

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18893

研究課題名(和文) 高品質トウキの安定供給を指向した育成環境構築と品質評価

研究課題名(英文) Establishment of a cultivation conditions and quality evaluation aimed at the stable supply of high quality Japanese Angelica Root

研究代表者

岩岡 恵実子 (IWAOKA, Emiko)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：60411980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生薬は、栽培条件で含有する成分量が変わることが知られており、高品質な生薬を作るためには、薬用とする部分での薬効成分の含有量を確認する必要がある。しかし、生薬トウキについては薬効成分が明確にされていないことから、薬効に関わる成分の解明を試みた。その結果、栽培条件でトウキに含まれる成分が変動することが確認され、これまで指標とされていた主成分であるリグスチリドの含有量とトウキの薬効である末梢血流量の改善効果が必ずしも比例しない可能性を明らかにした。また、アデノシンの含有も確認し、この末梢血流量の改善効果を調べたところ効果がみられたため、トウキの効果にはこのアデノシンが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The natural medicinal plants are known to change the content rate of components depending on the cultivation area and cultivation conditions. That is, there is a need to confirm the content of active ingredients in medicinal parts of crude drug. Therefore, for the purpose of searching active ingredients of Japanese Angelica Root, we tried the comprehensive analysis of Japanese Angelica Root extract using high performance liquid chromatography (HPLC) and the identification of the compound of the main peak. In addition, we investigated the improvement of peripheral circulatory disturbance of Japanese Angelica Root and the ingredient. As a result, We identified the compounds in Japanese Angelica Root of the main peaks on HPLC pattern as ligustilide, xanthotoxin and adenosine, respectively. In addition, adenosine significantly improved the peripheral circulatory disturbance. We suggesting that adenosine may be involved in the improvement of blood flow in Japanese Angelica Root.

研究分野：天然薬物学

キーワード：トウキ 末梢血管障害改善効果 アデノシン

### 1. 研究開始当初の背景

近年の日本の医療における漢方薬の重要性は言うまでもなく、漢方製剤の生産金額は平成18年～23年の間に約22%増加している(厚生労働省「薬事工業生産動態統計調査」)よって、その原料である生薬についても今後更なる需要の増加が想定されるが、現状では中国からの輸入に頼っている状態である。しかし、昨今の中国の経済発展による中国国内での生薬の需要量の増加や、環境保全等を目的とした輸出制限、さらには乱獲による天然資源の減少により、原料となる生薬の価格は上昇し、確保も困難になると見込まれることから、国内での安定かつ高品質な生薬の生産が急務であると考えられている。

2013年には農林水産省より薬用作物に関する取り組みが発表され、それに呼応して全国各地での薬用作物の栽培が大きな流れとなってきた。その結果、今後は耕作放棄地の再生利用等により新規の生産者が増えると予想され、肥料や散水方法等の最適かつ簡便な栽培条件を検討する必要に迫られている。生薬は天然物であるため、気候や産地など生育環境によって薬効や含有成分に変化が生じる可能性があることから、最適な栽培条件を検討するためにも、薬用とする部分に薬効成分が多く含まれることを確認する品質の評価が非常に重要である。しかし、現状では必ずしも薬効を担保しない生薬の主成分が品質評価の指標とされていることが多い。

よって、将来の原料生薬の枯渇に対する対策として、生薬の品質評価を成分分析のみならず多方面から検討し、より良質な生薬の生育条件を確立することは大変重要な事案である。

### 2. 研究の目的

本研究では、日本において高頻度で使用され、また、国内産原料が比較的多く流通しているトウキ(当帰)に着目し、様々な生育条件で栽培されたトウキについて、その薬効を*in vivo*アッセイ法を用いて評価し、生育条件と薬効の相関性について検討することで“真の品質担保法”の確立を目指す。(なお、動物実験については、「兵庫医療大学動物実験委員会」に実験計画を申請・承認された後、「兵庫医療大学動物実験規程」に従い適切に実施する)さらに、各生育条件におけるトウキの含有成分をHPLCを用いて網羅的に解析し、得られたパターン(フィンガープリント)とそれぞれの薬効の相関性について検討し、HPLC分析パターンでの薬効の有無の判別を可能にする。

### 3. 研究の方法

(1) 生薬は天然物であることから、気候や土壌などの栽培環境や調整法により、含有成分や薬効が異なると言われている。本研究では薬用とする部分に薬効成分が多く含まれる

最適な栽培条件の確立や、品質が一定した生薬の安定供給に必要な品質評価法について検討するため、数種の異なる栽培条件のトウキのサンプルが必要である。

そこで、まずは兵庫県丹波市において作付け間隔、土壌の状態、肥料の種類等を変化させて栽培している育成条件の異なるトウキの根を掘りだして天日干しし、熱湯で湯もみして再度乾燥させ、細切し、各種育成条件での細切生薬を作成する。

今回は、特定の主成分についてではなく網羅的なパターン分析を行うため、抽出溶媒としてメタノールを使用し、各種トウキエキスを作製する。

(2) 上記の「研究の方法」(1)で作製した各種育成条件のトウキエキスについて、マウスを使用した駆瘀血*in vivo*アッセイ法を用いて、駆瘀血作用を評価する。

