

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21406004

研究課題名（和文）サステイナブル伝統薬を志向した薬用資源植物の多様性の解析

研究課題名（英文）Analysis on genetic, chemical and pharmacological diversity of medicinal plants, towards sustainable uses of traditional medicines

研究代表者

小松 かつ子 (KOMATSU KATSUKO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：50225570

研究成果の概要（和文）：刺五加の成分 eleutheroside B は、*in vitro* で神経突起萎縮抑制作用、*in vivo* で物体認知障害改善作用を示した。この成分は五加皮にも同程度認められたことから、ともに認知症への応用が期待できる。石菖蒲では、 β -asarone 含量が低い *Acorus gramineus* の genotype を見出した。中国産白芍と日本産芍薬は *Paeonia lactiflora* の南方系統、中国産赤芍は同種の北方系統に由来することを遺伝的・成分的に明らかにし、また、両分類群に属し薬用にも使用可能な園芸品種を数種類見出した。以上、安全で有効な生薬資源の確保に繋がる知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Eleutheroside B contained in rhizome of *Eleutherococcus senticosus* and root bark of *Acanthopanax gracilistylus* showed protective effect against neuritic atrophy *in vitro* and amelioration of the impaired object identification memory *in vivo*, suggesting that both herbal drugs would be expected for the application in dementia remedy. Among *Acorus* species whose rhizomes showed neurite outgrowth activity, some genotype of *A. gramineus* with low amount of β -asarone, a carcinogenic compound, were found. Based on genetic and chemical evidences, the botanical sources of white and red peony roots from China were demonstrated to be the southern and northern strains of *Paeonia lactiflora*, respectively, and several horticultural varieties were selected as alternative medicinal resources. Above results will contribute to sustainable uses of such medicinal resources.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	7,400,000	2,220,000	9,620,000

研究分野：生薬学

科研費の分科・細目：医歯薬学A・環境系薬学

キーワード：薬用植物、分子系統学、品質評価、認知症、生活習慣病、刺五加、中国

1. 研究開始当初の背景

(1) 21世紀のキーワードは持続可能性であり、持続可能な環境をつくるポイントは多様性を認めることであるとされる。これは伝統医学にも当てはまり、近年の自然破壊による天然資源の減少は薬用資源の減少をも意味

し、天然由来薬物に依存している伝統医学は将来の存続が危惧される。薬物に広い範囲の多様性は認められず、「安全性と有効性を担保する」ことが大前提である。日本の漢方医学においても漢方薬の資源の確保は最重要課題であることから、生薬の多様性を認める

範囲を限定しながら、生薬の標準化を図ることにより、将来の漢方薬の薬効を担保し、同時に生薬資源を確保する。これまで、人参類などで資源植物の調査と遺伝的・成分的・薬理的な多様性の解析研究を行い、多くの知見を得ているのでこの方法を踏襲する。

(2) 超高齢化社会を迎えた日本では、認知症や生活習慣病への漢方薬、生薬の応用に期待が寄せられている。これまでの薬理研究で、神経回路網再構築型の抗認知症薬としての可能性を、*protopanaxadiol* 系サポニン成分を含む人参類、刺五加、石菖蒲などに見出した。また、生活習慣病で出現する瘀血病態の改善効果（血管弛緩、抗炎症作用など）を鬱金・莪朮類や芍薬に見出している。

2. 研究の目的

中国には歴代の産地で採れる生薬（道地薬材）が最高の品質であるという理論があることから、道地薬材について、基源—成分—活性の多様性を明らかにし、これと現在の流通生薬を比較して品質の変動幅を調べる。また、歴代本草書に記載された代用品を手がかりにして中国で新生薬資源を探索し、これらの資源植物や、中国周辺諸国の同類生薬についても品質の多様性を調べる。これらの結果に基づいて、生薬の標準化の基準を作成しながら資源の持続性を担保する方策を提出する。対象生薬とその具体的な目的は次のとおり。

(1) 認知症の改善が期待される生薬

① 石菖蒲：中国の現地調査で収集した *Acorus* 属植物及び生薬（四川省・重慶市産の道地薬材を含む）について、神経突起伸張作用成分の含量が高く、一方変異原性が報告されている β -asarone の含量が低い chemotype を探索する。また、chemotype と遺伝子型または産地との関連性を明らかにする。中国及び周辺諸国産の菖蒲も同様に検討する。

