

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06721

研究課題名（和文）漢方処方における生薬間相互作用の解析

研究課題名（英文）Interaction of crude drugs for Kampo formula

研究代表者

成川 佑次（Narukawa, Yuji）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・講師

研究者番号：50348611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：漢方処方における生薬配合の意味を明らかにするために桔梗湯関連処方における抗炎症活性および五苓散における脂肪細胞分化に対する影響について解析を行った。桔梗湯関連処方においてはキキョウ量が増えるに従ってカンゾウの主成分であるグリチルリチン酸量が減少し、それに伴って抗炎症活性も減弱することが判明した。五苓散ではn-ヘキサン抽出物に脂肪細胞分化抑制活性が認められ、タクシャの成分が活性に寄与していた。特に11-deoxyalisol Bは脂肪細胞分化初期に働くC/EBP β の発現を顕著に抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本において漢方薬は原典となる医学書の記述に基づき個々の生薬の配合比はある程度決められている。しかし、その生薬の配合に関して科学的に検証した研究は少ない。桔梗湯はキキョウとカンゾウの2つの生薬から構成される漢方処方であるが、配合比を変え、キキョウの量は増加させることによって有効成分の減少や抗炎症活性が減弱し、標準的な配合比が最も高い活性を示した。五苓散についても脂溶性成分に脂肪細胞分化抑制活性があることから生薬の粉末を混合した散剤として服用する方がより効果的である可能性が示された。これらの知見は漢方処方の科学的理解につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the meaning of crude drugs in Kampo formulas, we analyzed the anti-inflammatory activity of Kikyoto-related Kampo formulas and the effect of Goreisan on adipocyte differentiation. It was suggested that in the Kikyoto-related formulas, the amount of glycyrrhizic acid, which is the main component of licorice, decreases as the amount of Platycodon root increases, and the anti-inflammatory activity also decreases accordingly. In Goreisan, adipocyte differentiation inhibitory activity was observed in the n-hexane extract, and it was clarified that the component of Alisma root contributed to the activity. In particular, 11-deoxyalisol B was found to remarkably suppress the expression of C/EBP β , which acts in the early stage of adipocyte differentiation.

研究分野：生薬・天然物化学

キーワード：漢方処方 桔梗湯 五苓散 抗炎症活性 脂肪細胞分化

1. 研究開始当初の背景

漢方薬は古代中国に起源を持つ漢方医学において治療に用いられる薬剤であり、漢方医学の考え方に基づいて決まった量の生薬を複数組み合わせたもの(漢方処方)を各種疾患の治療や予防に用いるのが基本である。漢方薬の治療効果についてはエキス剤の開発とともに信頼性の高いエビデンスが集積されつつある。また、漢方薬を構成する個々の生薬の成分についても機器分析の発展とともに明らかになりつつある。しかし、生薬を複数組み合わせた時の抽出量および成分組成の変化に関する研究は少ないのが現状である。研究代表者らのグループは漢方処方の一つ、黄連解毒湯の処方解析を行ない、オウゴン、オウレン、オウバクの成分が複数の作用点で相乗的に働き抗炎症活性を示すとともに、サンシシが活性成分の溶解性の向上に寄与していることを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では漢方処方として用いられる生薬の組み合わせによって起こる成分組成の変動とそれに伴う生物活性の変化について解析することを目的としている。複数の生薬が混在することによって抽出される成分の溶解性が変化し、沈殿や吸着などが起こるとともに成分によっては溶解補助に働く可能性がある。さらには成分組成が変化すれば抗炎症活性などの生物活性にも変化が起こることが考えられる。本研究では比較的処方構成の簡単な咽喉の炎症に用いられる漢方処方である桔梗湯関連処方と浮腫など水滞の治療に用いられる苓朮剤、特に生薬の粉末を混合してそのまま服用する五苓散に着目して検討を行うこととした。これらの生薬配合の意味は漢方薬を理解するうえで重要であり、より適切な漢方治療につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 桔梗湯関連処方における気道炎症抑制活性の解析

