4 ml 加え、先端を炙りなめしたパストゥ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、 2×10^4 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 (50 μ l/well)。その際、10 μ M A β (25-35) 及び生薬エキス (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に、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 50 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、FilterMax F5 マルチプレートリーダー (Molecular Device) を用いて、発光シグナルを測定した。A β (25-35) 無処置細胞での細胞生存率を 100% として表示した。

C. 研究結果

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 30% が死滅した。オウレンではすべてのサンプルで非常に強い細胞毒性が見られ、A β (25-35) 処置単独によるよりもはるかに多くの神経細胞死が認められた (Fig. 4)。この他、サンプルの中で細胞死を増強するものがあつた生薬は、オウゴン (NIB-001, NIB-174) (Fig. 1)、ビャクジュツ (NIB-030) (Fig. 6)、サンシシ (NIB-044) (Fig. 8)、サイコ (NIB-153, NIB-190, NIB-191) (Fig. 10)、キョウニン (NIB-512) (Fig. 14)、シャゼンシ (NIB-025) (Fig. 20) だった。

10 μ M A β (25-35) 処置による細胞死を 100% とした場合、50% 以上の回復を示したサンプルを上げると、カンゾウ (NIB-003, NIB-005, NIB-007, NIB-038, NIB-107, NIB-108, NIB-109, NIB-146, NIB-168) (Fig. 2)、ボウイ (NIB-582, NIB-584, NIB-587, NIB-575) (Fig. 3)、ビャクジュツ (NIB-050, NIB-163, NIB-206, NIB-217) (Fig. 6)、ダイオウ (NIB-049, NIB-101, NIB-134, NIB-135, NIB-161, NIB-210, NIB-202, NIB-223) (Fig. 7)、サンシシ (NIB-019, NIB-224) (Fig. 8)、サイシン (NIB-318) (Fig. 9)、サイコ (NIB-122)、トウキ (NIB-066, NIB-102, NIB-136, NIB-137, NIB-138, NIB-162, NIB-173, NIB-204, NIB-218) (Fig. 11)、ニンジン (NIB-011, NIB-012, NIB-040, NIB-056, NIB-061, NIB-067, NIB-077, NIB-093, NIB-112, NIB-113) (Fig. 12)、マオウ (NIB-141, NIB-144, NIB-166, NIB-209,

NIB-210) (Fig. 13)、キョウニン (NIB-426) (Fig. 14)、ショウキョウ (NIB-147) (Fig. 19)、ソヨウ (NIB-133, NIB-160, NIB-200, NIB-211) (Fig. 21)、タクシャ (NIB-364, NIB-383) (Fig. 22)、シャクヤク (NIB-063, NIB-128) (Fig. 23)、ソウジュツ (NIB-009, NIB-148, NIB-182) (Fig. 24)、センキュウ (NIB-026, NIB-048, NIB-064, NIB-084, NIB-100, NIB-132, NIB-159, NIB-199, NIB-214) (Fig. 25) となった。

D. 考察

サンプルが異なっても、細胞死を強める活性が顕著に認められたのはオウレンだった。ブクリョウ、ケイヒ、ハンゲ、ゴシツはどのサンプルにも作用が見られなかった。他の生薬では、サンプル間で活性に差が見られ、 $A\beta$ (25-35)が誘発する神経細胞死を抑制する活性と成分との間に何らかの関係性が見られるかどうかに興味を持たれる。

E. 結論

今年度の検討では、Amyloid β 誘発の細胞死を抑制する作用を呈するサンプルがあった生薬は、カンゾウ、ボウイ、ビャクジュツ、ダイオウ、サンシシ、サイコ、トウキ、ニンジン、マオウ、キョウニン、ショウキョウ、ソヨウ、タクシャ、シャクヤク、ソウジュツ、センキュウだった。