② 刺五加：神経突起伸張作用成分を同定した後、それらの含量の変動を中国東北地方産 *Eleutherococcus* 属植物で明らかにする。また、同類の *Acanthopanax* 属植物及び五加皮類を収集し、同様に成分含量を調べ、有用性を検討する。活性化合物等の記憶障害改善作用を、アルツハイマー病モデルマウスを用いた実験で明らかにする。

(2) 生活習慣病の改善が期待される生薬

芍薬と牡丹皮：中国産の白芍（亳白芍、川白芍、杭白芍）と赤芍（多倫芍薬）、日本で開発された芍薬（大和芍薬）、中国及び日本産の牡丹皮を調査・収集し、品質上の多様性を遺伝子型、成分組成・含量、糖尿病モデルラットを用いた動脈硬化進展抑制効果などから明らかにする。さらに園芸用の品種について、分子系統学的な整理を行った後、成分・薬理研究を同様に行い、生薬としての使用の可否を明らかにする。その他、*Curcuma*

属、*Salacia* 属生薬などを検討する。

3. 研究の方法

(1) 学術調査

平成 21 年度は中国、22 年度はインドネシアと中国、23 年度はベトナムとインドで、現地の研究協力者の同行のもと、対象とする生薬の産地を訪れ、関連する薬用植物の野生資源状況または栽培状況を調査し、植物及び生薬を収集した。植物の採集地点は GPS により記録した。また、現地のハーバリウムで植物標本を閲覧し、植物の同定に役立てた。

(2) 遺伝子解析

生薬の資源植物の葉または用部から DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出し、これを鋳型として核 rDNA の ITS 領域、葉緑体 DNA の *trnK* 遺伝子または *trnK-rps16* spacer 領域を PCR 法で増幅した。得られた PCR 産物を精製後、シーケンシング反応を行い、直接塩基配列を決定した。生薬材料についても同様。次に、植物及び生薬材料の塩基配列に基づき系統樹を構築した。

(3) 活性成分の探索と成分分析

① 石菖蒲類：1) 石菖蒲メタノールエキスを各種溶媒で分配し、ラット大脳皮質神経細胞を $A\beta(25-35)$ で処置する系を用いて神経突起再伸張作用を調べた。活性画分から化合物を単離し、 1H 及び ^{13}C NMR、MS などの機器分析により構造決定した。また化合物の活性を調べた。2) *Acorus* 属植物の根茎または生薬材料の粉末をアセトンで超音波抽出し、GC で分析した。また、アセトンエキスをカラムで分画し、分取 HPLC を用いて主要化合物を単離、同定した。

② 刺五加類：1) 刺五加メタノールエキスを各種溶媒で分配し、①と同じ系を用いて軸索萎縮抑制作用を調べた。活性画分から化合物を単離し、各種機器分析により構造決定するとともに、化合物の活性を調べた。2) *Eleutherococcus* 属植物 2 種の根茎及び茎における活性成分の含量を HPLC 法で測定した。定量は絶対検量線法によった。3) *Acanthopanax* 属植物に由来する五加皮及び紅毛五加皮のメタノールエキスを HPLC 法で分析し、活性成分を定量した。

③ 芍薬：*Paeonia* 属植物の根または生薬材料の粉末を 75% エタノールで超音波抽出した後、遠心分離し上澄み液を分取する操作を 3 回行い、それらを合わせて試料溶液として、HPLC で分析した。8 成分（*paeoniflorin*, *albiflorin*, *pentagalloylglucose*, *methylgallate*, (+)-*catechin*, *gallic acid*, *benzoic acid*, *paeonol*）の定量は絶対検量線法によった。

