

薬用植物の非薬用部位の有効利用に向けた研究

長崎国際大学 薬学部

宇都 拓洋

1. 研究の目的と背景

「薬用植物（生薬）」は古来、漢方薬や医薬品の原料として用いられてきたが、近年の世界的な健康志向の高まりから、OTC 医薬品、化粧品、健康食品、薬膳の食材、サプリメント等にも広く用いられるようになり、薬用植物の需要が増大している。しかしながら、生薬の80%以上は中国を中心とするアジア諸国からの輸入に依存おり価格の高騰や安定供給に問題があること、薬用植物の乱獲による資源の枯渇が深刻な問題となっていること、国内での薬用植物栽培は未だ難しく国産生薬はわずかであることなど、薬用植物の栽培・供給に関する状況は極めて厳しい。近年、関係省庁のバックアップのもといくつかの自治体や企業で薬用植物の国内生産拡大に向けた取り組みが進行しているが、未だ生産拡大・安定供給・高品質化には至っておらず、限られた薬用植物資源の有効活用が強く求められている。

この問題を解決するための1つの取り組みとして、これまで薬用として利用されなかった部位「非薬用部位」の有効利用が注目されている。しかしながら、これまでの研究は、薬用部位の成分および機能解析がほとんどで、非薬用部位の利用にむけた科学的エビデンスはほとんどない。我々は、非薬用部位の有効利用に向けたパイロット研究として、柴胡（サイコ）の非薬用部位である地上部の成分解析を行い、サイコサポニン類を含む14成分を単離同定し、これら成分数種に癌細胞増殖抑制作用を見出した¹⁾。また、当帰（トウキ）の非薬用部位である地上部が、薬用部位である根と同様に強い抗炎症作用があることを見出し、さらに成分解析の結果、主有効成分であるLigustilideの含量は、根よりも地上部が高いことを明らかにした²⁾。

これらの研究結果は、非薬用部位が薬用部位と同様に有効成分を含むことや薬用部位と同等の活性を持つことの裏付けとなり、活用可能な非薬用部位が潜在している可能性が高いことを示唆しているが、他の薬用植物の解析は行っていなかった。そこで、生物活性を持つ有用な非薬用部位を新たに発掘し、非薬用部位の有効利用を推進するための科学的エビデンス提供を目的として研究を行った。

2. 研究の方法

2-1. サンプル採取およびエキス調整

地黄（ジオウ）は上田薬草の会（長野県上田市）から、川芎（センキュウ）は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センター（北海道名寄市）か

ら分与していただいた。両サンプルは、水洗い後、地上部および根もしくは根茎に分け乾燥後ミキサーで粉末にした。乾燥粉末をメタノールで超音波抽出し、濾過することで得られた抽出液を減圧下溶媒留去し、メタノール抽出エキスを得た。得られたメタノール抽出エキスは、活性測定のために100 mg/mLの濃度になるようにDimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解させ-20℃で保存した。

2-2. 抗酸化能およびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様活性測定

抗酸化能は、PAO 抗酸化能測定キット（日研ザイル株式会社）で評価した。本キットは銅イオンの還元反応 ($\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{Cu}^+$) を利用し Cu^+ を発色試薬 (Bathocuproine) と複合体を形成させることでサンプルの抗酸化能を評価する方法である。マイクロプレートリーダーを用い、490 nm の吸光度を測定して Cu 還元力を算出した。SOD 様活性は、WST-1 を利用した SOD Assay Kit-WST（同仁化学研究所）で評価し、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定して阻害率を算出した。どちらも、マニュアルに従って各エキス（100 mg/mL）の段階希釈を行って測定に供した。

2-3. 抗炎症能測定

抗炎症能は、リポポリサッカライド (LPS) 処理したマウスマクロファージ様細胞 RAW264 から産生されるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) および一酸化窒素 (NO) の抑制能を評価した。RAW264 を 24 well plate (4×10^5 cells/well) に播種し、一晚培養後、各エキスを添加した。30 分後に LPS (50 ng/mL) で処理した。12 時間後、培地を回収し、 PGE_2 および NO 産生量を PGE_2 enzyme immunoassay kit (Cayman Co.) および Griess 反応にてそれぞれ測定した。