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

神経細胞死抑制作用　—黄芩(オウゴン)—

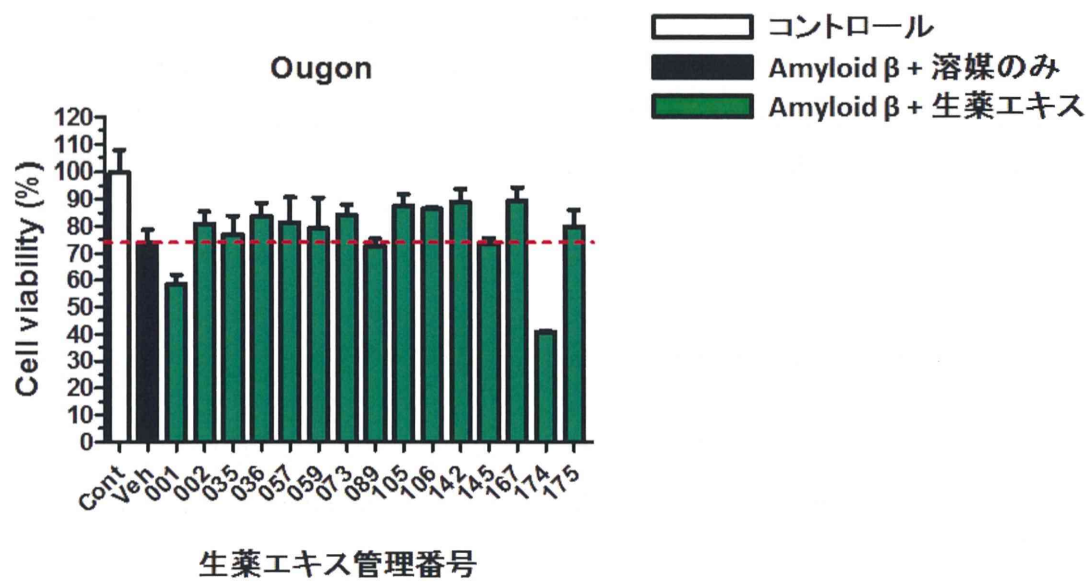


Fig. 1

神経細胞死抑制作用　—甘草(カンゾウ)—

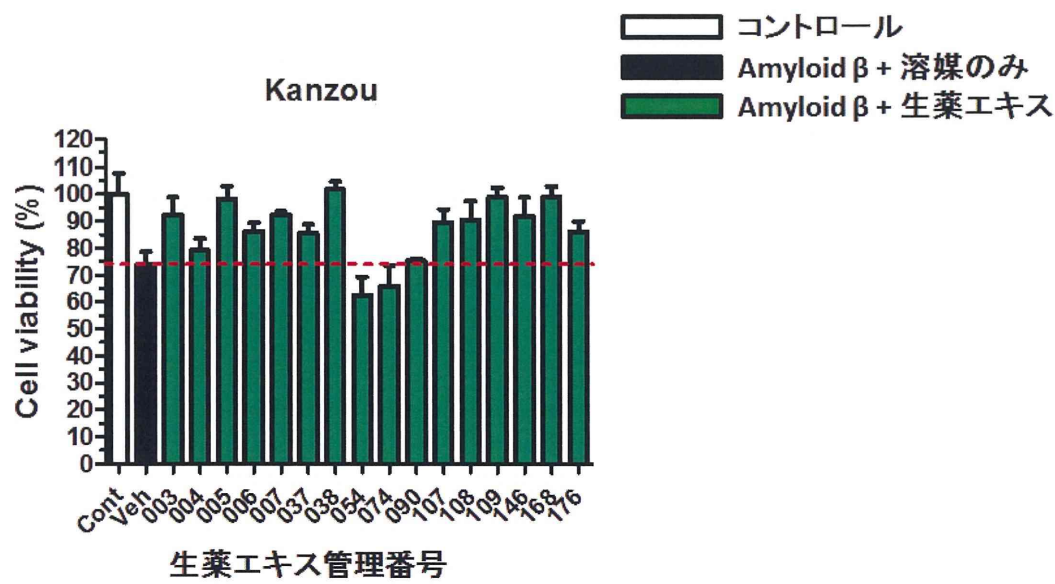


Fig. 2