(4) 薬理作用の検討

① 抗認知症作用：1) 初代培養したラット大脳皮質神経細胞に、アミロイド β の活性部分配列 $A\beta(25-35)$ 10 μ M を処置し、軸索と樹状

突起の萎縮を誘発させた。石菖蒲メタノールエキスの場合はこれと同時にあるいは4日後に、各画分(10, 100 µg/mL)または単離した化合物(0.01, 0.1, 1, 10 µM)を処置した。刺五加メタノールエキスの場合は、各画分(0.1, 1, 10, 100 µg/mL)または単離した化合物(1, 10 µM)を Aβ(25-35)と同時に処置した。これら画分や化合物の、Aβ(25-35)による神経突起萎縮に対する抑制作用(同時処置の場合)、及び再伸展作用(後処置の場合)を検討した。マーカータンパク質(軸索:リン酸化型 NF-H、樹状突起:MAP2)に対する免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で画像を取得した。1 処置につき6箇所(6画分)の画像を得、各画像中の各神経突起の長さの総和と神経細胞の数を画像解析ソフトにより測定し、神経細胞1個あたりが伸展する突起の平均長を算出した。NGFをポジティブコントロールとした。2) Calpain 酵素活性に対する直接的な阻害作用を Calpain-Glo Protease Assay kit を用いた cell-free 系のアッセイにより検討した。酵素活性阻害のポジティブコントロールには、calpain の特異的阻害剤 MDL28170 を用いた。3) アルツハイマー病モデルマウス 5XFAD トランスジェニックマウス(8-5ヵ月齢 5xFAD、雌性及び雄性、n = 5-6)に、*E. senticosus* から単離した eleutheroside B、eleutheroside E または溶媒を連続経口投与した(30 µmol/kg、31回)。対照の野生型マウスには溶媒を投与した。自発運動量は open field test で評価した。記憶能力は object recognition test により評価し(インターバル時間 30分)、テストセッションでの新奇物体への探索行動の程度を表す Discrimination Index (DI) %を算出した。

② 生活習慣病改善作用: 1) 糖尿病性細小血管症進展抑制作用: 7週齢 Wistar 系ラットに STZ を腹腔内投与し、血糖値を測定して糖尿病の発症を確認した上で、生薬エキスを連日強制投与した。2週間後に麻酔下で静脈血を採取し、血小板数・血小板上 CD62P (P-selectin) 陽性率、及び血小板由来マイクロパーティクルを測定した。2) ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) 阻害活性: DPP(IV) Inhibitor Screening Assay Kit を用い、生薬エキスなどの阻害活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 石菖蒲類

石菖蒲(石菖根)は、鎮痛、鎮静、健胃、駆虫薬などとされ、その基源として日本では *A. gramineus*、中国では *A. tatarinowii* の根茎が規定される。一方、*A. calamus* の根茎に由来する菖蒲は、中国での使用は少ないが、インドで腹痛、嘔吐、記憶力低下などに汎用され、中国産に比し β-asarone 含量が高いとされる。これまでの研究で、石菖蒲の熱水抽出エキスに軸索及び樹状突起の再伸展作用を見出し

た。β-asarone は PC12 細胞において Aβ 誘発細胞死に対して抑制作用を示すとされている一方、ラットへの経口投与(500 mg/kg、2年間)で平滑筋肉腫や肝細胞腫瘍が観察されることなども報告されている。

① 石菖蒲の神経突起再伸展作用成分の同定: Aβ(25-35)の神経細胞への処置と同時に、メタノールエキスの溶媒分配画分を処置した。Aβ(25-35)処置によって軸索及び樹状突起の長さは有意に減少したが、エーテル及び酢酸エチル画分が 100 µg/ml の濃度で軸索と樹状突起の長さを増加させた。水溶性画分は 10 µg/mL の濃度で軸索及び樹状突起を有意に伸展させたことから、この画分をさらに分画し、4化合物を単離した。それらの活性を、β-asarone、α-asarone 及び NGF と比較した。Aβ(25-35)と化合物の同時処置では、β-asarone、α-asarone と4化合物はいずれも有意に樹状突起の萎縮を抑制した。Aβ(25-35)処置の4日後に化合物を処置した場合では、β-asarone、α-asarone には神経突起再伸展作用は認められなかったが、2化合物には比較的濃度依存的な神経突起再伸展作用が認められた。

② 遺伝的多様性: 中国の安徽、浙江、重慶、湖南、湖北省で収集した *Acorus* 属3種41検体及び石菖蒲類17検体について、rDNA の ITS 領域の遺伝子解析を行った結果、ITS1・5.8S rDNA・ITS2 領域は 724~749 bp であった。*A. tatarinowii* には8タイプ、*A. gramineus* には3タイプの遺伝子型が認められ、種内多型があった。*A. calamus* は全て同一の遺伝子型であった。NJ法による系統樹では、*A. tatarinowii* と *A. gramineus* (重慶市産)はそれぞれ異なるクレードを形成し、さらに *A. tatarinowii* は2つのサブクレード(安徽・浙江省産と重慶市産)に区別された。日本で *A. gramineus* とされてきた植物は、浙江省産 *A. tatarinowii* と同じ遺伝子型であった。