2-4. アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 活性測定

ACE Kit-WST（同仁化学研究所）を用いて、付属のマニュアルに従い各エキス（100 mg/mL）の段階希釈を行って測定に供した。本キットは、ACE により 3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly (3HB-GGG) から生成する 3-Hydroxybutyric acid (3HB) を酵素法により検出する方法である。マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定して ACE 阻害率を算出した。

2-5. メラニン産生抑制能測定

マウスメラノーマ細胞 B16-F1 を用いて、メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) により誘導されるメラニンの抑制能を評価した。B16-F1 を 24-well plate (1×10^4 cells/well) に播種し、一晚培養後、各エキスを添加した。30 分後に α -MSH ($1 \mu\text{M}$) で処理した。3 日培養後、細胞を 120 μL の 1N NaOH を加え、80 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱溶解後、415 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、メラニン産生量を測定した。

2-6. 成分解析

[HPLC 条件] ポンプ: PV-2089 Plus (JASCO), オートサンプラー: AS-2057 Plus (JASCO), カラムオープン: CO-2065 Plus (JASCO), カラム: TSKgel ODS-100V (TOSOH) 4.6×250 mm, 検出器: UV-2075 Plus (JASCO), クロマトグラフィーインターフェイス: LC-Net II/ADC (JASCO), データ処理用ソフト: ChromNAV (JASCO) [測定条件] 紫外吸光光度計波長: 203 nm (地黄), 254 nm (川芎), カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$, 溶離液: $\text{CH}_3\text{CN} : 0.1\% \text{HCOOH-H}_2\text{O}$ [10:90, v/v $\rightarrow$ 20 min (100:0, v/v) $\rightarrow$ 30 min hold (100:0, v/v)] (地黄) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ [10:90, v/v $\rightarrow$ 20 min (100:0, v/v) $\rightarrow$ 30 min hold (100:0, v/v)] (川芎), 流量: 1 mL/min, 注入量: 5 μL (地黄) 10 μL (川芎)

[サンプル溶液の作成] それぞれのメタノール抽出エキスを 10 mg/mL になるようにメタノールで溶解させ、フィルターろ過後 HPLC サンプルとした。

3. 研究内容

国内の薬用植物栽培・活用への貢献を第一目標として、国内で栽培もしくは採取できる薬用植物を中心に数種の候補を選抜した。非薬用部位の安定的な収量確保、利用方法、市場価値等を考慮した結果、地黄および川芎を本研究の候補植物と決定し、非薬用部位の活性評価を行うことにした。

地黄 (図 1 左) は、ゴマノハグサ科アカヤジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino または *Rehmannia glutinosa* Liboschitz の根 (乾地黄) またはそれを蒸したもの (熟地黄) であり、漢方では保険強壮薬、尿路疾患用薬、皮膚疾患用薬、婦人薬とみなされる処方に配合される。日本では北海道、長野、奈良などでわずかに栽培されている。一方、川芎 (図 1 右) はセリ科センキュウ *Cnidium officinale* Makino の根茎を、通例、湯通ししたものであり、補血、強壮、鎮静、鎮痛、駆瘀血などを目的に各種婦人科疾患の漢方処方に配合される。主に北海道や東北地方、長野などの冷涼地で栽培されている。地黄および川芎ともに、地上部は非薬用部位である。本研究において、地黄および川芎の地上部の各種生物活性を評価することで、非薬用部位の有効利用の可能性を検討した。



図 1 本研究で用いた地黄 (左) と川芎 (右)

メタノール抽出により地黄から根エキス (薬用部位) および地上部エキス (非薬用部位)、川芎から根茎エキス (薬用部位) および地上部エキス (非薬用部位) をそれぞれ調製し、下記の活性評価を行った。

① 抗酸化能: 生体内で発生する活性酸素・フリーラジカルは、生体内のタンパク質や DNA などの生体成分を攻撃することにより、多くの疾病や老化現象に深く関わっているとされている。スーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) は、一酸化窒素 (NO) と反応し反応性の強いパーオキシナイトライト ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) を形成し、DNA、蛋白質、脂質などの生体分子を酸化させることが知られている。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は $\text{O}_2^{\cdot-}$ を分解し、活性酸素に対する生体防御において重要な役割を果たしている。本研究では、各エキスの抗酸化能と SOD 様活性による活性酸素消去能を評価した。

