

漢方薬物治療の効果向上を指向した  
生薬の「薬能」と「品質」に関する科学的評価

2020年

北廣 優実



## 略語一覽

**DNA** deoxyribonucleic acid

**IL** interleukin

**SASP** senescence-associated secretory phenotype

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** hydrogen peroxide

**SA-β-gal** senescence-associated β-galactosidase

**NHDF** normal human of dermal fibroblasts

**qRT-PCR** quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

**mRNA** messenger ribonucleic acid

**GAPDH** glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

**ELISA** enzyme-linked immuno sorbent assay

**UHPLC** ultra high performance liquid chromatography

**HPLC** high performance liquid chromatography

**NMR** nuclear magnetic resonance

**LC/MS** liquid chromatography - mass spectrometry

**PBS** phosphate buffered saline

**UV** ultra violet

**DAD** diode array detector

**MeOH** methanol

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** dichloromethane

## 目次

略語一覧

総論の部

第一章	緒論	3
第二章	生薬・麦門冬の伝統的薬能「滋陰」に対する科学的評価	7
第一節	生薬・麦門冬について	7
第二節	滋陰作用に対する科学的視点からの仮説	8
第三節	細胞老化と SASP	9
第四節	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理による SASP モデル細胞の作製	11
第五節	基原植物のフェノタイプについて	14
第六節	麦門冬メタノール抽出エキスの最適添加濃度の検討	15
第七節	SASP モデル細胞に対する麦門冬メタノール抽出エキスの抗炎症効果	16
第八節	麦門冬メタノール抽出エキスの HPLC profile 分析と主要成分の単離精製	16
第九節	化合物 1-4 の最適添加濃度の検討	19
第十節	SASP モデル細胞に対する化合物 1-4 の抗炎症効果	20
第十一節	SASP モデル細胞に対する漢方薬の抗炎症効果	22
第十二節	総括および考察	24
第三章	瀉下活性成分 multiflorin A を含有するノイバラ <i>Rosa multiflora</i> Thunb. の分布調査と生薬・営実の化学的品質評価法の検討	27
第一節	生薬・営実について	27

第二節	現市場品における問題	28
第三節	日本に自生するノイバラ ( <i>R. multiflora</i> ) の HPLC profile 分析	29
第四節	日本に自生するバラ属ノイバラ節植物の HPLC profile 分析	31
第五節	韓国に自生するノイバラの HPLC profile 分析	36
第六節	長崎県対馬島・壱岐島に自生するノイバラの HPLC profile 分析	41
第七節	営実の化学的品質評価法の検討	44
第八節	総括および考察	47
論文目録		49
謝辞		51
実験の部		
各種測定装置および使用溶媒等		55
第二章の実験		57
第三章の実験		73
引用文献		83



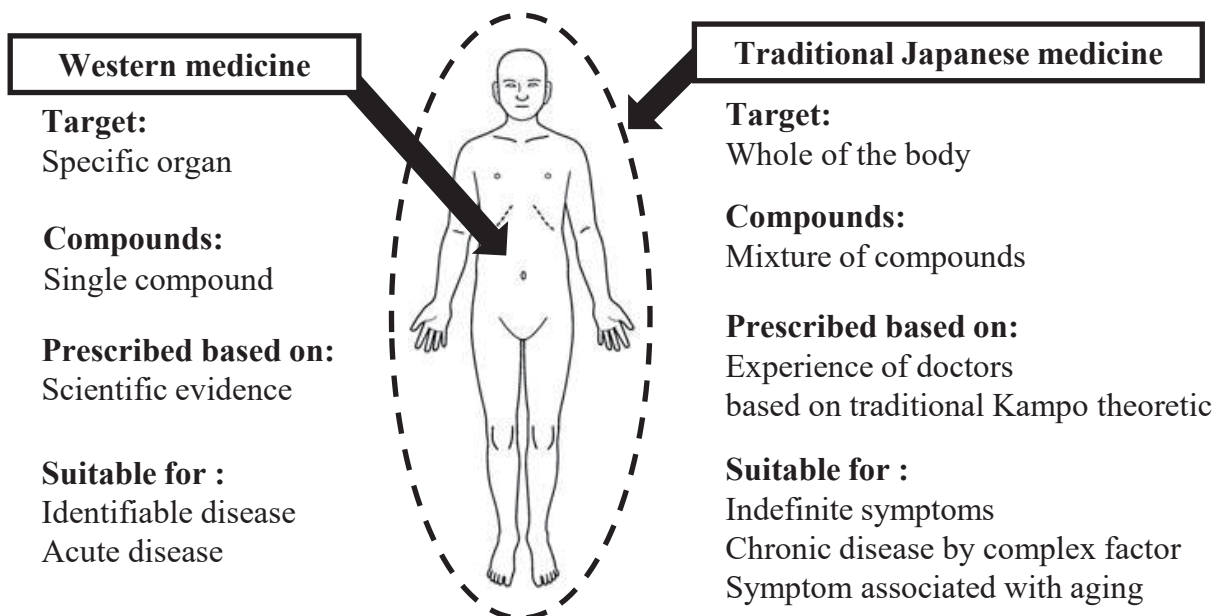
## 総論の部





## 第一章 緒論

漢方薬の主たる特性は、複数の生薬の組み合わせによる相乗効果で作用が発現することである。すなわち、漢方薬は、単一成分で構成される現代医薬品とは大きく異なり、多成分系医薬品であると言える。また、これらの特性を100%発揮させるには、漢方医学的な病態把握が必要となる。近年、臨床において現代医薬品と漢方薬を組み合わせた治療が期待されている。すなわち、現代医療による最新の科学的エビデンスに基づいた治療とともに、原因が特定できない症状や複雑な多数の要因から起こる症状に対して漢方医学的観点からもアプローチすることで、治療の幅は大きく広がり、より良い治療効果が得られると考えられている (Fig. 1-1)。



**Fig. 1-1 Difference between traditional Japanese medicine and Western medicine.**



しかしながら、現代医療において、漢方薬は西洋医学的な考えで一成分一標的のよう  
に取り扱われ、その特性が十分に活かされていない場合が多い。この一因として、漢方  
医学理論が中医学理論や鍼灸学理論に基づいて構築されてきたため、用語が難解で、現  
代医学とは異なる知識が求められることが挙げられる。さらに、漢方薬は生薬の永年の  
臨床経験により構築された「薬能」（生薬の経験的効能。補気、温裏、利水等がある）に  
基づいて創製されていることも一因となっている。筆者は、これら「薬能」に対する科  
学的なエビデンス不足を問題視しており、現代医療において漢方薬を積極的に治療に取  
り入れるためには、伝統的「薬能」の科学的エビデンスに基づく評価が重要である。す  
なわち、「薬能」の科学的エビデンスを構築することが、ひいては漢方薬のエビデンスの  
構築につながると考えている。

一方、その「薬能」は、生薬の品質に大きく左右され、1つの生薬の品質低下は漢方薬  
の効能に大きな影響を与える。天然物である生薬においては、薬効成分や味、におい等  
が均一で、且つ、それらが安定していることが重要となる。

これらの背景より、筆者は、「薬能」の科学的評価の構築および品質の安定した生薬を  
供給するための化学的品質評価法を検討した。伝統的「薬能」の科学的評価については、  
生薬・麦門冬（バクモンドウ）の「薬能」である「滋陰作用」に着目した評価を実施し  
た（第二章）。生薬の化学的品質評価については、近年、その品質の低下が著しい生薬・  
営実（エイジツ）をとりあげ、日本および韓国に自生する基原植物の成分調査と植物学  
的調査を実施した（第三章）。



## 第二章 生薬・麦門冬の伝統的薬能「滋陰」に対する科学的評価

### 第一節 生薬・麦門冬について



**OPHIOPOGONIS RADIX**

**Photo 2-1 *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler**

麦門冬（バクモンドウ，OPHIOPOGONIS RADIX）は第十七改正日本薬局方において、ユリ科ジャノヒゲ *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler (*Liliaceae*) の根の膨大部と規定されている<sup>1)</sup> (Photo 2-1)。麦門冬は、麦門冬湯や清暑益気湯，辛夷清肺湯，温経湯等の医療用漢方エキス製剤に配合される重要生薬であり，特に麦門冬湯は感染後の咳嗽や高齢者の喀痰を伴わない乾性の慢性咳嗽に対して大学病院等の多くの医療機関で頻用されている。

麦門冬の伝統的薬能は「滋陰（じいん）」である。滋陰とは，身体を構成する要素「気・血・水」のうち，「水」を補い身体に潤いを与える働きのことである。また，生薬が作用する臓腑を示したものが「帰経（きけい）」で，麦門冬の帰経は「心・肺・胃」であり，これらの臓腑に潤いを与え機能を改善する。注意点として，漢方医学における肺は，現代医学における肺臓だけでなく皮膚も含んでいる。すなわち，大気と直接触れる人体の器官を意味している。