神経細胞死抑制作用　一防已(ボウイ)一

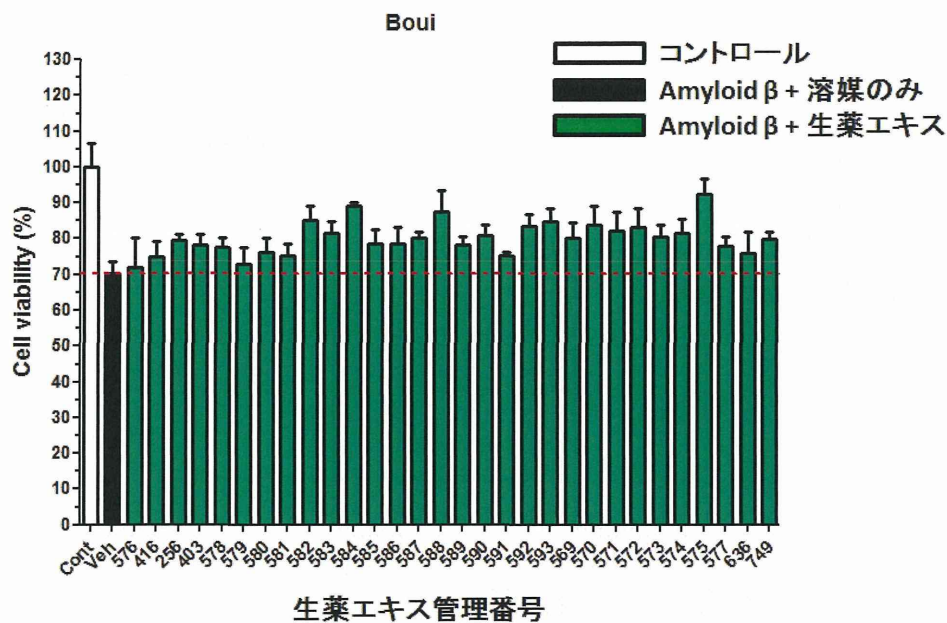


Fig. 3

神経細胞死抑制作用　一黄連(オウレン)一

全てのオウレンエキスは神経細胞に対して強い毒性を示した

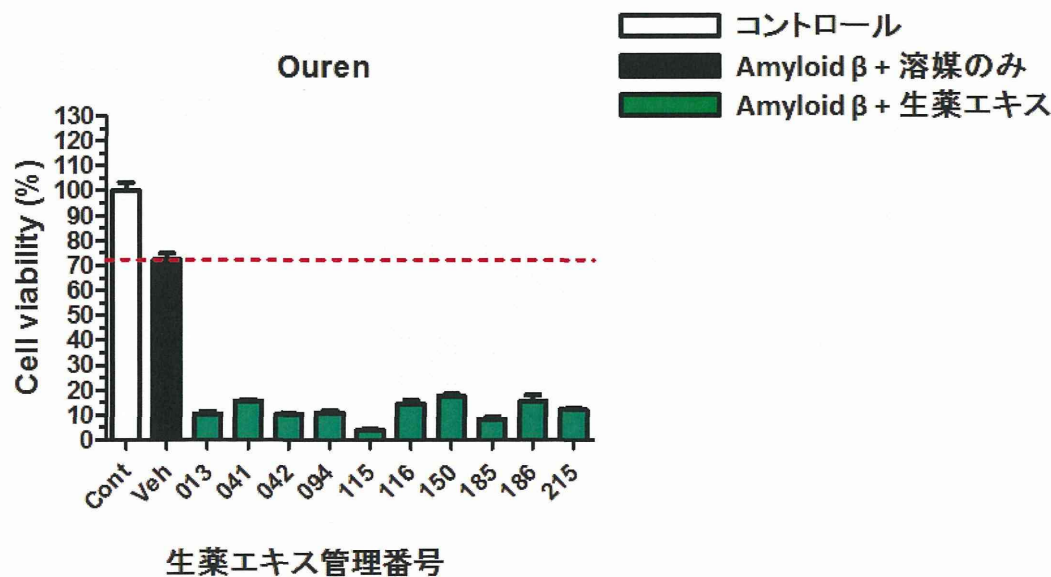


Fig. 4

神経細胞死抑制作用　一茯苓(ブクリョウ)ー