瘀血の病態の一つである末梢血液循環障害を発症したモデルマウスに各トウキエキスを経口投与し、尾部の末梢循環血流量を非接触型レーザー血流計を用いて9日間測定する。コントロールである末梢血液循環障害モデルマウスの緩やかな末梢血流量の低下に対し、各種育成条件のトウキエキス投与による血流量改善効果を検討する。

本アッセイ法は、駆瘀血剤として臨床で処方される漢方薬や様々な駆瘀血生薬とともに、トウキエキスについても末梢血液循環障害モデルマウスの末梢血流量改善効果を示すことが報告されている(Iwaoka E. et al., *J. Trad. Med.*, 2009, 26, 97-103)。

よって、育成条件および含有成分の異なるトウキエキスを本アッセイ法により評価することで、各種条件における血流量改善効果の違いを検討することが可能であると考えられる。

これらの活性試験の結果と、土壌や肥料の種類などの異なる様々な栽培条件を比較、解析することで、薬効を伴った高品質なトウキの栽培に最適な育成条件が見出せると考えられる。

(3) 同時に、各種育成条件におけるトウキの含有成分の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)での網羅的な分析パターン(フィンガープリント)の変動を確認するため、まずは局方適合のトウキを用いて良好な分析パターンが確認できるHPLC分析条件を検討する。

条件決定後、各種育成条件で栽培したトウキエキスについてのHPLCを用いた含有成分のパターン分析を行い、各種条件下での含有成分の変化について解析することで、様々な栽培条件の違いによる含有成分変化を捉えることができると考えられる。

また、上記の「研究の方法」(2)での生物活性試験の結果と照らし合わせ、分析パターンと薬効の相関性を検討することで、駆瘀血作

用に必要と考えられる化合物群を見出す。

このように、薬効がみられる含有成分の分析パターンを明らかにすることで、今後の品質評価においては、HPLCを用いたパターン分析を行い、薬効と相関のあったパターンとの比較により、薬効を加味した品質評価が可能となることを期待できる。

(4) 生薬の薬効成分は、主成分と異なることも多く、トウキの駆瘀血作用の活性物質に関しても様々な研究が行われているがまだ結論に至っていない。よって本研究において得られた薬効と相関のあるパターンについて、有効成分が含まれると考えられる化合物群をHPLCにより分取し、活性フラクションを分画する。

このフラクションに関して、末梢血液循環障害による血流量低下を指標とした駆瘀血 *in vivo* アッセイ法を用いて活性を確認し、駆瘀血作用が認められたら、さらに活性を指標に各種クロマトグラフィーを繰り返し、活性成分の単離を試みる。

#### 4. 研究成果

##### (1) サンプルの入手

H27年度は、兵庫県丹波地方において栽培し、乾燥した大和種のトウキおよび局方品として市場に流通している大和トウキと北海トウキを栃本天海堂より購入した。

H27年度の兵庫県産のサンプルについては、時間の関係上、湯もみなどの調整を行わず、掘り起こした後に乾燥させたものであったため、H28年度はさらに兵庫県産のトウキについて湯もみを行ったサンプルを作成した。

##### (2) エキスの作成

H27年度兵庫県丹波産大和トウキ(湯もみ調整なし)、市販品の大和トウキ、市販品の北海トウキおよび H28年度兵庫県丹波産の大和トウキ(湯もみ調整あり)について、メタノール抽出を行い、それぞれのサンプル10gから1180mg、1350mg、890mgおよび1210mgのメタノールエキスを得た。

##### (3) HPLCを用いた成分分析

また、各種トウキエキスについて含有成分の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)での網羅的な分析パターン(フィンガープリント)の変動を確認するため、まずは局方適合品の大和トウキを用いて良好な分析パターンが確認できるHPLCを用いた分析条件を決定した。さらにH27年度兵庫県丹波産大和トウキ(湯もみ調整なし)、市販品の北海トウキについてのHPLCを用いた含有成分のパターン分析を行ったところ、各エキス中の主成分リグスチリドの含有量は、それぞれ兵庫県丹波産トウキ(大和種)2.4%、大和トウキ0.9%、北海トウキ1.9%であり、湯もみをしていない兵庫県丹波産のトウキが最も高

い結果を得た。

また、各種条件の違いにより、微量成分に微細な変化が捉えられる傾向が見られたため、他の含有成分について比較検討したところ、リグスチリドと同じく含有量の高いキサントキシニンも大きな含有量の差はみられなかったが、その他多数の微量成分について大和トウキおよび北海トウキで含有量の増加を確認した。

H27年度の兵庫県丹波産のサンプルについては、通常の大和トウキの調整法と異なるため、さらにH28年度に作成した兵庫県丹波産のトウキについてHPLCによる成分分析を行ったところ、リグスチリドの含有量はほとんど変化がなかったが、微量成分の含有量の増加が認められた。