麦門冬の成分研究においては、*ophiopogonin A*<sup>2)</sup>、*ophiopogonin B*<sup>3)</sup>、*ophiopogonin C*<sup>2)</sup>、*ophiopogonin D*<sup>4)</sup>等のステロイドサポニンや、*metylophiopogonanone A*<sup>5)</sup>、*metylophiopogonanone B*<sup>5)</sup>、*ophiopogonanone A*<sup>5,6)</sup>、*ophiopogonone A*<sup>7)</sup>等のホモイソフラボノイド、ポリサッカライド等が報告されている。また、薬理研究においては、麦門冬水抽出エキスに抗炎症作用<sup>8)</sup>、*ophiopogonin D*に抗酸化作用<sup>9)</sup>や鎮咳作用<sup>10)</sup>、*ophiopogonin B*に抗がん作用<sup>11)</sup>、ポリサッカライド成分に抗糖尿病作用<sup>12)</sup>等が報告されている。一方、伝統的薬能の「滋陰」に対する科学的な研究報告は少なく、薬能に対する科学的なエビデンスに基づく評価が重要な課題である。

## 第二節 滋陰作用に対する科学的視点からの仮説

現代医療における急性炎症は、漢方医学理論（陰陽論）では「過剰な熱（陽）」と捉えることができる。過剰な熱を持った状態においては、清熱生薬（体を冷やす作用）を用いて熱を取り除き、バランスを正常状態に戻す。一方、「過剰な熱（陽）」の存在に伴って「水」が消耗する。この状態は、現代医療では慢性炎症と捉えることができる。すなわち、「水（陰）」の不足によって崩れた体内のバランスに対して、滋陰生薬を用いて「水（陰）」を補うことで身体の正常化を図る（Fig. 2-1）。このような考えから、滋陰作用を有する生薬は、古くから高齢者の咳嗽等、慢性炎症を起因としている病態の治療に対して広く使用されてきた。そこで、滋陰作用を科学的に評価するにあたり、この慢性炎症をターゲットとした。すなわち、最近の研究から、慢性炎症に大きく関与している細胞老化に伴うSASP（第三節）に着目し、滋陰生薬の抗SASP活性を調査した。

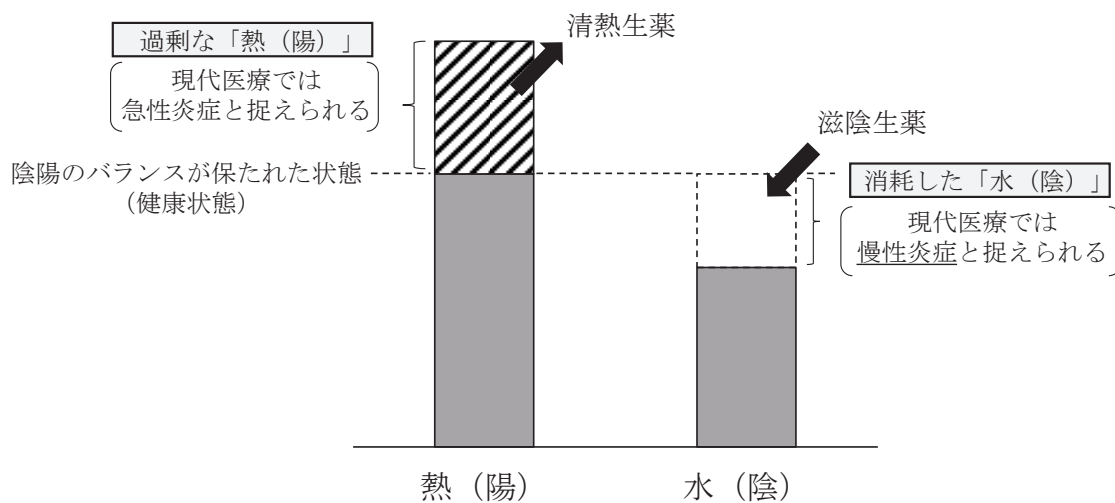


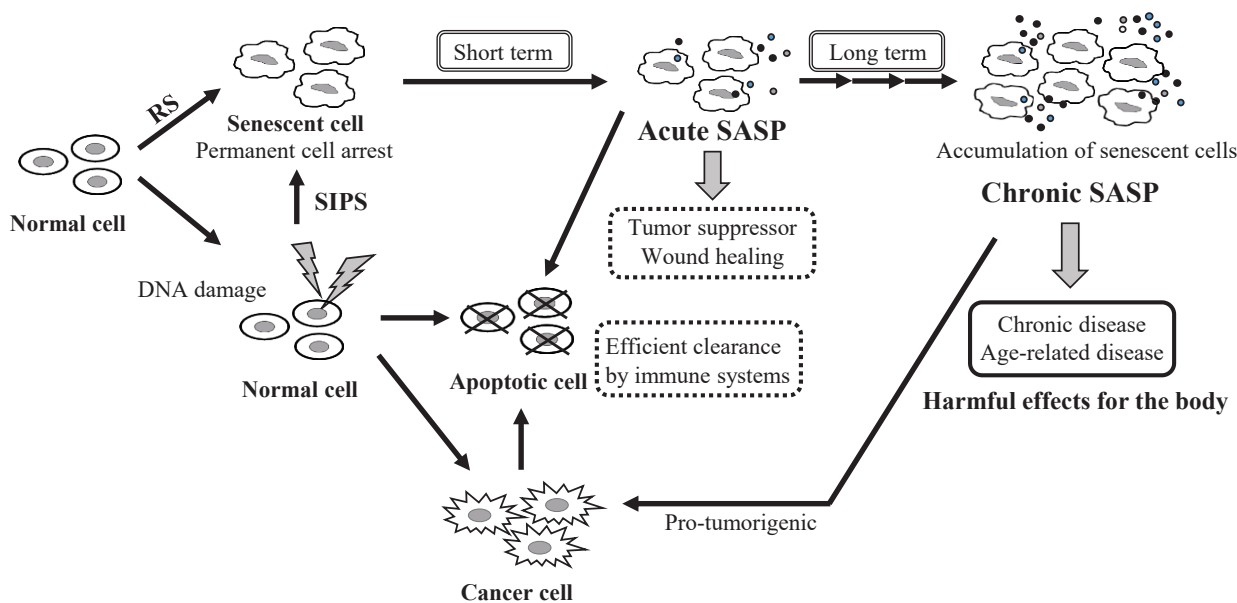
Fig. 2-1 漢方医学における炎症の捉え方

### 第三節 細胞老化と SASP

正常細胞は、一定回数の分裂を繰り返すと分裂限界を迎え恒常的な細胞分裂停止状態に入る。この現象は、染色体のテロメア短縮に起因し、複製老化 (Replicative senescence: RS) と呼ばれる<sup>13)</sup>。また、分裂限界に達する以前においても細胞分裂停止が起こる場合がある。この現象をストレス誘導性細胞老化 (stress-induced premature senescence: SIPS) と呼び、酸化ストレスや紫外線、発がん性物質等の要因によって DNA が損傷を受けた際に起こるとされている<sup>14, 15)</sup>。RS や SIPS はいずれも腫瘍抑制因子として人体に備わっている生体防御機能である。一方、近年、細胞老化に付随して IL-6, IL-8 等の炎症性サイトカインやケモカイン, vascular endothelial growth factor (VEGF) 等の増殖因子, matrix metalloproteases (MMPs) 等が分泌される現象である senescence-associated secretory phenotype (SASP) が明らかとなり、この SASP が慢性炎症性疾患やがんの促進に大きく



関与していると考えられるようになった<sup>16)</sup>。本来、SASPは正常な生体防御機能として腫瘍抑制や創傷治癒に機能し、老化細胞はマクロファージやナチュラルキラー（NK）細胞によって速やかに除去される。しかし、加齢等に伴い生体の免疫機能が低下すると、老化細胞が完全に除去されなくなり、生体内に徐々に蓄積されるようになる。その結果、SASPが長期間にわたり続き、慢性炎症が促進されると考えられている（Fig. 2-2）。



**Fig. 2-2 Schematic diagram of chronic inflammation induced by cellular senescence.**

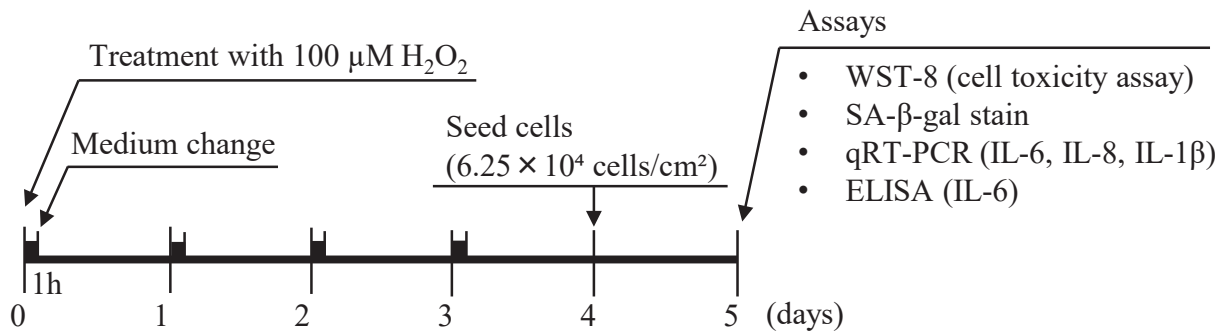
培養細胞系においてSIPSを誘導する方法として、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)による処理や<sup>17-19)</sup>、紫外線照射による処理<sup>20,21)</sup>等が報告されている。これらの方法で誘導した老化細胞においては、細胞分裂速度の低下や細胞形態の変化がみられる。その他、SASPの発現や細胞老化に付随するβ-ガラクトシダーゼ (senescence-associated beta-galactosidase: SA-β-gal) の過剰発現、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターである p16 や p21 の発現レベルの上昇等が報告されており、これらは細胞老化の評価指標となっている<sup>16, 17, 19)</sup>。さ