桔梗湯はキキョウとカンゾウから構成される漢方処方であり、その関連処方としてカンゾウのみからなる甘草湯およびキキョウとセッコウから構成される桔梗石膏がある。いずれも咽喉の炎症に用いることになっている。これらの処方において生薬の配合比を変えて煎剤を調製し、HPLCによる分析を行う。その際、桔梗湯であればカンゾウの量を一定にしてキキョウの添加量を段階的に変化させ、桔梗石膏の場合はキキョウの量を一定としてセッコウの量を変化させて分析し、共存生薬による成分組成への影響を明らかにする。また、得られた抽出物について気道炎症のモデルとしてヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B を用いてリポ多糖(LPS)誘導による炎症性サイトカインの産生抑制活性について ELISA 法による検討を行う。

(2) 苓朮剤における脂肪細胞分化に対する影響

苓朮剤はブクリョウとビャクジュツまたはソウジュツを主構成生薬とする漢方処方群であり、代表的なものに五苓散(タクシャ、チョレイ、ブクリョウ、ソウジュツ、ケイヒ)がある。本研究では生薬の粉末をそのまま散剤として服用する五苓散について各種溶媒で抽出を行う。得られた抽出物はマウス線維芽細胞株 3T3-L1 を用いた dexamethasone、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、insulin 添加による脂肪細胞分化への影響について oil red O による脂肪滴の蓄積や培地中の残存グルコース量の測定を行うことで評価を行う。さらに関与成分を明らかにするために各種クロマトグラフィーにより成分を単離し、成分レベルでの活性評価およびそのメカニズムを明らかにするためにリアルタイム PCR による関連遺伝子の発現変化およびウエスタンブロッティングによるタンパク発現量の変化について検討を行う。

4. 研究成果

(1) 桔梗湯関連処方における気道炎症抑制活性の解析

桔梗湯における配合比の変化による成分量の変化を解析するため、カンゾウ量を 3g に固定した上でキキョウ量を 0, 2, 4, 6g と配合量を増加させた煎液を調製し、その煎液中に含有されるカンゾウの主成分であるグリチルリチン酸を定量したところ、キキョウの量が増加するにしたがって煎液中のグリチルリチン酸量は減少することが明らかとなった (Fig. 1)。

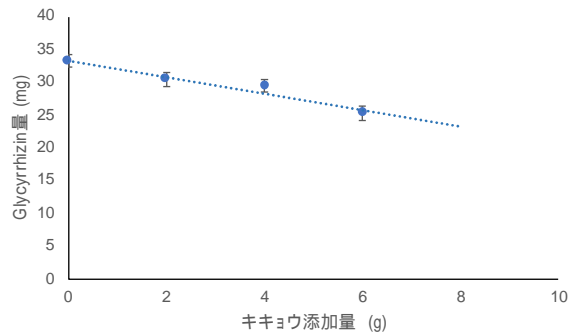


Fig. 1 桔梗湯のキキョウ添加量の変化に対するグリチルリチン酸量の変化

さらに配合比の異なる桔梗湯エキスを用いて、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B における LPS 誘導性 IL-8 産生に対する影響について検討を行ったところ、キキョウの量が増加するに従って細胞毒性が増大するとともに IL-8 分泌抑制活性も減弱した。カンゾウとキキョウの配合比の中ではカンゾウ 3 g、キキョウ 2 g の抽出エキスが細胞毒性を示さない濃度で BEAS-2B 細胞における LPS 誘導性 IL-8 分泌を抑制した。このことは桔梗湯の標準的な配合であるカンゾウ 3 g、キキョウ 2 g が妥当であることを示唆している。

次に、桔梗石膏についてキキョウ量を 3 g に固定した上でセッコウを 0, 5, 8, 10, 12 g と順次増量して煎液を調製し、その煎液中に存在するキキョウの主サポニンである platycodin D を HPLC-ELSD 法により定量した結果、キキョウ単独で抽出した時と比べて大幅に減少し、platycodin D 以外のサポニン成分の量も減少率に差はあるものの全て減少していた。今回の実験ではセッコウの添加量の増加によって溶液の pH の低下が認められ、このことがサポニンの溶出に影響している可能性やサポニンがセッコウ表面に吸着してしまった可能性がある。セッコウの量については 10 g まではサポニン量が減少していくが、それ以降はほぼ変わらない結果となった(Fig. 2)。