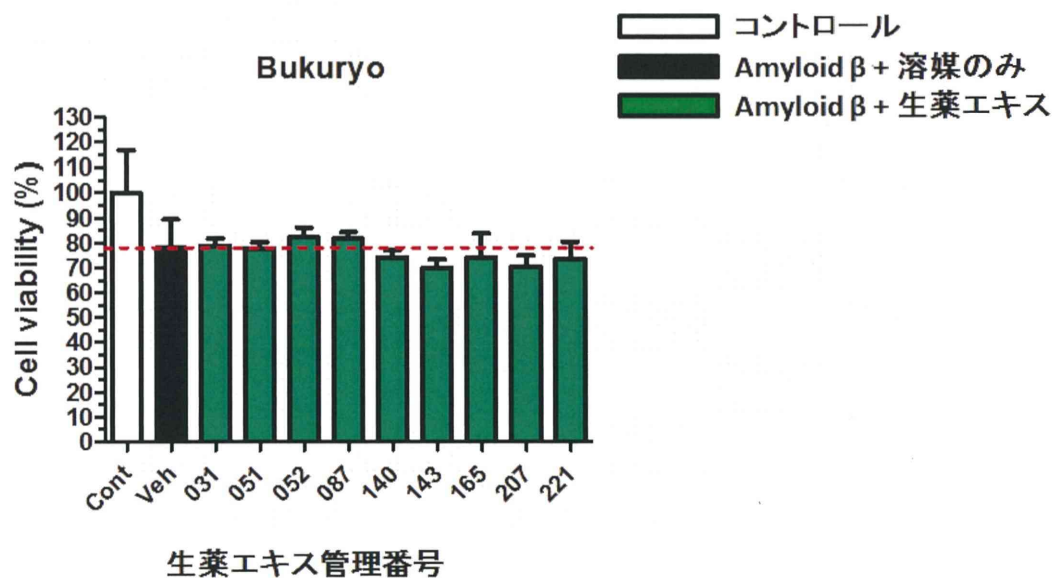


Fig. 5

神経細胞死抑制作用　一白朮(ビャクジュツ)ー

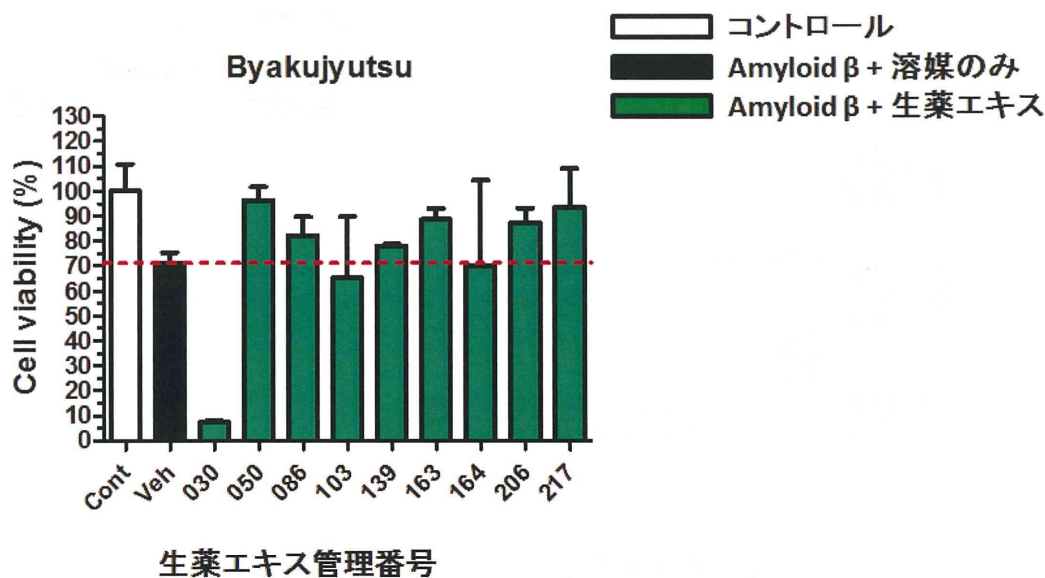


Fig. 6

神経細胞死抑制作用 一大黄(ダイオウ)ー

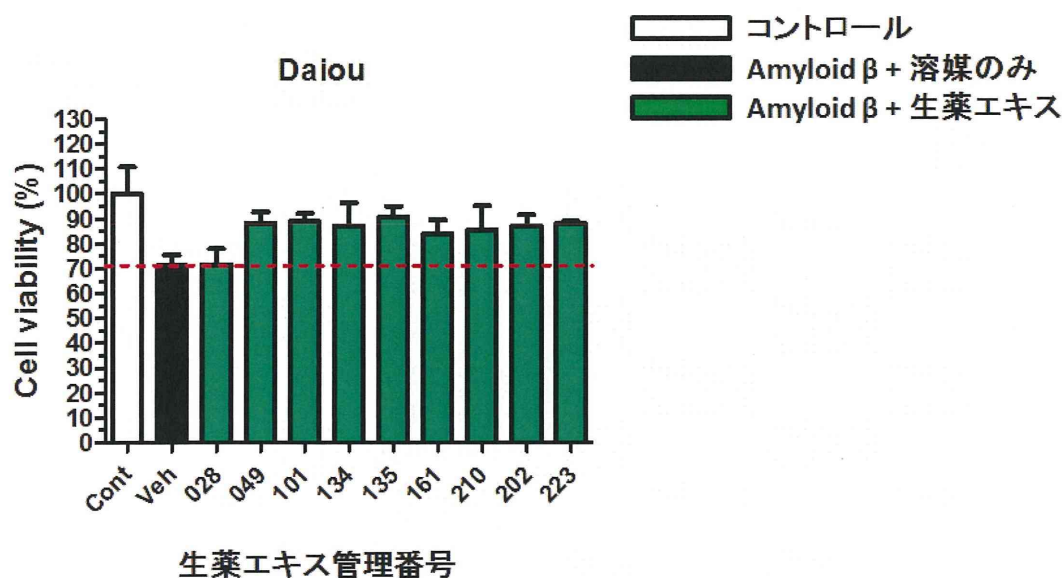


Fig. 7