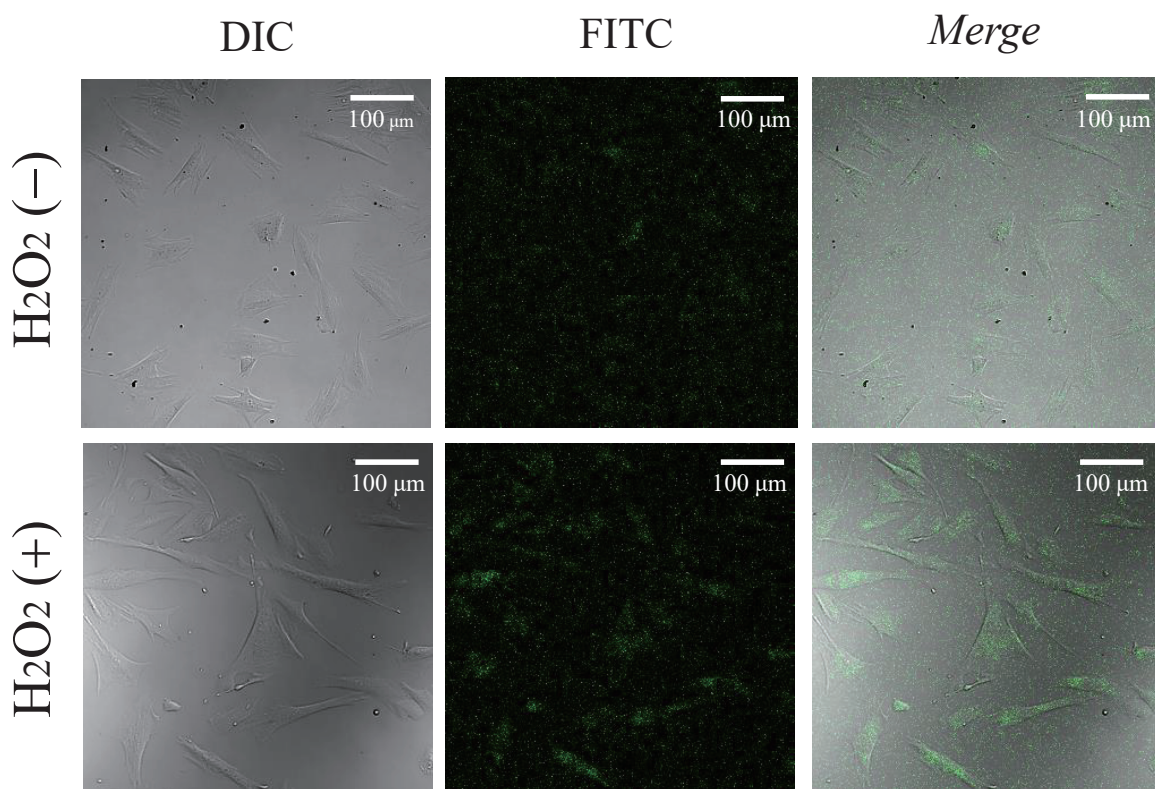
らに, Baker や Xu らは, 老化細胞を除去したマウスの健康寿命が延長したことを報告している<sup>22, 23)</sup>. すなわち, 細胞老化と個体老化の関連性も明らかとなっており, 長年にわたる老化細胞の累積は慢性的な SASP を引き起こし, 個体老化の要因になると考えられている.

#### 第四節 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による SASP モデル細胞の作製

麦門冬の「薬能」を評価するため, SASP モデル細胞の作製を試みた. 細胞は, 麦門冬が伝統的に「肺」(皮膚)に対して作用すると考えられてきたことから, 正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF) を使用した. また, SIPS の誘導は, RS が起こる以前 (5-10 継代の間) の NHDF に対し, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行った (Fig. 2-3). 細胞老化の評価は, 細胞形態の扁平化と分裂速度の低下, SA-β-gal の検出, IL-6, IL-8, IL-1β の遺伝子発現 (SASP) がみられた際に細胞老化が誘導できたとした. 添加する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度については, 複数の報告を基に, 終濃度 15 μM, 25 μM, 100 μM, 200 μM の 4 つの濃度について検討した<sup>18, 19, 24)</sup>. 評価の結果, 終濃度 15μM, 25μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理では未処理細胞との差異が認められなかったが, 終濃度 100 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理した細胞において, 細胞の扁平化と SA-β-gal の検出を認めた (Fig. 2-4). また, 細胞増殖率についても, 培養後 48 時間における増殖が未処理細胞は 3.13 倍であったのに対し H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理細胞は 1.40 倍であり, 分裂速度の低下を認めた. qRT-PCR 法による IL-6, IL-8, IL-1β の遺伝子発現についても, 100 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理細胞において有意な増加を認めた (Fig. 2-5). 以上より, 本研究において, 終濃度 100 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が SASP を誘導できる最適濃度であると結論付けた.

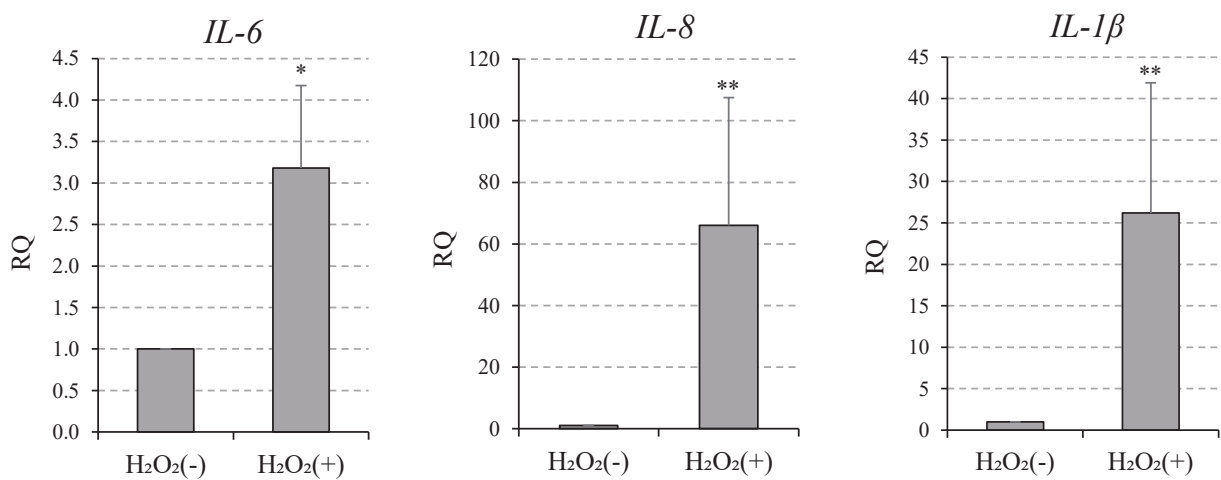


**Fig.2-3** The procedure for cellular senescence in NHDF by 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment.



**Fig. 2-4** Detection of SA- $\beta$ -gal on senescent NHDF induced by 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Senescent NHDF induced by 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  express SA- $\beta$ -gal under confocal laser scanning microscopy (Ex: 488 nm, Em: 500 - 600 nm); scale bars, 100  $\mu\text{m}$

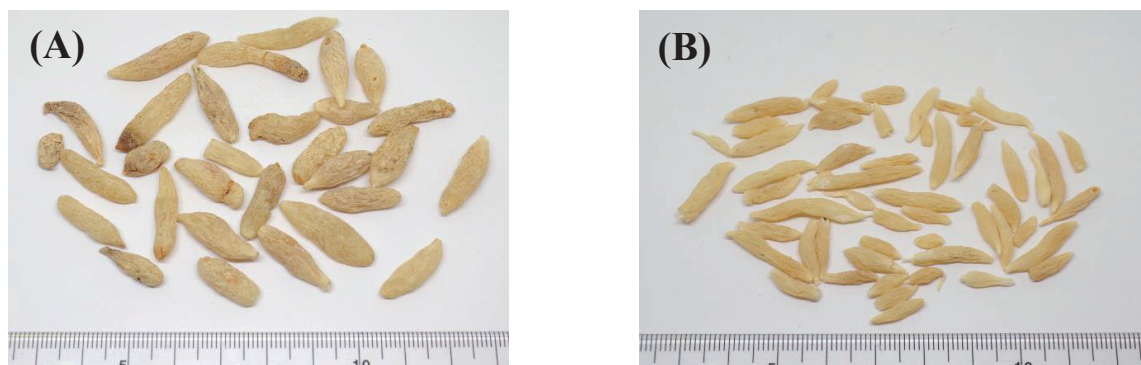


**Fig. 2-5** The expression levels of IL-6, IL-8 and IL-1β on senescent NHDF induced by 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Each mRNA was determined by using quantitative RT-PCR, with the data normalized with the internal control GAPDH gene and the results expressed as values relative to those of NHDF not treated with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n = 3). The data were analyzed using Student's t-test. The data indicate the mean ± SD; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