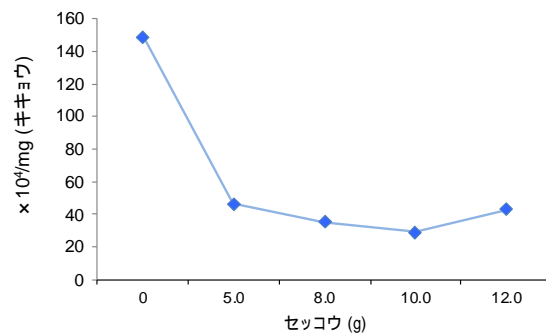


Fig. 2 桔梗石膏におけるセッコウ添加量の変化に対する platycodin D ピーク面積値の変化

上記の操作で調製したキキョウ単独のエキスと桔梗石膏 (キキョウ 3 g、セッコウ 10 g) エキスで BEAS-2B 細胞における LPS 誘導性 IL-8 産生に対する影響を評価したところ、桔梗石膏ではキキョウ単独および桔梗湯エキスよりも活性は弱いものの、コントロールに対して有意に IL-8 産生を抑制しており、さらにキキョウサポニンに基づく細胞毒性が減弱していることが明らかとなった。

(2) 苓朮剤における脂肪細胞分化に対する影響

生薬の粉末を混合して調製された五苓散 (タクシャ末 5 g、チョレイ末 3 g、ブクリョウ末 3 g、ソウジュツ末 3 g、ケイヒ末 2 g) を n-ヘキサン、酢酸エチル、メタノール、水で順次、抽出を行い、各抽出物を調製した。活性評価にはマウス線維芽細胞株 3T3-L1 における dexamethasone、IBMX、insulin 添加による脂肪細胞分化について脂肪滴の蓄積、培地中のグルコース消費量などを指標として検討を行った。その結果、五苓散の n-ヘキサン抽出物のみ脂肪滴の蓄積 (Fig. 3) や培地中のグルコース消費量を減少させた。

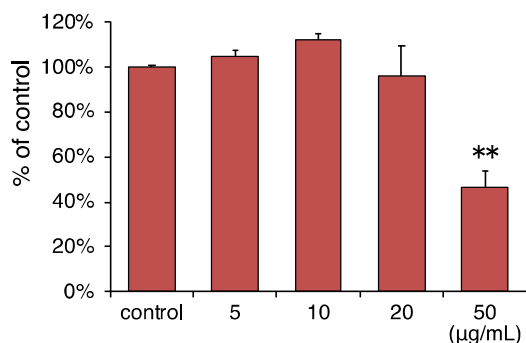


Fig. 3 3T3-L1 細胞における五苓散ヘキサン抽出物添加時の脂肪滴蓄積率

($n=3$, mean \pm S.D.) ** $p < 0.01$ vs control

そこで五苓散の n-ヘキサン抽出物に含まれる成分について分析を行ったところ、タクシャに由来するアリソール A および B, ソウジュツに由来する β -オイデスマールなどの存在が確認され、タクシャが脂肪細胞に分化に対して重要であることが示唆された。そこでタクシャの主要な 5 種のトリテルペノイドを単離し、脂肪細胞分化に対する影響について検討を行ったところ、アリソール B モノアセタートおよび 11-デオキシアリソール B に顕著な脂肪滴生成抑制およびグルコース消費量の減少が認められた。リアルタイム RT-PCR 法による脂肪細胞分化に関連する遺伝子発現について検討を行った結果、11-デオキシアリソール B は転写因子である CCAAT/binding enhancer protein δ (C/EBP δ) の遺伝子発現を抑制し (Fig. 4)、初期から中期の脂肪細胞分化を抑制することが明らかとなった。ウエスタンブロット法によるタンパク質発現解析においても 11-デオキシアリソール B は脂肪細胞分化に重要な働きを示す転写因子である Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ) の発現を抑制していることを明らかにした。