神経細胞死抑制作用 一山梔子(サンシシ)ー

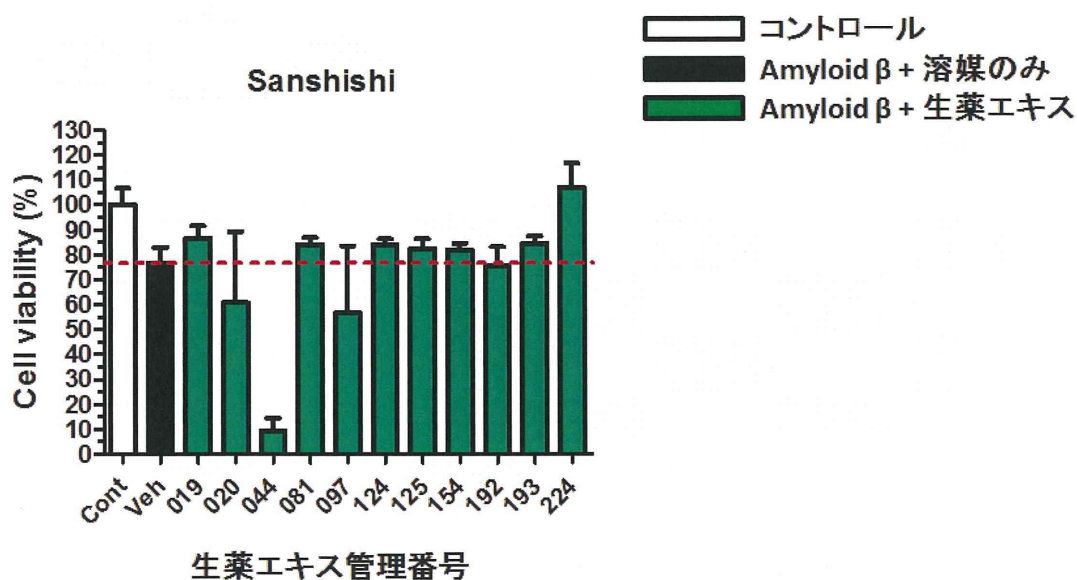


Fig. 8

神経細胞死抑制作用 一細辛(サイシン)ー

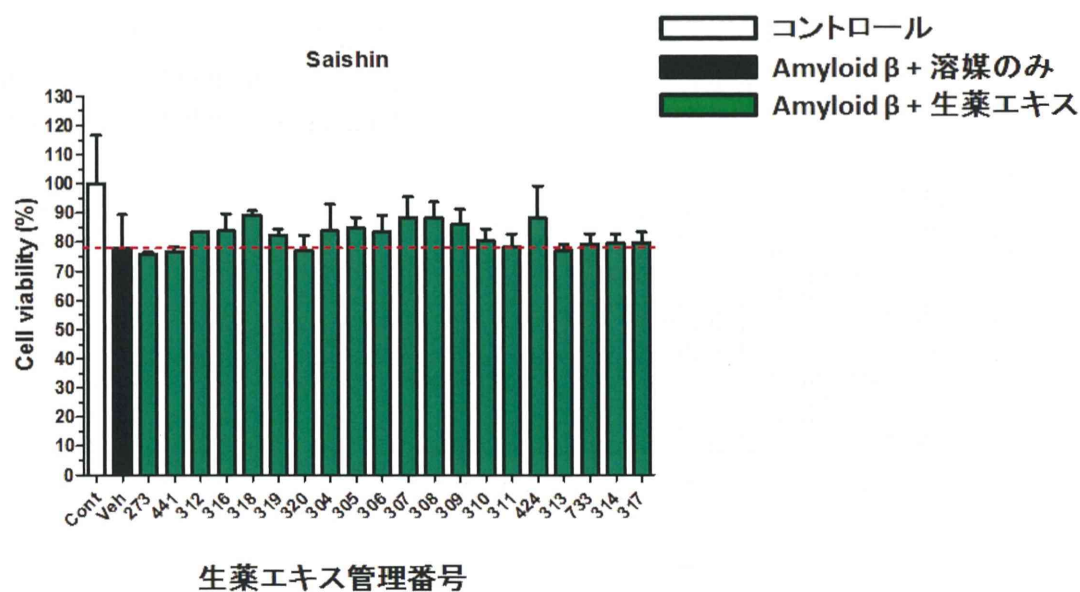


Fig. 9

神経細胞死抑制作用 一柴胡(サイコ)ー

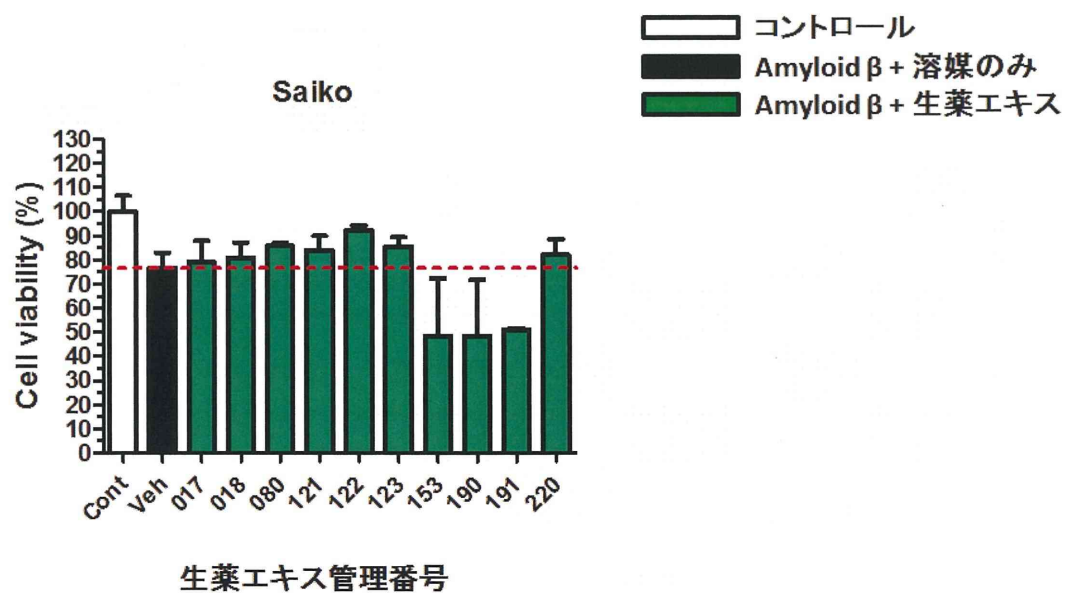