## 第五節 基原植物のフェノタイプについて

麦門冬の基原植物であるジャノヒゲ *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler には、複数のフェノタイプ（表現型）が存在している。現在、ジャノヒゲ *O. japonicus* var. *japonicus*、ナガバジャノヒゲ *O. ohwii*、セッコウリュウノヒゲ *O. chekiangensis* の流通が知られており、これらは総じて広義の意味で捉えたジャノヒゲ *O. japonicus* として取り扱われている<sup>25)</sup>。すなわち、これら植物の取り扱いには多様な見解があり、ナガバジャノヒゲ *O. ohwii* やセッコウリュウノヒゲ *O. chekiangensis* をジャノヒゲ *O. japonicus* のシノニム（名前は異なるが同植物）として捉える意見もある。基原植物に関するこのような問題は、麦門冬のみならず生薬全体においてしばしばみられる。これらの理由から、本研究においては、中国産の市場品麦門冬（基原植物はセッコウリュウノヒゲ *O. chekiangensis*<sup>26)</sup> と報告されているが、中国薬典では *O. japonicus* とみなされている）と、大阪府河内長野市で栽培した麦門冬（基原植物は日本自生の *O. japonicus* var. *japonicus* で、日本薬局方で規定している狭義の意味で捉えたジャノヒゲ）の2種類を研究対象とした（Photo 2-2）。



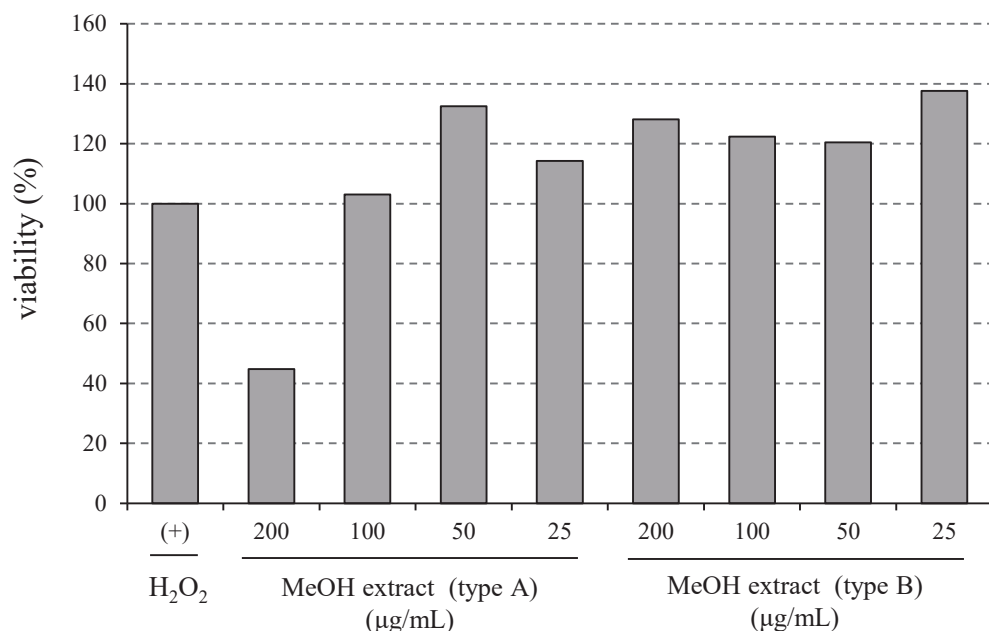
**Photo 2-2 OPHIOPOGONIS RADIX from two different original plants.**

**(A)** *O. japonicus* (*O. chekiangensis*) purchased at the market of Hong Kong.

**(B)** *O. japonicus* (*O. japonicus* var. *japonicus*) cultivated in Kawachinagano, Osaka, Japan.

## 第六節 麦門冬メタノール抽出エキスの最適添加濃度の検討

SASP モデル細胞に対する2種類の麦門冬メタノール抽出エキスの抗炎症効果を調査するにあたり、添加する麦門冬メタノール抽出エキスの最適濃度を検討した。終濃度 12.5  $\mu\text{g/L}$ , 25  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , 100  $\mu\text{g/L}$ , 200  $\mu\text{g/L}$  について検討した結果、中国産麦門冬 (*O. chekiangensis*, ここでは Type A とする) について終濃度 200  $\mu\text{g/L}$  で細胞毒性が認められたが、12.5  $\mu\text{g/L}$ , 25  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , 100  $\mu\text{g/L}$  では細胞毒性はみられなかった。一方、日本産麦門冬 (*O. japonicus* var. *japonicus*, ここでは Type B とする) については、すべての濃度で細胞毒性はみられなかった (Fig. 2-6)。これより、麦門冬メタノール抽出エキスの添加濃度を終濃度 12.5  $\mu\text{g/L}$ , 25  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$  に決定した。



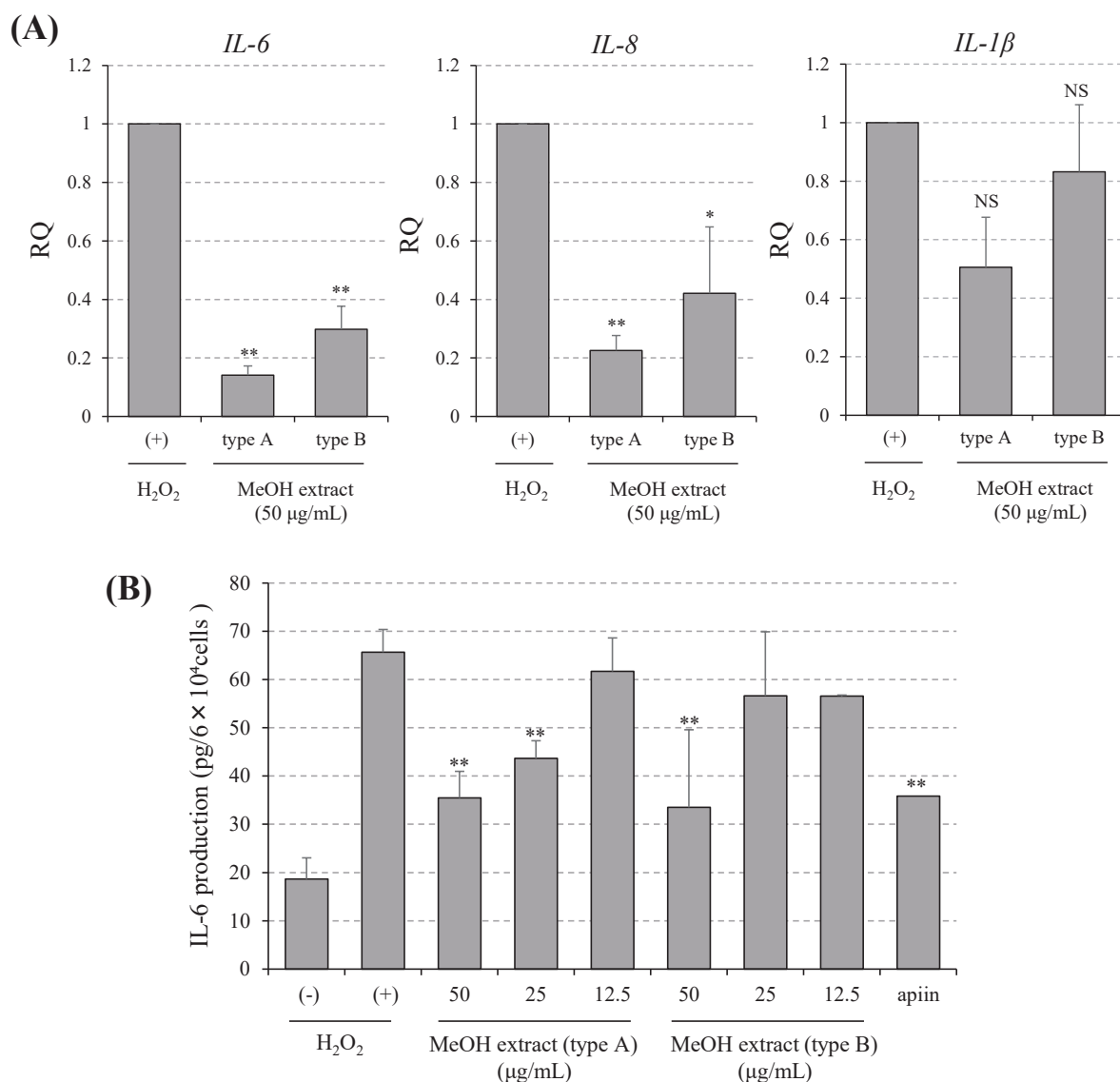
**Fig. 2-6 Cell viability of senescent NHDF treated with methanol extracts from Type A (*O. chekiangensis*) and Type B (*O. japonicus* var. *japonicus*) of OPHIOPOGONIS RADIX.**

## 第七節 SASP モデル細胞に対する麦門冬メタノール抽出エキスの抗炎症効果

SASP モデル細胞に対する 2 種類の麦門冬メタノール抽出エキス添加後の IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  における遺伝子発現の変化を qRT-PCR 法で調査した。その結果, IL-6 と IL-8 において発現の有意な抑制を確認した。一方, IL-1 $\beta$  については, 抑制傾向を示したが, 有意差は認められなかった (Fig. 2-7 A)。さらに IL-6 については ELISA 法によるタンパク産生量を調査し, 濃度依存的に有意な産生抑制を確認した (Fig. 2-7 B)。ポジティブコントロールとして, 皮膚線維芽細胞に対するブレオマイシン処理や肺線維芽細胞に対する X 線照射処理によって誘導した SASP モデル細胞において抗炎症効果が報告されている, apigenin の配糖体である apiin を使用した<sup>27,28)</sup>。