③ 成分的多様性: *A. tatarinowii* と *A. gramineus* の主要なピークとして β-asarone と euasarone を同定した。Chemotype として、ほぼ β-asarone のみ、2(-4)成分が存在するもの、他の成分も認められるものなどがあり、安徽省、浙江省、重慶市産の *A. tatarinowii* はそれぞれ異なる GC パターンを示し、遺伝子型による分類と関連した。*A. gramineus* でも2~4成分が認められたが、β-asarone や euasarone は少なかった。安徽省産 *A. calamus* は β-asarone が主であり、インド、インドネシア、ベトナム産 *A. calamus* と類似した。

以上、*Acorus* 属植物の ITS 領域の塩基配列から石菖蒲類の同定と産地の推定を可能にし、また、遺伝子型による分類と chemotype との間に関連性を見出した。日本に流通する石菖根は安徽省産 *A. tatarinowii* で、精油成分はほぼ β-asarone のみであった。古来、石菖蒲は根茎の節が密に認められるものが最上品

とされ、このものは *A. gramineus* と考えられる。今後、重慶市産の同種のエキスについて、神経突起再伸展作用を検討する予定である。

(2) 刺五加・五加皮

Eleutherococcus senticosus (= *Acanthopanax senticosus*) の根茎及び根に由来する刺五加は、極東アジアで強壯薬にされる。中国東北地方では *E. sessiliflorus* も刺五加として使用されるが、正品は *E. senticosus* であり、鑑別法として ITS 領域の遺伝子多型に基づく方法が報告されている。一方、同類の *A. gracilistylus* などの根皮は五加皮と称して、強壯、利尿、去湿、鎮痛薬とされる。これまでの研究で *E. senticosus* に由来する刺五加のメタノール及び熱水抽出エキスに、軸索及び樹状突起伸展、シナプス再形成、細胞死抑制作用を明らかにしている。

① 刺五加の神経突起萎縮抑制作用成分の同定： $\text{A}\beta(25-35)$ の神経細胞への処置と同時に、メタノールエキスの溶媒分配画分を処置したところ、酢酸エチル、*n*-ブタノール及び水画分が 1–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で有意な軸索萎縮抑制作用を示した。酢酸エチル及び *n*-ブタノール画分をさらに分画し、17 化合物を単離、同定した。その内の 12 化合物を $\text{A}\beta(25-35)$ と同時に神経細胞に処置したところ、eleutheroside B、eleutheroside E 及び isofraxidin が 1 μM または 10 μM で有意に軸索と樹状突起の萎縮を抑制した。また、isofraxidin 7-*O*-glucoside も isofraxidin よりやや活性が弱いものの、有意な軸索・樹状突起萎縮抑制作用を示した。

② 遺伝的多様性：中国東北地方産 *E. senticosus* 約 80 検体の *trnK* イントロンの塩基配列は 2506 bp または 2519 bp で、16 箇所の塩基置換と 1 箇所の挿入があり、14 タイプの遺伝子型が認められた。一方、*E. sessiliflorus* の遺伝子型は 2 タイプのみで、*E. senticosus* との間に 10 箇所の塩基置換が認められ、2 種を鑑別できることが明らかになった。次に、刺五加と五加皮の遺伝的類似性を調べる目的で、安徽、浙江、江蘇、陝西省で収集した *A. gracilistylus* の野生品、栽培品及び五加皮市場品の ITS 領域の塩基配列を解析した。野生の *A. gracilistylus* に固有な塩基配列が明らかになり、*E. senticosus* 及び *E. sessiliflorus* とそれぞれ 17 箇所及び 12 箇所の塩基置換が認められた。

③ 成分的多様性：*E. senticosus* と *E. sessiliflorus* の根茎及び茎について、神経突起萎縮抑制作用を示した 3 化合物を定量した結果、*E. senticosus* の根茎には通常 eleutheroside B > eleutheroside E > isofraxidin の順に含有され、産地により、eleutheroside B は 0.004–0.258%、eleutheroside E は 0.004–0.127% と変動し、黒竜江省北西部及び吉林省東部の