Fig. 10

神経細胞死抑制作用 一当帰(トウキ)ー

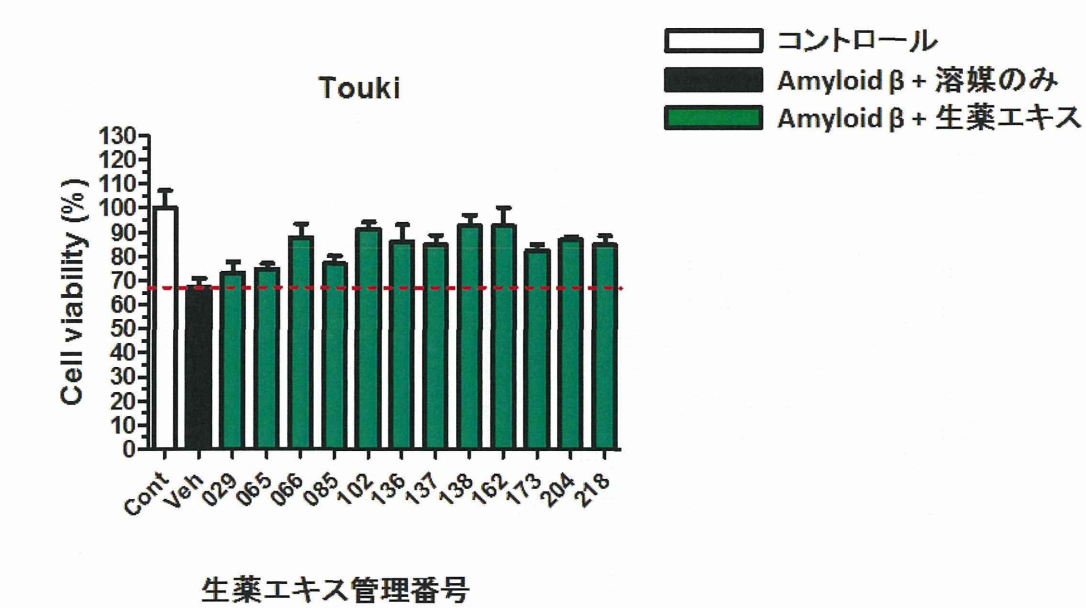


Fig. 11

神経細胞死抑制作用 一人参(ニンジン)ー

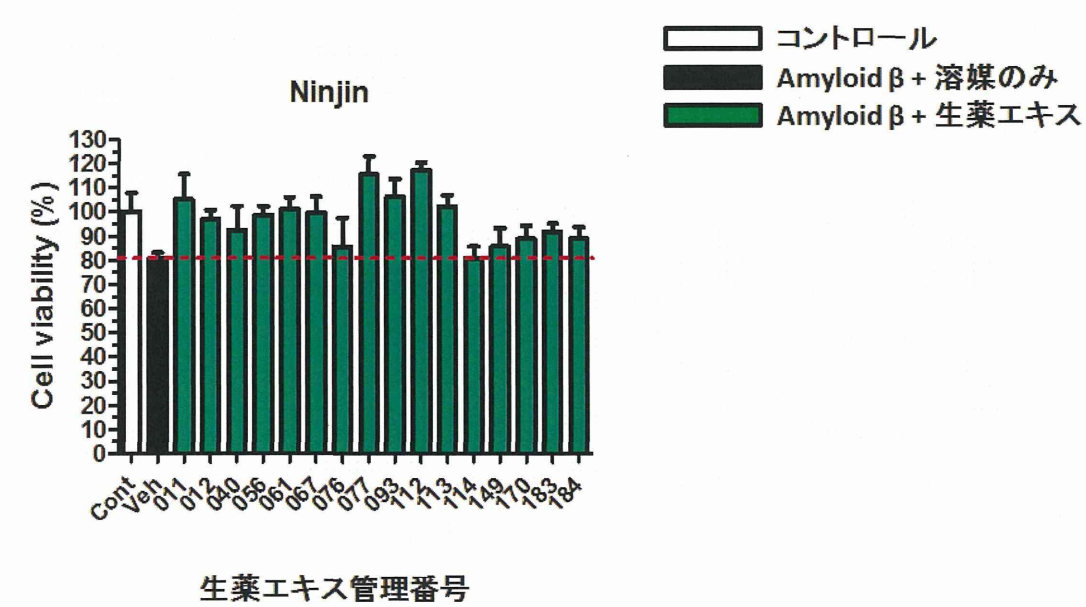


Fig. 12

神経細胞死抑制作用 一麻黄(マオウ)一