## 第八節 麦門冬メタノール抽出エキスの HPLC profile 分析と主要成分の単離精製

活性を示した 2 種類の麦門冬メタノール抽出エキスについて HPLC profile 分析を行った結果, それぞれ主成分組成が異なる HPLC profile [Type A (*O. chekiangensis*), Type B (*O. japonicus* var. *japonicus*)] を示した (Fig. 2-8)。そこで, 各エキスを各種クロマトグラフィーに付し, 化合物 1-4 を単離した。これらの化合物は各種 2 次元 NMR スペクトルの解析により, ホモイソフラボノイド成分の metylophiopogonanone A (1), metylophiopogonanone B (2), ophiopogonanone A (3) と同定した。また, LC/MS 分析により, 各指標成分として Type A から化合物 1 と 2 を, Type B から化合物 1 と 3 と同定した。さらに, Type A と Type B の主ステロイドサポニン成分として ophiopogonin B (4) を単離, 同定した (Fig. 2-8)。



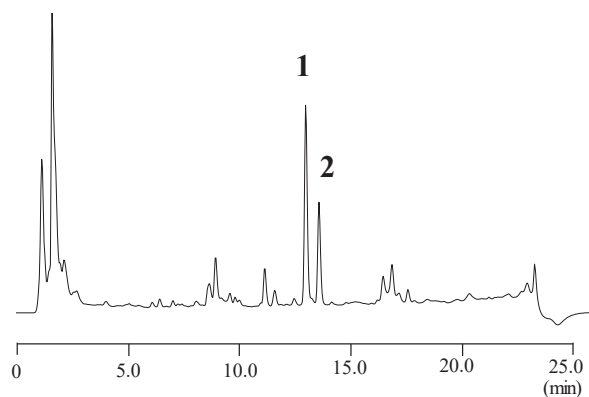
**Fig. 2-7 Anti-inflammatory effects of methanol extracts of OPHIOPOGONIS RADIX from Type A (*O. chekiangensis*) and Type B (*O. japonicus* var. *japonicus*) on senescent NHDF.**

**(A)** IL-6, IL-8, and IL-1 $\beta$  mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR, with the data normalized with the internal control GAPDH gene, and the results were expressed as values relative to those of senescent NHDF not treated with the methanol extracts (n = 3).

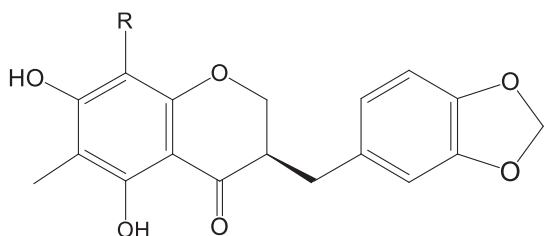
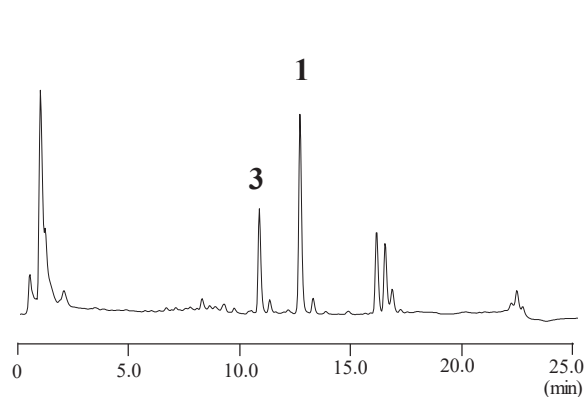
**(B)** Inhibition of IL-6 protein production by the methanol extracts (n = 3). Apiin was tested as a positive control. These data were analyzed using Tukey-Kramer post hoc test. The data indicate the mean  $\pm$  SD; \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01.



Type A (*O. chekiangensis*)

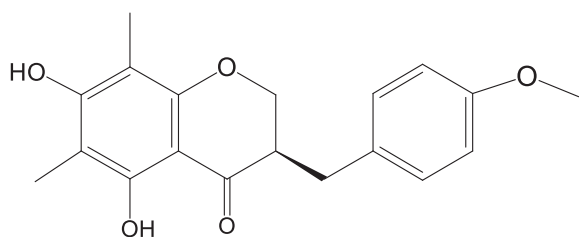


Type B (*O. japonicus* var. *japonicus*)

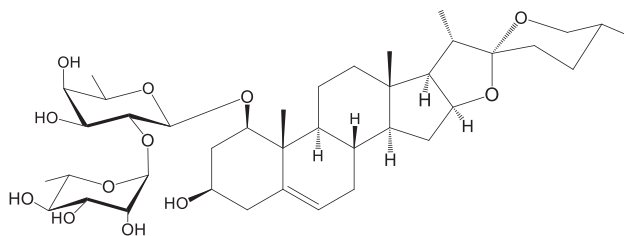


R= CH<sub>3</sub> metylophiopogonanone A (1)

R= H ophiopogonanone A (3)



metylophiopogonanone B (2)



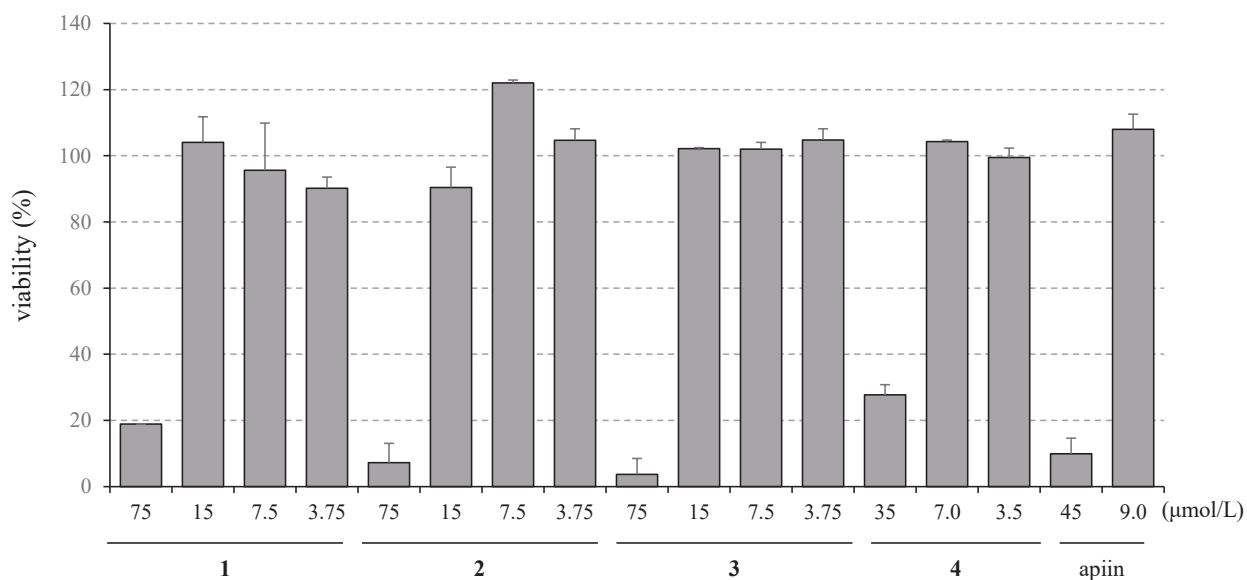
ophiopogonin B (4)

**Fig. 2-8 HPLC chromatograms for methanol extracts of Type A (*O. chekiangensis*) and Type B (*O. japonicus* var. *japonicus*) from OPHIOPOGONIS RADIX and their index compounds.**