ものが高含量であった。一方、*E. sessiliflorus* の根茎には eleutheroside E のみが検出された。*E. senticosus* の茎にも 3 成分が認められたが根茎より低含量であった。次に、五加皮 (*A. gracilistylus* の根皮) 及び紅毛五加皮 (*A. leucorrhizus* var. *fulvescens* の樹皮) のメタノールエキスの HPLC クロマトグラムを刺五加 (*E. senticosus* の根茎) と比較した。五加皮は刺五加と類似したクロマトグラムを示し、eleutheroside B と eleutheroside E の含量も刺五加に匹敵した。紅毛五加皮にも 2 成分が検出されたが、eleutheroside B は低含量であった。

以上から、黒竜江省北西部などに産する *E. senticosus* の根茎に由来する刺五加が高品質であり、また *A. gracilistylus* に由来する五加皮も刺五加と同様の目的で使用可能であることが判明した。ただし、2 種ともに野生資源量が少なく、早急な栽培化が求められる。

(3) 芍薬

Paeonia lactiflora に由来する芍薬は鎮痛、鎮痙、収斂薬として、一般用漢方処方約 1/3 に配合される。近年、日本で開発された薬用品種の他に、園芸用の品種も薬用に供されている。また、中国産白芍の使用量も多い。中国の芍薬は白芍と赤芍に区別され、白芍は鎮痙・鎮痛薬、赤芍は活血化瘀薬とされる。赤芍の基源種には *P. veitchii* も含まれるが、大多数が白芍と同じ *P. lactiflora* であり、白芍との区別点は加工法 (修治) の違いであるとされてきた。そこで、中国産の白芍と赤芍、日本産芍薬の違いを明らかにし、次に園芸品種の薬用への応用を検討した。

① 遺伝的多様性：*Paeonia* 属植物 4 種、*P. lactiflora* の園芸用及び薬用約 80 品種、日本産芍薬、中国産の白芍と赤芍について、ITS 領域の塩基配列を解析した結果、ITS1・5.8S rDNA・ITS2 領域は 653 bp であった。*P. lactiflora* では種内多型が顕著で、全検体にヘテロ型の配列を示す箇所が認められ、交配が行われてきたことが示唆された。多重配列アラインメント ClustalW 法における案内木 (“系統樹”) では、*P. lactiflora* は 1 つのクレードを形成し、姉妹群を形成した *P. veitchii* と *P. anomala* から区別された。*P. lactiflora* のクレードはさらに 2 つのサブクレード (I、II) に分けられ、日本産芍薬と中国産白芍は同じサブクレード I に属し、サブクレード II に属した中国内モンゴル産赤芍と区別された。富山県で系統保存されている園芸品種も各サブクレードに分けられた。また、I (白芍系) と II (赤芍系) を区別する塩基配列として、上流から 69 番目、458 番目及び 523 番目の塩基が重要であることが明らかになった。一方、*matK* 遺伝子の塩基配列は種内で安定しており、各種に固有な配列が認められた。なお、四川省産赤芍のみ *P. veitchii* 基源であった。

② 成分的多様性： *Paeonia* 属植物 3 種及び富山県の系統保存品種の根、生薬について、薬効に関与する 8 成分を定量した結果、 *P. veitchii* 及び同種基源の赤芍で、 *paeoniflorin* (PF)、 *pentagalloylglucose*、 *gallic acid* が高含量であった。 *P. lactiflora* に由来する芍薬では、中国産赤芍に *paeonol* が検出され、また PF、 (+)-catechin (CC) ともに白芍より高含量であった。日本産芍薬は中国産白芍と類似した成分組成を示した。定量結果について主成分分析を行い、また自己組織化マップにより解析することにより、薬用の白芍または赤芍として使用可能な園芸品種を数種類見出した。さらに栽培年数による成分変動も検討して、品種を選択した。

以上、中国の *P. lactiflora* には 2 系統があり、その分布地域から南方系と北方系に分けられた。南方系の *P. lactiflora* の根が白芍、北方系の同種の根が赤芍として使用され、後者に PF と CC が多く含有されていた。日本の芍薬は、遺伝的にも成分的にも南方系 *P. lactiflora* の系統であった。園芸品種には両系統が見られ、その中から薬用の白芍、赤芍として使用可能であると考えられる品種を数種類選択できた。現在、富山県と協力してこれらの品種の増殖を図っている。