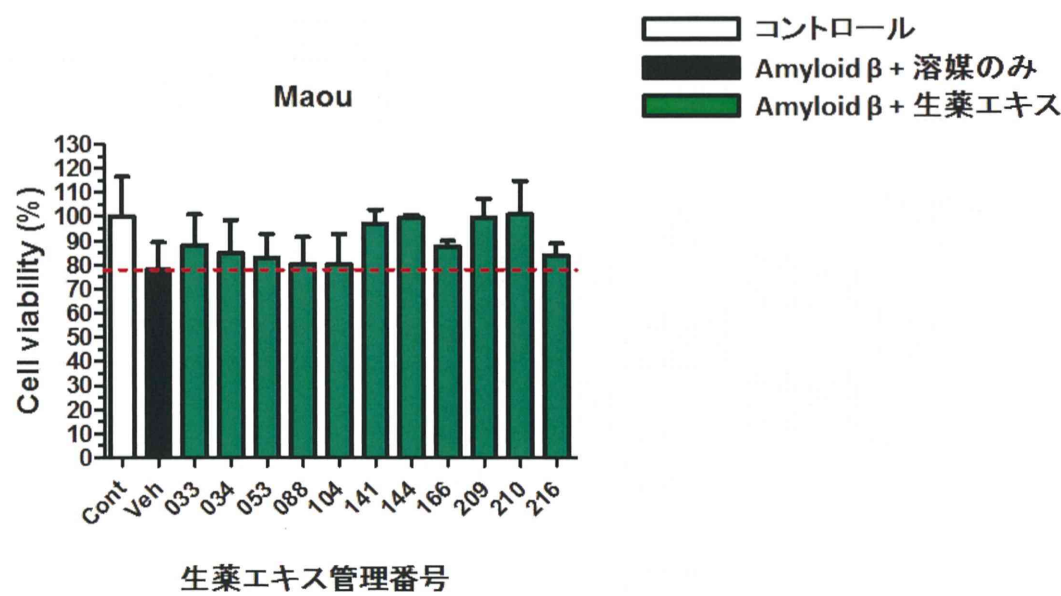


Fig. 13

神経細胞死抑制作用 一杏仁(キョウニン)一

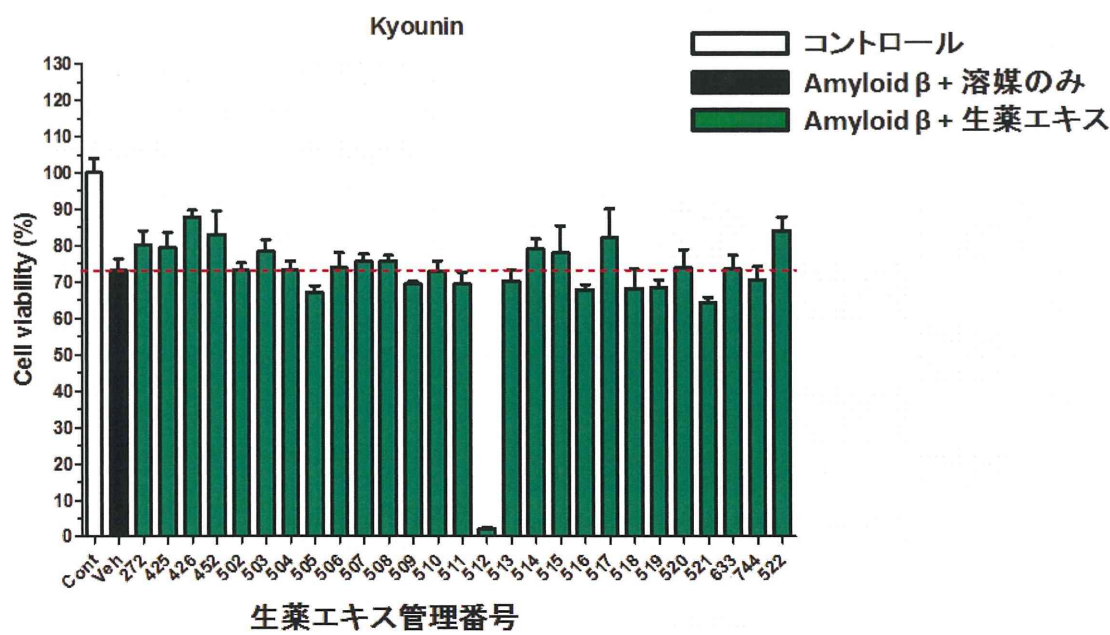


Fig. 14

神経細胞死抑制作用 一桂皮(ケイヒ)一

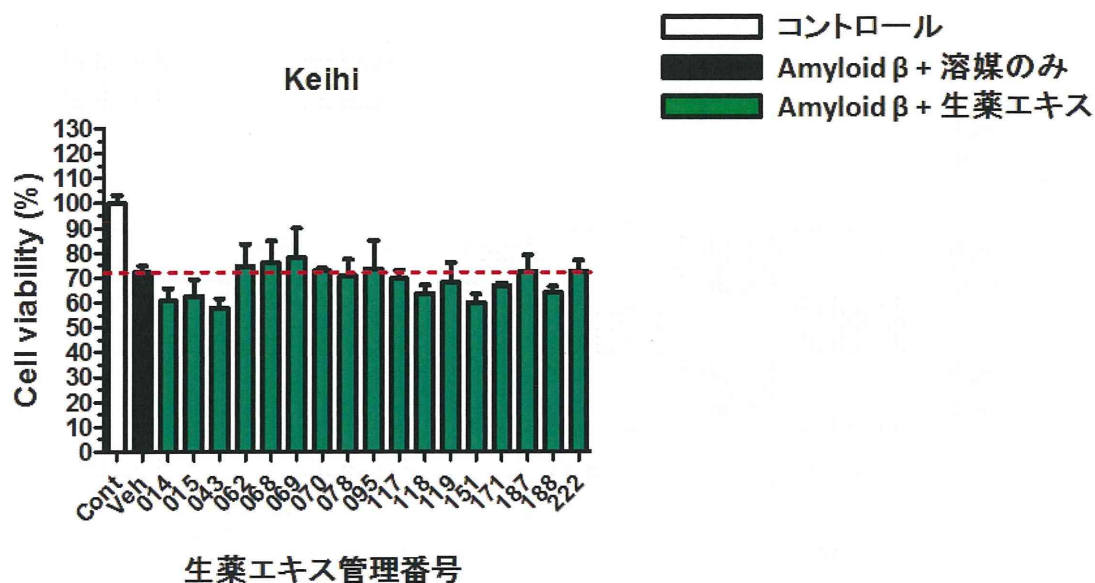


Fig. 15

神経細胞死抑制作用 一地黄(ジオウ)一