## 第九節 化合物 1-4 の最適添加濃度の検討

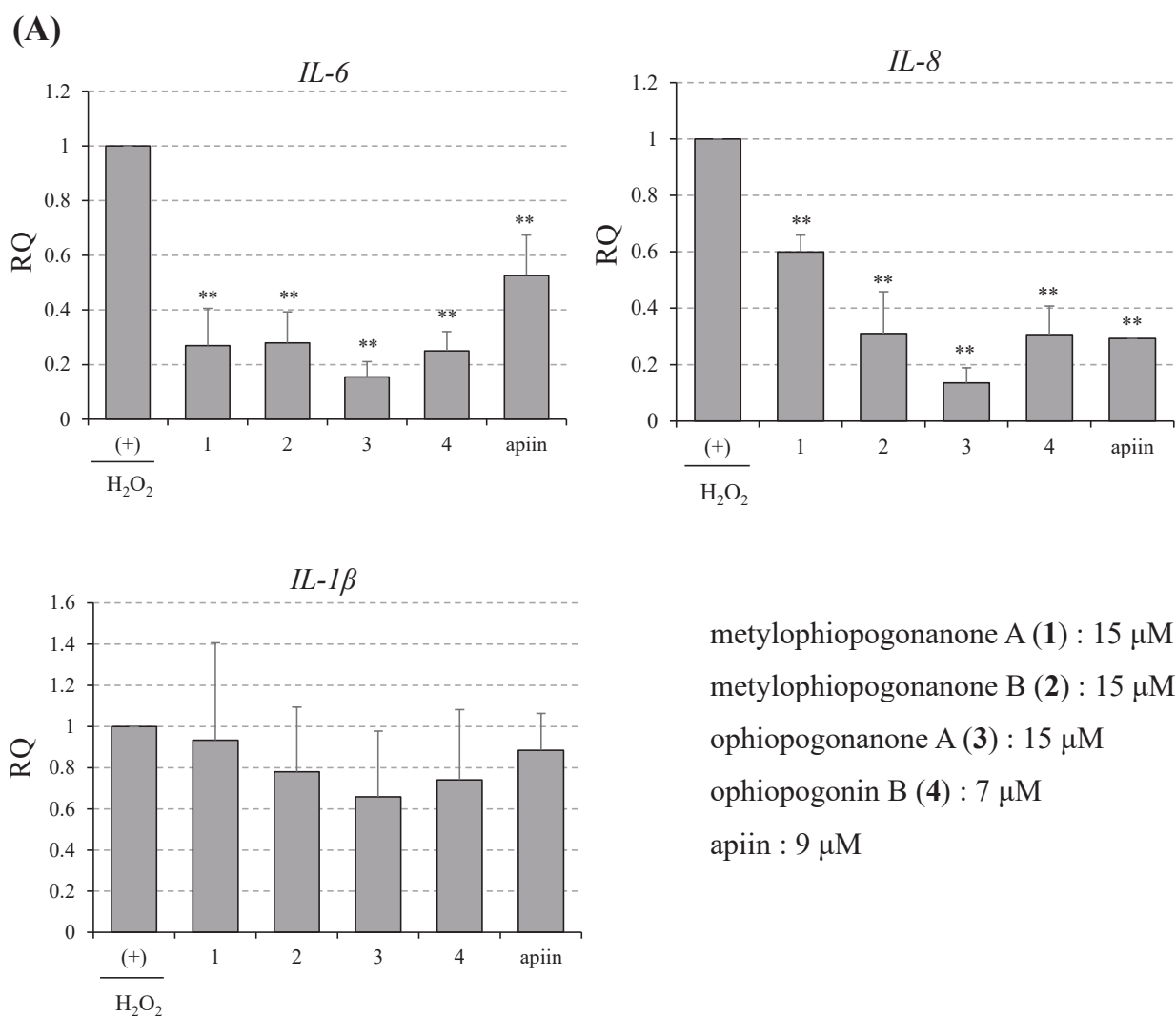
麦門冬メタノール抽出エキスと同様、単離精製した化合物 1-4 の最適濃度を検討した。その結果、化合物 1-3 については終濃度 75 $\mu\text{mol/L}$  で細胞毒性が認められたが、3.75  $\mu\text{mol/L}$ , 7.5  $\mu\text{mol/L}$ , 15  $\mu\text{mol/L}$  では細胞毒性がみられなかった。一方、化合物 4 については、35  $\mu\text{mol/L}$  で細胞毒性がみられた (Fig. 2-9)。これより、化合物 1-4 の添加濃度を 15  $\mu\text{mol/L}$  から 1.75  $\mu\text{mol/L}$  の範囲になるよう定めた。

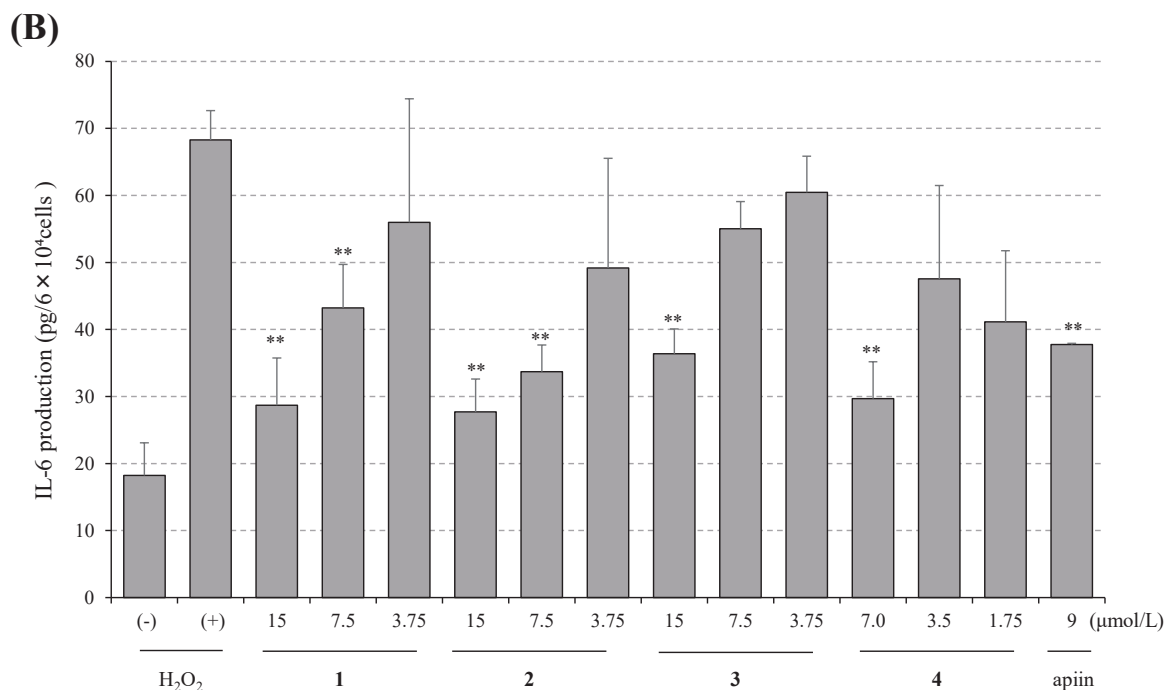


**Fig. 2-9 Cell viability of senescent NHDF treated with metylophiopogonanone A (1), metylophiopogonanone B (2), ophiopogonanone A (3) and ophiopogonin B (4).**

## 第十節 SASP モデル細胞に対する化合物 1-4 の抗炎症効果

SASP モデル細胞に対する化合物 1-4 の IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  における遺伝子発現の変化を, qRT-PCR 法で調査した. その結果, IL-6 と IL-8 において遺伝子発現の有意な抑制を確認した. 一方, IL-1 $\beta$  については, 有意な差は認められなかった (Fig. 2-10 A). さらに IL-6 については ELISA 法によるタンパク産生量を調査し, 濃度依存的に有意な抑制を確認した (Fig. 2-10 B).





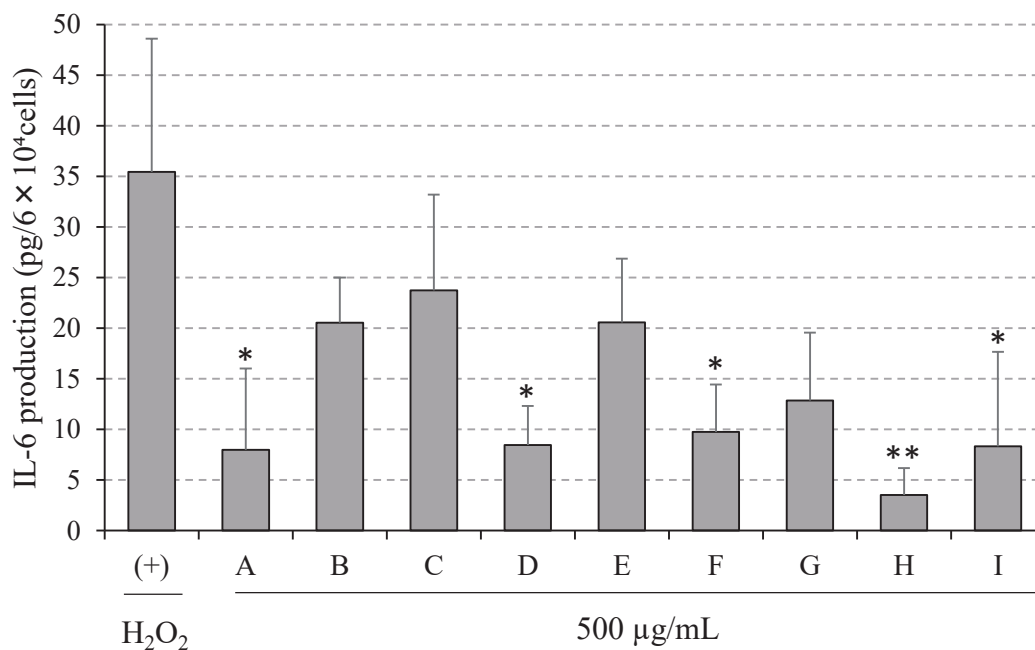
**Fig. 2-10 Anti-inflammatory effects of four compounds isolated from methanol extract of OPHIOPOGONIS RADIX on senescent NHDF.**

**(A)** IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$  mRNA was determined using quantitative RT-PCR, with the data normalized with the internal control GAPDH gene and the results expressed as values relative to those of senescent NHDF not treated with compounds **1** – **4** (n = 3).