(4) *Salacia* 属植物の遺伝的多様性

近年、 *Salacia* 属植物の根や幹に由来するアーユルヴェーダ生薬（日本ではサラシアと総称）に、抗糖尿病、抗肥満、肝保護作用が報告され、健康食品素材として注目されている。基源種は、 *S. reticulata*、 *S. oblonga*、 *S. chinensis* とされているが、生薬の外形から種を同定することは困難で、生薬の効果に変動を生じさせる原因となっている。また、資源の減少も危惧されている。そこで、サラシアの品質を担保し、また今後の資源開発に寄与する目的で、インド、スリランカ及びタイで収集した *Salacia* 属植物と生薬及び日本市場の流通品について、ITS 領域及び *trnK-rps16 spacer* 領域の塩基配列を解析し、遺伝的多様性を検討した。その結果、2 つの領域それぞれに 5 タイプの塩基配列が見出され、 *Salacia* 属植物 3 種に固有な配列が明らかになった。これに基づき日本市場の流通生薬を同定したところ、主流品はインド産が *S. chinensis*、スリランカ産が *S. reticulata* であり、 *S. oblonga* を基源とするものは少なかった。

(5) 抗認知症作用

アルツハイマー病の発症の原因としては、 *amyloid β* (Aβ) ペプチドが不溶化して凝集・蓄積することが引き金となり、 *amyloid plaque* の形成、神経細胞の減少、神経突起の萎縮、シナプスの脱落が生じ、記憶障害に至るといったアミロイド仮説が現在最も支持されてい

る。このアミロイド仮説に基づいたアルツハイマー病の創薬研究が盛んに行われているが、原因物質である Aβ を減少させても記憶の改善には不十分であることが種々の臨床データから示唆されている。一方我々は、アルツハイマー病脳内の生き残った神経細胞を再賦活化させ、正常な神経回路網を再構築させることで脳内の機能を改善することができれば、神経組織が変性した状態からでも正常な記憶能力を取り戻すことが可能であると考え、培養神経細胞での神経突起萎縮抑制作用を指標にして、生薬エキスや単離化合物の活性を評価してきた。神経突起伸展作用を特に示す化合物に関しては、アルツハイマー病モデル 5XFAD マウスを用いた記憶障害改善作用を検討することとした。

そこで、これまでの培養神経細胞を用いた実験で有意な神経突起萎縮抑制作用が認められた刺五加の成分の *eleuteraside B* と *eleuteraside E* について、5XFAD マウスの物体認知記憶障害に対する作用を明らかにするため、それぞれ 30 μmol/kg の用量で連続経口投与を行った。トレーニングセッションでの DI 値は、群間の差はなかった (-0.9 - 3.1%)。野生型マウスではすべての個体でテストセッションでの DI 値が上昇しその平均値は 36.9% と有意な増加を示し、物体を記憶していることが示された。一方、5XFAD マウス溶媒投与群では、トレーニングとテストセッションの DI 値に有意差が見られず、物体認知記憶の障害が示された。これに対し 5XFAD マウス *eleuteraside B* 投与群では、テストセッションでの有意な DI 値の増加が認められた (19.5%)。5XFAD マウス *eleuteraside E* 投与群では有意な変化が見られなかった。自発運動量は、群間での差は見られなかった。以上の結果は、 *eleuteraside B* がアルツハイマー病における物体認知障害に対して改善効果を有することを示している。現在、脳内の組織学的解析や、 *eleuteraside B* の作用機序について検討中である。

一方、 *amyloid plaque* 近傍では、カルシウムイオンの過剰な細胞内流入に伴い活性化型となった *calpain* が、細胞骨格、核及び細胞質タンパク質の破壊による細胞内機能不全や、Tau リン酸化を経た細胞死をもたらすことが知られている。そこで、 *calpain* 酵素活性に対する、刺五加、紅毛五加皮及び石菖蒲のメタノールエキスと熱水抽出エキスの直接的な阻害作用を *cell-free* 系のアッセイにより検討した。その結果、紅毛五加皮メタノールエキスのみで 100 μg/ml で比較的強い *calpain* 抑制活性が認められた。