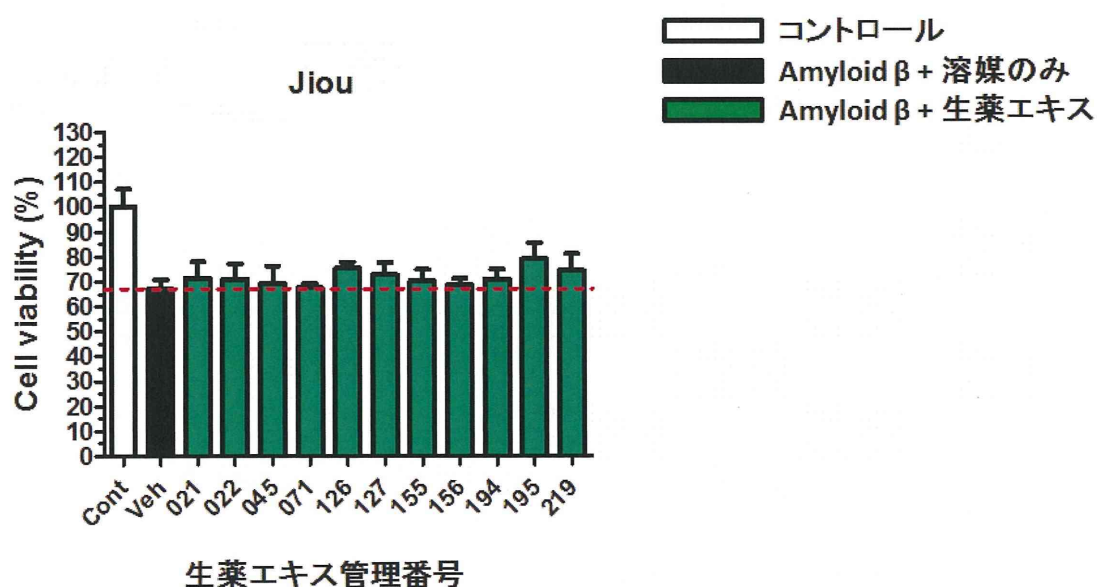


Fig. 16

神経細胞死抑制作用 一半夏(ハンゲ)ー

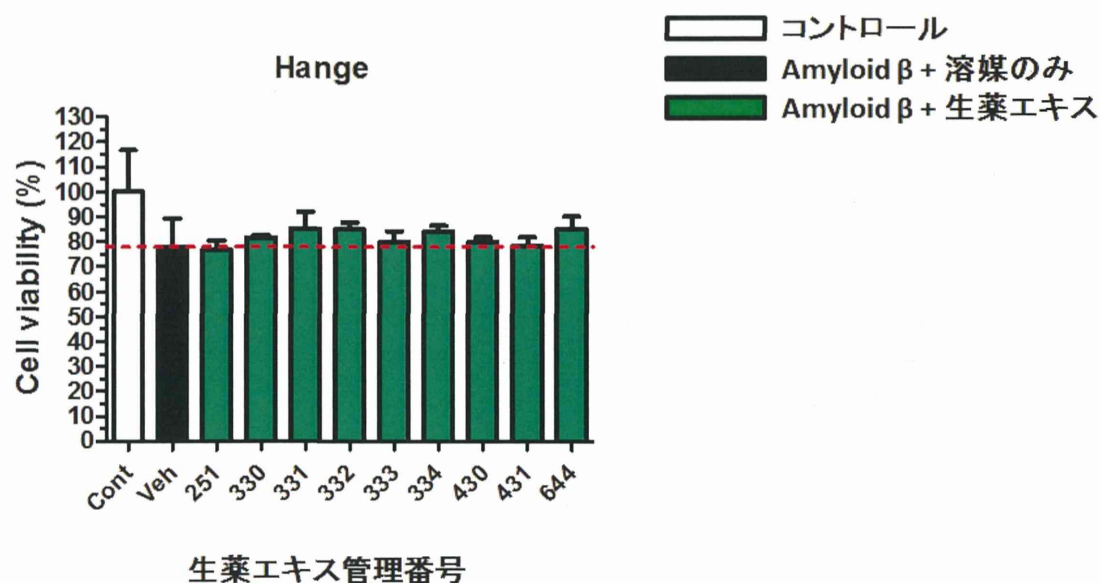


Fig. 17

神経細胞死抑制作用 一牛膝(ゴシツ)ー

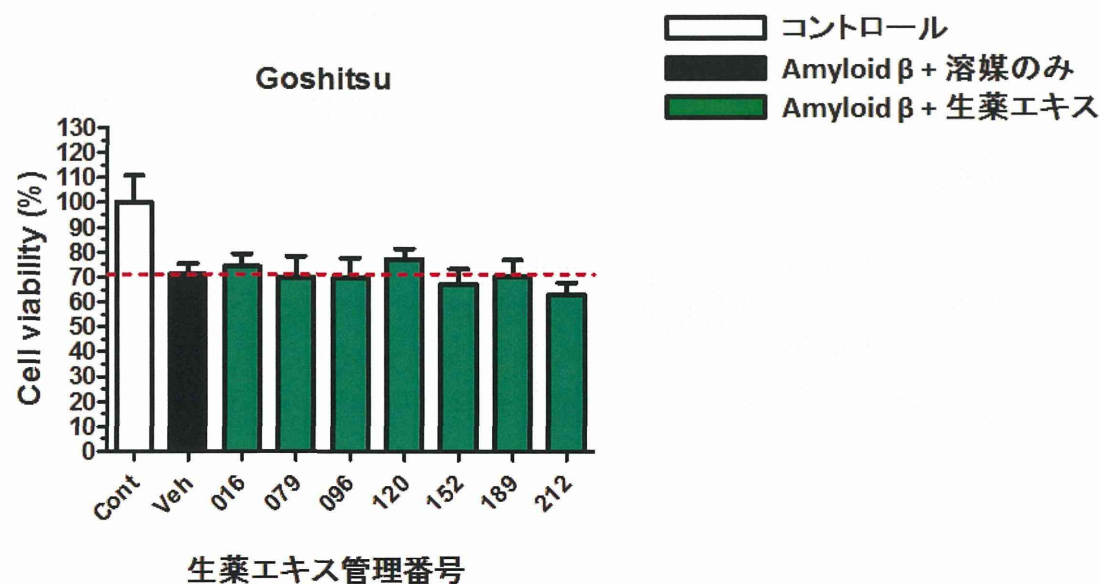


Fig. 18