**(B)** Inhibition of IL-6 protein production by compounds **1** – **4**, respectively (n = 3). These compounds were not cytotoxic. Apiin was tested as a positive control. These data were analyzed using Tukey-Kramer post hoc test. The data indicate the mean  $\pm$  SD; \*\* $P < 0.01$ .

## 第十一節 SASP モデル細胞に対する漢方薬の抗炎症効果

麦門冬の SASP 抑制効果が明らかとなったことから、続いて、麦門冬を構成生薬を含む漢方薬の SASP モデル細胞に対する抗炎症効果を調査した。同時に、伝統的「薬能」を参考に、SASP 抑制効果が期待できる数種類の漢方薬について併せて評価した。すなわち、麦門冬を構成生薬を含む漢方薬〔麦門冬湯 (A)、清暑益気湯 (B)、生脈散 (C)〕、補気生薬（「気・血・水」の「気」を補う生薬）を処方を中心とする漢方薬〔十全大補湯 (D)、人参養栄湯 (E)、人参湯 (F)〕および清熱生薬（過剰な熱を取り除く生薬）を含む漢方薬〔黄連解毒湯 (G)、白虎加人参湯 (H)、茵陳五苓散 (I)〕の計 9 種類の漢方薬を調査対象とした。SASP モデル細胞に対して細胞毒性が認められない濃度 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の漢方薬水抽出エキスを添加し、ELISA 法による IL-6 のタンパク産生量を調査した。その結果、麦門冬湯、十全大補湯、人参湯、白虎加人参湯、茵陳五苓散で有意な抑制が認められた (Fig. 2-11)。



**Fig. 2-11 Anti-inflammatory effects of Bakumondoto and other Kampo herbal extracts on senescent NHDF.**

(A) Bakumondoto (B) Seisyoekkito (C) Shoumyakusan (D) Zyuzentaihoto (E) Ninjinyoueito (F) Ninjinto (G) Ourengedokuto (H) Byakkokaninjinto (I) Inchingoreisan. These extracts were not cytotoxic (n = 3). These data were analyzed using Tukey-Kramer post hoc test. The data indicate the mean ± SD; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

## 第十二節 総括および考察

2種類の麦門冬メタノール抽出エキス〔セッコウリュウノヒゲ *O. chekiangensis* (Type A) とジャノヒゲ *O. japonicus* var. *japonicus* (Type B)〕について SASP モデル細胞における抗炎症効果を調査した。その結果、各エキスは IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を有意に抑制した。また、IL-6 のタンパク産生量についても、濃度依存的に有意な抑制を認めた。

一方、活性を示した2種類の麦門冬メタノール抽出エキスは主成分組成が異なる HPLC profile を示し、Type A からホモイソフラボノイド成分の *metylophiopogonanone* A (1) と *metylophiopogonanone* B (2) を、Type B から *metylophiopogonanone* A (1) と *ophiopogonanone* A (3) を同定した。さらに、両タイプから主ステロイドサポニン成分として *ophiopogonin* B (4) を単離、同定した。化合物 1 – 4 は、IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を有意に抑制した。また、IL-6 のタンパク産生量についても、濃度依存的に有意な抑制を認めた。以上より、ホモイソフラボノイドやステロイドサポニン類の複数の成分が SASP 抑制効果を示し、「滋陰」作用を示す麦門冬の慢性炎症に対する作用を科学的なエビデンスの基に評価した。また、両タイプの麦門冬は共に SASP 抑制効果を示したことから、科学的な見解からは、どちらも麦門冬の基原植物として相応しいと結論付けた。

皮膚は人体における最大の器官であり、そのうち本研究で用いた線維芽細胞は最も多い割合を占めている<sup>29)</sup>。すなわち、麦門冬は身体の広範囲にわたる SASP を抑制する可能性がある。その応用例として、全身性の慢性炎症疾患と捉えられている病態である「がん悪液質 (cancer cachexia)」に対する治療が挙げられる。がん悪液質は進行がん患者の約 80% に認められる食欲不振を伴う栄養不良状態であり、恒常的な炎症性サイトカインの過剰分泌による全身性炎症状態であることが明らかとなっている<sup>30)</sup>。がん悪液質は食欲不振や体重減少の主症状に加え、化学療法にも影響を及ぼす。さらに、進行した状態から

の改善は困難であることから、早期からの介入が強く推奨されている<sup>31)</sup>。近年、がん悪液質の治療ターゲットとして「グレリン」が注目されている。グレリンは胃内分泌細胞から産生される内因性ペプチドホルモンであり、食欲中枢に作用することで食欲を亢進させる<sup>32)</sup>。また、視床下部脳下垂体に作用し成長ホルモンやインスリン様成長因子の分泌促進によるタンパク合成促進にも関与する<sup>33)</sup>。その他、抗炎症作用<sup>34)</sup>、心収縮<sup>35)</sup>等の生理作用が明らかとなっている。2017年、世界初のがん悪液質治療薬として開発された経口グレリン様作用薬「アナモレリン」の大規模第三相試験が実施された<sup>36)</sup>。一方、有用性評価の指標や多剤相互作用の有無等には検討の余地があるとして、2019年11月現在、継続審議扱いとなっている<sup>37,38)</sup>。また、ステロイドや非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAIDs)による薬物治療においては有害事象等により満足な結果は得られておらず、がん悪液質の根本的治療法の確立が課題となっている<sup>39)</sup>。

がん悪液質に対して、最近、特定の漢方薬による有用性が明らかとなっている。基礎研究において、六君子湯のがん悪液質モデルマウスにおける食欲不振改善や生存期間延長の結果が報告されている<sup>40,41)</sup>。六君子湯の構成生薬のうち、陳皮の成分 hesperidin, heptamethoxyflavone および甘草の成分 isoliquiritigenin にグレリン分泌促進作用<sup>42,43)</sup>、白朮の成分 atractylodin にグレリンシグナル増強作用<sup>41)</sup>、茯苓の成分 pachymic acid にグレリン代謝酵素の阻害作用が明らかとなっている<sup>44)</sup>。また、六君子湯以外に、補中益気湯のがん悪液質モデルマウスにおける IL-6 抑制効果が報告されている<sup>45)</sup>。さらに、ランダム化比較試験 (Randomized Controlled Trial: RCT) では補中益気湯のがん性疲労の改善効果が報告されている<sup>46)</sup>。

本研究で着目した「滋陰」は、漢方医学において「過剰な熱」(現代医療における炎症)によって消耗した体内の「水」を補うことで炎症を鎮める作用である(第二節参照)。すなわち、「過剰な熱」を取り除く清熱生薬とは異なるアプローチで炎症を鎮めていると考

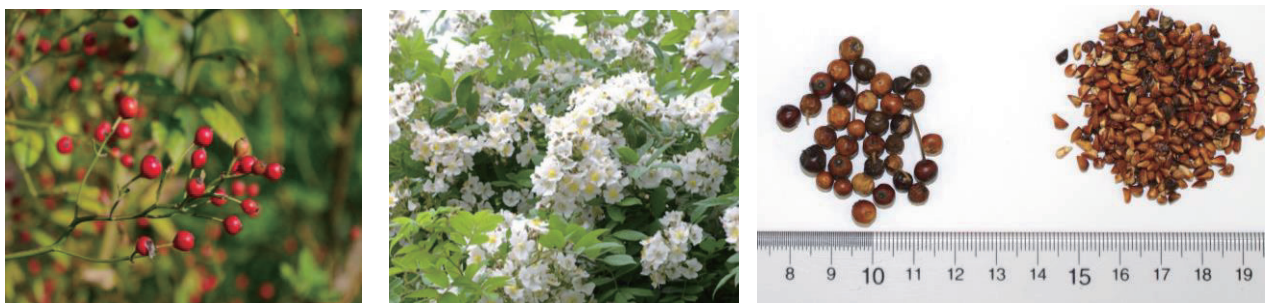
えられる。このため、漢方医学では清熱薬と捉えることができるステロイドや NSAIDs で満足いく結果が得られなかった全身性炎症状態に対し、治療効果が期待できると考えている。現在、本研究で得られた結果を参考に、がん悪液質に対する漢方薬の治療効果を後ろ向きに調査している。今後は、前向き観察研究等も考慮しながら、がん悪液質に対する漢方薬の予防および治療効果をさらに調査したいと望んでいる。

2018年4月現在、国内には148処方もの医療用漢方エキス製剤が存在している<sup>47)</sup>。すなわち、漢方薬は、莫大な時間や開発費をかけることなく様々な薬物治療に取り入れることができる。満足な治療法が確立されていない病態や症状に対して、漢方医学の特性を保持し、且つ、科学的エビデンスに基づいた漢方処方を提案することで、複雑な病態の治療効果は向上すると期待している。