(6) 生活習慣病改善作用

本邦では生活習慣の欧米化により糖尿病患者は増加の一途を辿っており、その発症を

予防する薬剤や合併症である糖尿病性腎症、神経障害、網膜症に関わる細小血管症を予防する薬剤の開発が急務である。そこで、STZ誘発糖尿病ラットに芍薬及び牡丹皮の熱水抽出エキスを10 mg/100g BWの用量で連日2週間投与して、血小板活性化抑制作用を検討した。しかし作用は認められなかった。次に、各種生薬の熱水抽出エキス及び漢方方剤エキスについて、ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) 阻害活性を検討した。その結果、生薬ではサフラン、丁字、山梔子、黄連、黄柏、漢方方剤では黄連解毒湯、茵陳蒿湯、温清飲、半夏厚朴湯、小柴胡湯の順に阻害活性を示したが、芍薬エキスでは阻害活性が弱かった。さらに、インド、スリランカで糖尿病などに応用される *Salacia reticulata* 及び *S. chinensis* の根の熱水及びメタノールエキスについても検討したところ、メタノールエキスのみに軽度の DPP-4 阻害活性が認められ、また、*S. reticulata* が *S. chinensis* に比較してやや活性が強いことが示された。メタノールエキスの酢酸エチル画分より水画分で活性が強かったことから、今後この画分から化合物を単離し、活性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Bai Y. J., Tohda C., Zhu S., Hattori M., Komatsu K.: Active components from Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) for protection of amyloid β (25-35)-induced neuritic atrophy in cultured rat cortical neurons. *J. Nat. Med.*, 65: 417-423, 2011. 査読有
- ② Zhu S., Bai Y. J., Oya M., Tanaka K., Komatsu K., et.al.: Genetic and chemical diversity of *Eleutherococcus senticosus* and molecular identification of Siberian ginseng by PCR-RFLP analysis based on chloroplast *trnK* intron sequence. *Food Chemistry*, 129: 1844-1850, 2011. 査読有
- ③ Kitani Y., Zhu S., Batkhuu J., Sanchir C., Komatsu K.: Genetic diversity of *Ephedra* plants in Mongolia inferred from internal transcribed spacer sequence of nuclear ribosomal DNA. *Biol. Pharm. Bull.*, 34: 717-726, 2011. 査読有
- ④ Oka H., Goto H., Koizumi K., Nogami T., Watari H., Nakamura S., Zhou Y., Sakurai H., Shibahara N., Saiki I., Shimada Y.: Cinnamaldehyde and paeonol increase HIF-1 α activity in proximal tubular epithelial cells under hypoxia. *J. Trad. Med.*, 28: 149-157, 2011. 査読有

[学会発表] (計17件)

- ① Tanaka K., Komatsu K.: Quantitation of Curcuminoids in Curcuma Rhizome by

Near-infrared Spectroscopic Analysis. The 2nd International Symposium on Temulawak and The 40th Meeting of National Working Group on Indonesian Medicinal Plant, 2011, 5, 26-27, Bogor, Indonesia.

- ② Zhu S., He J. Y., Komatsu K., Samarakoon S. P., Nagatomo A., Nishida N., Matsuura Y.: Molecular identification of *Salacia* plants and the related crude drugs based on DNA sequence of two non-coding regions. The 6th JSP-CCTCNM-KSP International Conference on Pharmacognosy, 2011, 10, 21-22, Shengyang, China.
- ③ Bai Y. J., Zhu S., Tohda C., Komatsu K.: Effect of *Acori Graminei* Rhizoma on $A\beta$ (25-35)-induced atrophies of axons and dendrites. 日本薬学会第130年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- ④ 吳煜秋, 朱姝, 小松かつ子, 村上守一, 田中彰雄, 柴田敏郎: 芍薬の成分的多様性の解析. 第27回和漢医薬学会学術大会, 2010, 8, 28-29, 京都.
- ⑤ Bai Y. J., Zhu S., Tohda C., Komatsu K.: Active components of Siberian ginseng for protection of amyloid β (25-35)-induced neuritic atrophy in cultured cortical neurons. 日本薬学会北陸支部第122回例会, 2010, 11, 21, 金沢.

[その他]

ホームページ等

<http://www.inm.u-toyama.ac.jp/pharmacognosy/index-j.html>

http://www.inm.u-toyama.ac.jp/jp/departments/01_pharmacognosy.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 かつ子 (KOMATSU KATSUKO)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号: 50225570

(2) 研究分担者

田中 謙 (TANAKA KEN)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 60418689
東田 千尋 (TOHDA CHIHIRO)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 10272931
柴原 直利 (SHIBAHARA NAOTOSHI)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号: 10272907

(3) 連携研究者

朱 シュウ (ZHU SHU)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教
研究者番号: 20377360