② 抗炎症能: マクロファージは LPS や炎症性サイトカインなどの炎症性刺激により PGE_2 や NO を過剰に産生することで慢性的な炎症を引き起こすことが知られている。そこで、マウスマクロファージ RAW264 において、各エキスによる LPS 誘導性 PGE_2 および NO に対する抑制効果を検討した。

③ アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 活性抑制能: ACE は、血圧調節メカニズムの一つであるレニン-アンジオテンシン系において、アンジオテンシン I から昇圧作用を有するアンジオテンシン II を生成し、同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解するなど、血圧上昇に大きく関与している酵素である。本研究では、高血圧予防効果の有無を確認するために、各エキスの ACE 活性抑制能を評価した。

④ メラニン産生抑制能: メラニンは表皮基底層のメラノサイトより産生され、メラニン合成を阻害する天然物は、しみ、そばかす、黒ずみ等の抑制効果が期待される。マウスメラノーマ B16-F1 において、各エキスによる α -MSH 誘導性メラニン産生に対する抑制効果を検討した。

4. 研究の実施経過

4-1. 抗酸化能および SOD 様活性

各エキスの抗酸化能を比較した結果、地黄および川芎の非薬用部位、薬用部位は、ともに抗酸化能を示した (図

2). 希釈倍率 1/25 における抗酸化能は, 地黄根エキス 598 $\mu\text{mol/L}$, 地黄地上部エキス 3459 $\mu\text{mol/L}$, 川芎根茎エキス 487 $\mu\text{mol/L}$, 川芎地上部エキス 4109 $\mu\text{mol/L}$ であり, 非薬用部位の方が顕著に高かった. 図 3 は各エキスの SOD 様活性を測定し, 阻害率で表したものである. 希釈倍率 1/1250 において, 地黄根エキス 19.6%, 地黄地上部エキス 76.9% であり, 阻害率は非薬用部位の方が高かった. 一方川芎は, 希釈倍率 1/1250 における根茎エキスの阻害率は 4.25% と低い, 地上部エキスの阻害率は 97.7% で顕著に高かった.

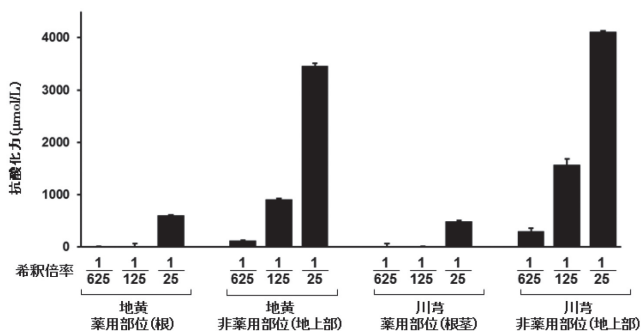


図 2 地黄と川芎の非薬用部位および薬用部位の抗酸化力

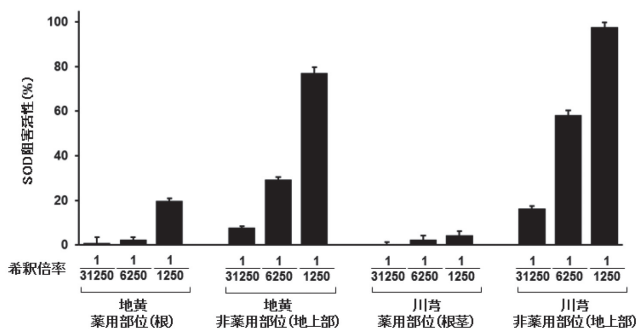


図 3 地黄と川芎の非薬用部位および薬用部位の SOD 様活性

4-2. 抗炎症能

次に, 各エキスの抗炎症能を確かめるために, LPS 刺激した RAW264 細胞を用いて PGE_2 (図 4) と NO (図 5) 産生への影響を調べた. 未処理において PGE_2 量は 32.8 pg/mL であるが, LPS により 516.4 pg/mL まで産生が誘導された. 地黄の地上部エキスは根エキスに比べ PGE_2 産生を抑制した [100 $\mu\text{g/mL}$ において地上部エキス 308.5 pg/mL (阻害率 43.0%), 根エキス 403.2 pg/mL (阻害率 23.4%)]. 川芎は, 地上部エキスおよび根茎エキスともに PGE_2 産生を抑制した [100 $\mu\text{g/mL}$ において地上部エキス 233.0 pg/mL (阻害率 58.6%), 根茎エキス 403.2 pg/mL (阻害率 76.2%)]. 一方 NO 産生は, 未処理において NO 量は 0.2 μM であるが, LPS により 10.3 μM まで産生が誘導され, 地黄の根エキスは NO 産生抑制能がなかったが, 地上部エキスは顕著に NO を抑制した [100