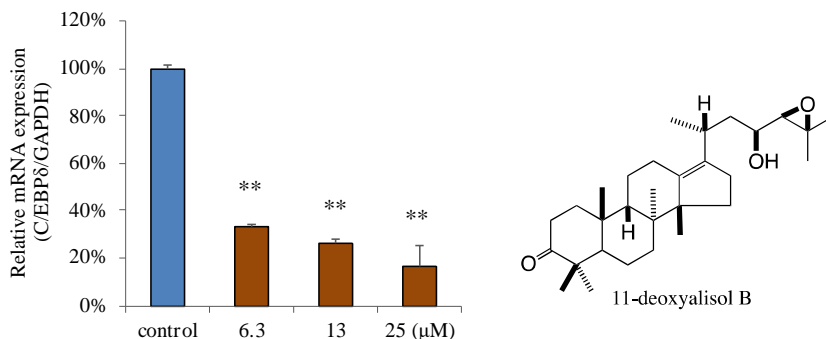


Fig. 4 3T3-L1 細胞における 11-deoxyalisol B 添加による C/EBP δ 遺伝子発現抑制

($n=3$, mean \pm S.D.) ** $p < 0.01$ vs control

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shibata S, Sugiyama T, Uekusa Y, Masui R, Narukawa Y, Kiuchi F	4. 巻 74
2. 論文標題 Five New 2-(2-Phenylethyl)chromone Derivatives from Agarwood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nat Med	6. 最初と最後の頁 561-578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-020-01410-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okoshi K, Uekusa Y, Narukawa Y, Kiuchi F	4. 巻 75
2. 論文標題 Solubility enhancement of berberine-baicalin complex by the constituents of Gardenia Fruit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Nat Med	6. 最初と最後の頁 76-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-020-01446-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kuwada K., Kawase S., Nakata K., Shinya N., Narukawa Y., Fuchino H., Kawahara N., Kiuchi F.	4. 巻 74
2. 論文標題 LC-MS analysis of saponins of Achyranthes root in the Japanese market	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 135-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-019-01355-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirakawa R, Ishikawa S, Takahashi M, Ueno Y, Uekusa Y, Narukawa Y, Sugai T, Kiuchi F	4. 巻 73
2. 論文標題 Preparation of menisdaurigenin and related compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 236-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-018-1235-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshima N, Shimizu N, Narukawa Y, Hada N, Kiuchi F	4. 巻 72
2. 論文標題 Quantitative analysis of the anti-inflammatory activity of orengedokuto II: berberine is responsible for the inhibition of NO production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 706-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1209-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama T, Narukawa Y, Shibata S, Masui R, Kiuchi F	4. 巻 72
2. 論文標題 Three new 5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone derivative enantiomeric to agarotetrol from agarwood	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 667-674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1201-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加々美 茉那, 中村 美青, 植草 義徳, 成川 佑次, 嶋田 淳子, 木内 文之
2. 発表標題 シソ科植物由来ジテルペンの抗トリパノソーマ活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成川 佑次, 柴田 峻佑, 杉山 拓司, 増井 涼, 木内 文之
2. 発表標題 ジンコウ (沈香) 由来2-(2-phenylethyl)chromoneのPDE阻害活性
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 有紗、馬場 久子、丸山 瑞、成川 佑次、木内 文之
2. 発表標題 マンケイシの女性ホルモン代謝に対する影響
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大越 一輝、植草 義徳、成川 佑次、木内 文之
2. 発表標題 Berberine-Baicalin複合体の沈殿に対してサンシシ中のCrocicn類が示す溶解活性に関する研究(2)
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会(広島)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野崎 健、成川 佑次、鶴田 侑也、植草 義徳、木内 文之
2. 発表標題 五苓散の脂肪細胞分化に対する影響
3. 学会等名 日本薬学会第139回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------