##### (4) トウキの熱水抽出エキスの分析

これまでもトウキの活性成分としてリグスチリドやキサントキシニンなどについて盛んに研究が行われている。実際に漢方薬を湯液療法で服用する際には熱水抽出をすることになるが、特にリグスチリドに関しては疎水性の高い化合物であるため、熱水中への抽出率をHPLCで確認した。その結果、リグスチリドの含有は認められたものの、非常に少量であることが確認できた。

##### (5) 駆瘀血活性試験

さらにこれらエキスについて、*in vivo* アッセイ法を用いた駆瘀血活性について検討を行った。感作マウスは瘀血の病態の一つと考えられる末梢血液循環障害を引き起こすことから、このマウスの末梢血流量低下を指標としたアッセイ法を用いて、兵庫県丹波産トウキ(大和種)エキス、大和トウキエキスおよび北海トウキエキスの駆瘀血活性の評価を行った。その結果、いずれも感作マウスの末梢血液循環障害を改善したが、兵庫県丹波産トウキに関してはやや改善効果が低い結果を得た。成分分析の結果と考え合わせると、リグスチリド以外にも活性に関与する化合物があることが示唆された。

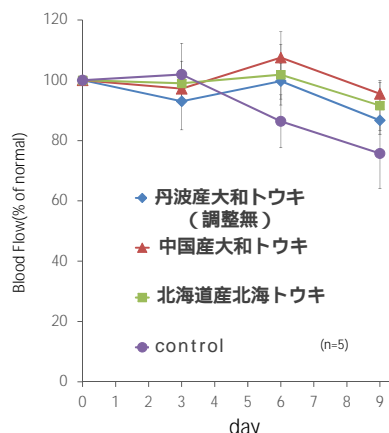


Fig.1 各種トウキエキスの末梢静脈微小循環血流量の改善効果

さらに、H28年度に作成した湯もみ調整をしたトウキについては、市販品である大和トウキおよび北海トウキ同等以上の活性を確認できた。このことから、大和トウキの調整において、湯もみが重要条件である可能性が示唆された。

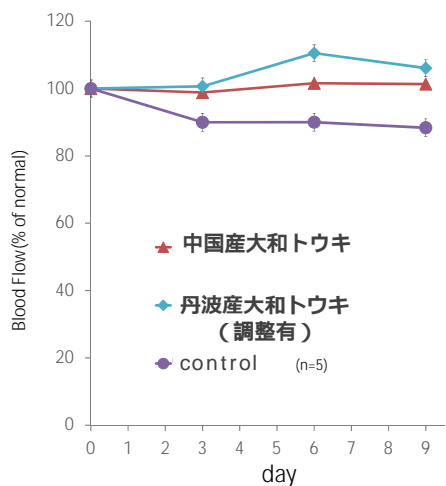


Fig.2 湯もみをした兵庫県産トウキエキスの末梢静脈微小循環血流量の改善効果

#### (6) アデノシンの効果

そこで次に、トウキ根 MeOH エキスの網羅的な HPLC 分析パターンにおいてみられる大きなピークは、主要成分として知られるリグスチリドやキサントトキシン以外にアデノシンであることを同定した。アデノシンは虚血性疾患治療薬として使用されるが、本研究における *in vivo* 駆瘀血活性試験法においても、有意な末梢静脈微小循環血流量の改善が認められたことから、トウキの駆瘀血活性成分としての可能性を見出した。

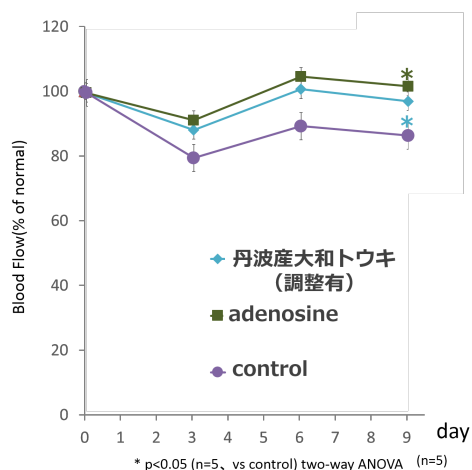


Fig.3. アデノシンの末梢静脈微小循環血流量の改善効果

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 3 件)

日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 25-27 日(金沢)

丹波産大和当帰の末梢血流量改善効果に関する検討

岩岡恵実子、勝野絵里、平岡幹朗、吉原 功、柴畑直寛、吉田晋弥、小松正紀、青木俊二

第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017 年 10 月 15 日(神戸)

高品質トウキの品質評価法の開発—トウキの網羅的成分分析と末梢血流量改善効果—

岩岡恵実子、池田実姫、勝野絵里、平岡幹朗、吉原 功、吉村佳典、柴畑直寛、吉田晋弥、小松正紀、青木俊二

第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017 年 10 月 15 日(神戸)

丹波産大和トウキの末梢血流量改善効果について

勝野絵里、岩岡恵実子、平岡幹朗、吉原 功、吉村佳典、柴畑直寛、吉田晋弥、小松正紀、青木俊二

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩岡 恵実子 (IWAOKA Emiko)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：60411980