$\mu\text{g/mL}$ において地上部エキス 3.1 μM (阻害率 71.0%), 根エキス 9.9 μM (阻害率 4.3%)]. 川芎は, 地上部エキスおよび根茎エキスともに同様に NO 産生を抑制した [100 $\mu\text{g/mL}$ において地上部エキス 6.1 μM (阻害率 42.2%), 根茎エキス 4.6 μM (阻害率 56.1%)]. この時, MTT assay を用いて各エキスの細胞生存への影響を調べたところ, すべてのエキスにおいて細胞増殖への影響はなかった.

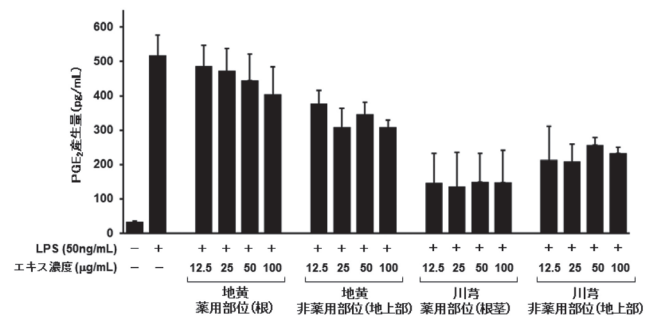


図 4 地黄と川芎の非薬用部位および薬用部位の PGE_2 産生抑制能

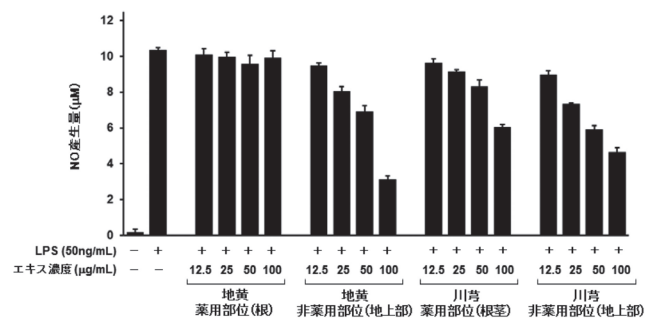


図 5 地黄と川芎の非薬用部位および薬用部位の NO 産生抑制能

4-3. ACE 活性抑制能

各エキスの ACE 阻害活性を比較した (図 6). 地黄および川芎の非薬用部位, 薬用部位ともに ACE 活性抑制能を示した. 希釈倍率 1/125 において, 地黄根エキス 14.5%,

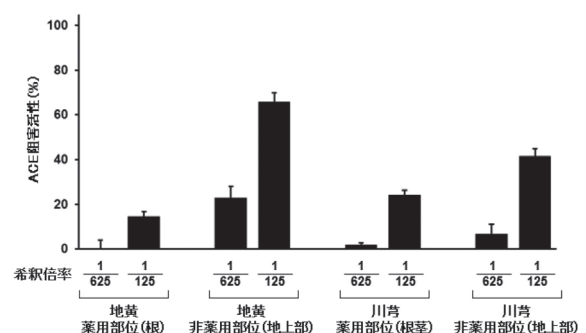


図 6 地黄と川芎の非薬用部位および薬用部位の ACE 活性抑制能

地黄地上部エキス 65.8%, 川芎根茎エキス 24.0%, 川芎地上部エキス 41.4%であり, 地黄および川芎ともに地上部エキスの ACE 活性抑制能が顕著に高かった。

4-4. メラニン産生抑制能

B16-F1 細胞において α -MSH により誘導されたメラニン産生に与える影響を調べた (図 7)。未処理においてメラニン量を示す O.D.₄₁₅ は 0.233 であるが, α -MSH により 0.579 まで産生が誘導された。地黄および川芎の非薬用部位は, α -MSH 誘導性メラニン産生を抑制したが, 薬用部位には抑制能は見られなかった [100 μ g/mL において地黄地上部エキス 0.358 (阻害率 63.9%), 川芎地上部エキス 0.329 (阻害率 72.3%)].

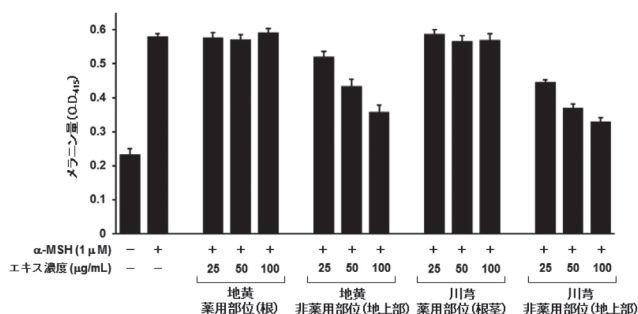


図 7 地黄と川芎の非薬用部位および薬用部位のメラニン産生抑制能

4-5. 非薬用部位の成分解析

次に, 地黄と川芎の非薬用部位および薬用部位の成分解析のために, HPLC によりフィンガープリントクロマトグラムの比較を行った。地黄 (図 8) および川芎 (図 9) とともに, 非薬用部位と薬用部位間で異なるピークプロファイルが得られた。地黄は, 薬用部位の根に比べて非薬用部位

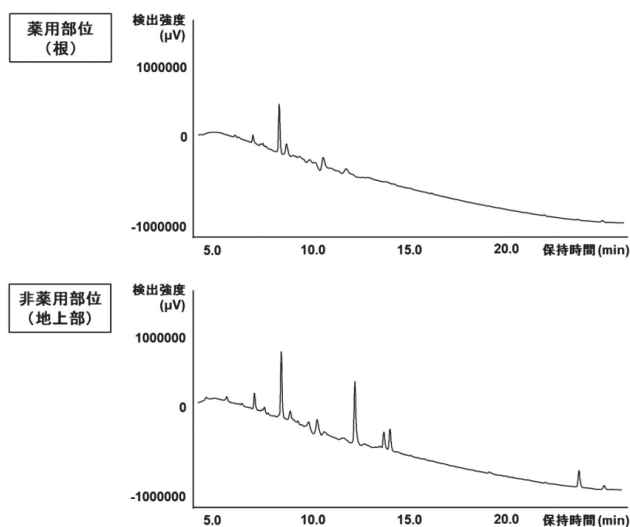


図 8 地黄の薬用部位および非薬用部位の HPLC クロマトグラム

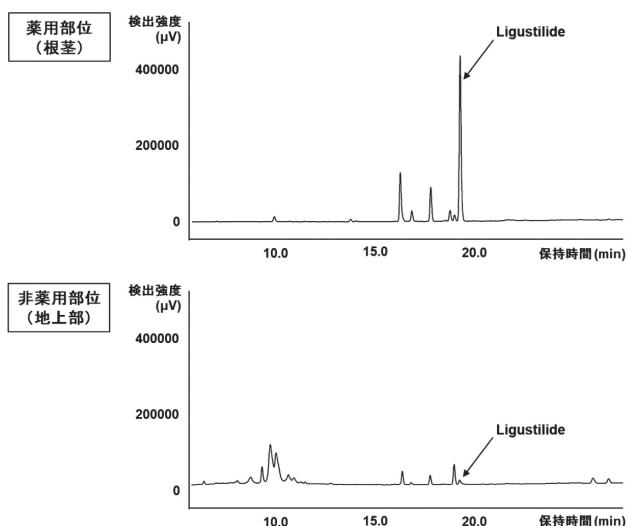


図 9 川芎の薬用部位および非薬用部位の HPLC クロマトグラム

の地上部は多様な成分が含まれていることが示唆された。川芎の薬用部位の根茎の主要成分は Ligustilide であることが知られているが, 根茎では Ligustilide がメインピークであるのに対して, 非薬用部位の地上部では Ligustilide はほとんど含まれていないことが分かり, ピークプロファイルから根茎と根では含有成分に差があることが示唆された。

5. 研究から得た結論・考察

本研究は, 地黄および川芎の非薬用部位である地上部の活性および成分を解析する初の試みであった。抗酸化能および SOD 様活性は, 地黄および川芎ともに薬用部位よりも非薬用部位の地上部が高かった。生体内で発生する活性酸素・フリーラジカルは, 老化現象に深く関わっているほか, 生活習慣病をはじめとする多くの疾病に関与する。本研究において, 地黄および川芎の非薬用部位が強い ACE 阻害能を示したことから, 酸化ストレスに起因する各種疾病予防効果が期待される。さらに抗炎症能の評価の結果, 地黄の地上部エキスは PGE₂ および NO 産生を抑制した。薬用部位である根エキスの抑制能は低かったことから, 地上部の抗炎症能が期待されるが, 我々がこれまで行ってきた抗炎症能を持つ薬用植物エキスに比べて活性は低い^{3,4)}。一方, 川芎は, 地上部エキスおよび根茎エキスともに PGE₂ および NO 産生を抑制した。川芎の薬用部位の根茎の主要成分は Ligustilide であるが, 成分解析の結果, 非薬用部位の地上部では Ligustilide はほとんど含まれていないことが分かった。Ligustilide は, 当帰の薬用部位である根の主要成分でもある。我々のこれまでの研究により, 当帰の非薬用部位である地上部は, 薬用部位である根と同様に強い抗炎症作用があること, さらに当帰の地上部の Ligustilide 含量は, 根よりも高いことを明らかにしている²⁾。Ligustilide は PGE₂ および NO 産生を抑制すること

から、当帰の非薬用部位の抗炎症能は、Ligustilide に起因することが示唆されたが、本研究で明らかになった川芎の抗炎症能の場合は、川芎地上部の Ligustilide 含量は低いことから、Ligustilide 以外の成分が抗炎症能に関与していることが考えられる。さらに我々は、メラニン産生抑制能の評価を行った結果、地黄・川芎の薬用部位には抑制能は見られなかったが、非薬用部位はメラニン産生を抑制することを明らかにした。これらの結果は、地黄および川芎の非薬用部位である地上部が、多様な生物活性を持つことを示すものである。

6. 残された問題、今後の課題

本研究では、地黄および川芎の非薬用部位である地上部が多様な生物活性を持つことが明らかになったが、その活性本体の単離・同定までには至っていない。今後、地黄および川芎の非薬用部位エキスをヘキササン、酢酸エチル、ブタノール等で順次分画後、活性を評価し、活性画分を各種クロマトグラフィーに付し分離精製を行うことで、活性本体を単離・同定する計画である。また、地黄および川芎以外の薬用植物の非薬用部位の収集も行っており、これらの解析を進める。

本研究結果は、これまで利用されなかった非薬用部位である地黄および川芎の地上部の有効活用に繋がる科学的エビデンスとなる。本研究をモデルとして、これまで解析されていなかった種々の薬用植物の非薬用部位の解析に発展し、非薬用部位の有効活用に向けた科学的エビデンスが蓄積に繋げていきたい。さらに、非薬用部位を機能性表示食品、健康食品化粧品の原料に利用できる可能性に繋がることを期待している。安全性を担保した上で、生産地を中心とした非薬用部位の薬膳や地元料理を発信することで、新たな市場を生み出す可能性もある。本研究結果が、国内での薬用植物栽培促進の起爆剤の一つになるように、薬用植物栽培を行っている自治体等とも積極的に連携していきたい。

7. 謝辞

本研究の遂行に対してご支援を賜りました公益財団法人東洋食品研究所の皆様および審査員の先生方に深く感謝致します。地黄の収穫および分与にご尽力を賜りました上田薬草の会の皆様、川芎を分与していただきました国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターの菱田敦之先生に心より感謝致します。

8. 参考文献

- 1) Tung NH, Uto T, Morinaga O, Shoyama Y. Chemical constituents from the aerial parts of *Bupleurum falcatum* L. and biological evidences. *Natural Product Sciences*, 21 (2), 71-75. 2015.
- 2) Uto T, Tung NH, Taniyama R, Miyanowaki T, Morinaga O, Shoyama Y. Anti-inflammatory activity of constituents isolated from aerial part of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Phytotherapy Research*, 29(12), 1956-1963. 2015.
- 3) Uto T, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. Analysis of the synergistic effect of glycyrrhizin and other constituents in licorice extract on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production using knock-out extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 473-478. 2012.
- 4) Uto T, Suangkaew N, Morinaga O, Kariyazono H, Oiso S, Shoyama Y. *Eriobotryae folium* extract suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression by inhibition of NF- κ B and MAPK activation in murine macrophages. *American Journal of Chinese Medicine*, 38(5), 985-994. 2010.