### 第三章 瀉下活性成分 multiflorin A を含有するノイバラ *Rosa multiflora* Thunb.の 分布調査と生薬・営実の化学的品質評価法の検討

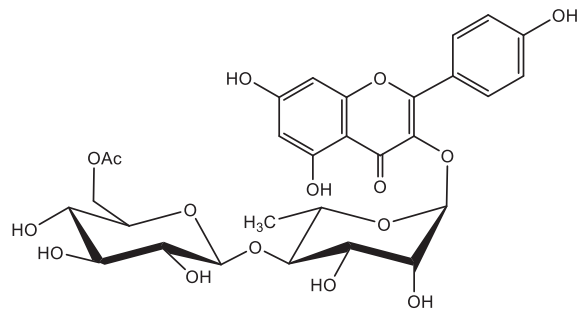
#### 第一節 生薬・営実について



ROSAE FRUCTUS

Photo 3-1 *Rosa multiflora* Thunberg

営実（エイジツ，ROSAE FRUCTUS）は第十七改正日本薬局方において，バラ科ノイバラ *Rosa multiflora* Thunberg (*Rosaceae*) の偽果又は果実と規定されている<sup>48)</sup> (Photo 3-1)．現在，営実が配合される処方では医療用漢方エキス製剤には存在しないが，瀉下作用を期待して「毒掃丸」等の家伝薬に配合されている．また，主瀉下活性成分として，kaempferol 配糖体の multiflorin A が報告されている<sup>49)</sup> (Fig. 3-1)．これまで，瀉下作用の詳細なメカニズムは解明されていなかったが，最近，multiflorin A が腸管バリア機能を一時的に低下させることが明らかとなった<sup>50)</sup>．また，multiflorin A のグルコース 6 位のアセチル基が活性に重要な役割を持ち，その作用点は小腸であると推定されている<sup>51)</sup>．一方，瀉下作用以外に，multiflorin A のアロマターゼ阻害作用<sup>52)</sup> や血糖降下作用<sup>53)</sup> が報告されている．さらに，営実は抗炎症作用<sup>54)</sup> や抗酸化作用<sup>55)</sup>，保湿作用<sup>56)</sup> 等を期待して化粧品にも広く利用されている．



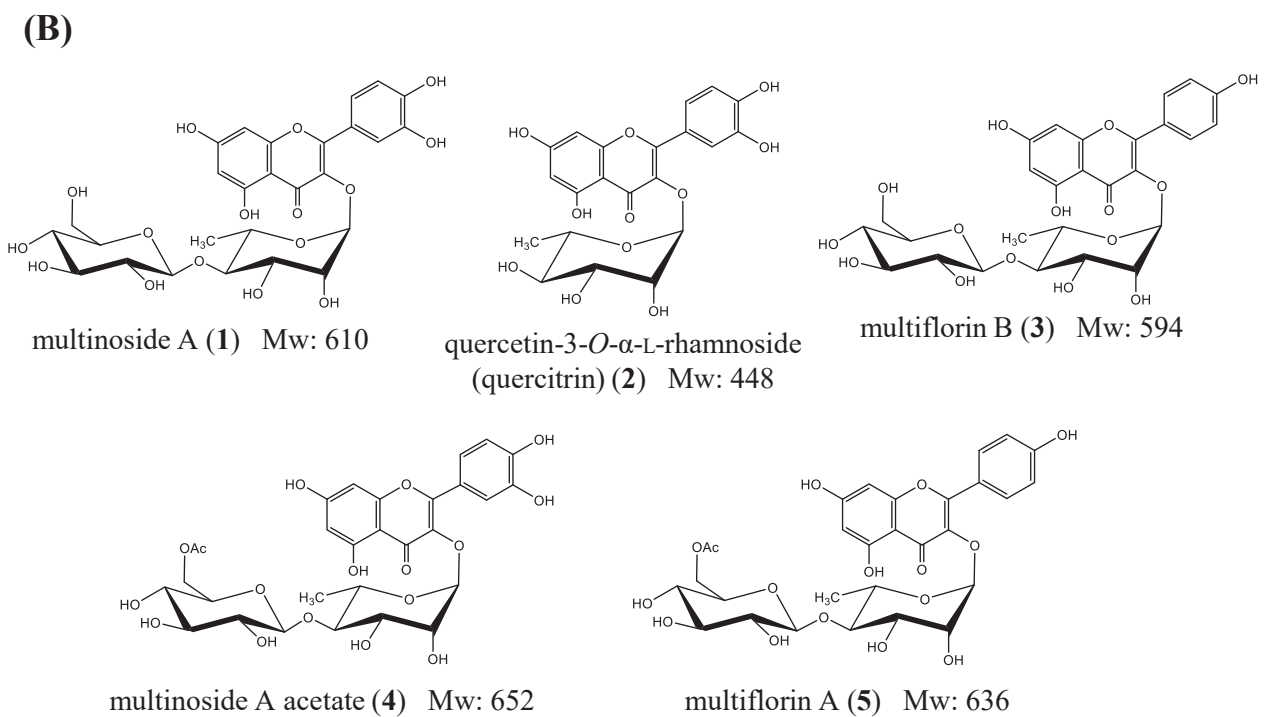
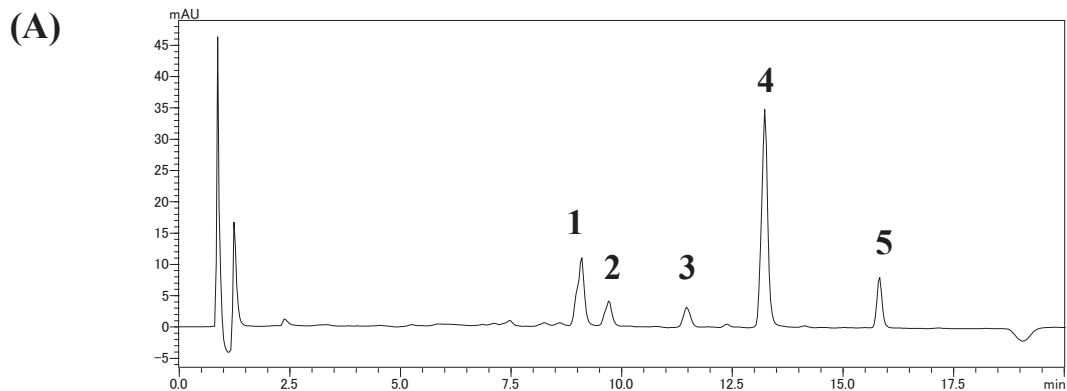
**Fig. 3-1 Structure of multiflorin A.**

## 第二節 現市場品における問題

市場品・営実のほぼ全ては中国や韓国からの輸入に頼っているが、これらの生薬は、瀉下活性成分の multiflorin A を含有せず、瀉下作用も弱いことが報告されている<sup>57)</sup>。また、日本薬局方には multiflorin A を検出する確認試験は規定されておらず、フラボノイド成分全般の確認反応であるマグネシウム塩酸反応が採用されているのみである<sup>48)</sup>。このような背景から、市場品の現状や瀉下作用が低下している原因を明らかにするため、日本国内に自生するノイバラ類および市場品の主な原産国の韓国に自生するノイバラについて、成分調査と植物形態学的調査を実施した。また、瀉下活性成分を安定して含有する営実の供給を目的に、化学的品質評価法の構築を試みた。

### 第三節 日本に自生するノイバラ (*R. multiflora*) の HPLC profile 分析

日本に自生するノイバラ (*R. multiflora*) の成分調査を行うため、ノイバラ果実 (偽果を含む) を秋田県、青森県、岐阜県、長野県、京都府、大阪府、奈良県、兵庫県、和歌山県、岡山県、福岡県で採集し、HPLC profile 分析を行った。その結果、すべてのサンプルは同一のクロマトグラムパターンを示した (Fig. 3-2 A)。次に、各指標成分ピークを明らかにするため、ノイバラ果実のメタノール抽出エキスを各種クロマトグラフィーに付し、化合物 **1**–**5** を単離した。また、これらの化合物は各種 NMR スペクトルの解析により、multinoside A (**1**)、quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (**2**)、multiflorin B (**3**)、multinoside A acetate (**4**)、multiflorin A (**5**) と同定した (Fig. 3-2 B)。さらに、各ピークの同定は LC/MS 分析により行った。これらの化合物は、8 月に採集した未熟な緑色の果実においても確認された。以上より、日本に自生するノイバラ (*R. multiflora*) は、個体や採集時期に関わらず multiflorin A を含有することを明らかにした。



**Fig. 3-2 HPLC profile of methanol extract from *Rosa multiflora* fruits collected in Okayama, Japan (A) and structure of index main compounds (B).**

#### 第四節 日本に自生するバラ属ノイバラ節植物の HPLC profile 分析

ノイバラは、バラ属の中でも花柱の一部が癒合することでノイバラ節 (Synstylae 節) として分類されている。ノイバラ節に属する植物は、日本において、ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*)、ツクシイバラ (*R. multiflora* var. *adenochaeta*)、フジイバラ (*R. fujisanensis*)、ミヤコイバラ (*R. paniculigera*)、ヤブイバラ (*R. onoei* var. *onoei*)、アズマイバラ (*R. onoei* var. *oligantha*)、モリイバラ (*R. onoei* var. *hakonensis*)、ヤマイバラ (*R. sambucina*)、テリハノイバラ (*R. luciae*) 等が知られている<sup>58)</sup>。一方、これらは形態的変異が大きく種の範囲が曖昧で、近年も遺伝子解析により詳細な分類が進められているが、依然として分類学的に難しいとされている<sup>59-61)</sup>。現市場品に multiflorin 類が検出されないことから、輸入品の基原植物に疑問を持った。すなわち、ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) とこれら近縁植物が混同している可能性を考えた。そこで、神奈川県、山梨県、大阪府、兵庫県、岡山県、愛媛県、香川県、高知県、徳島県、長崎県、福岡県においてバラ属ノイバラ節 (*Rosa* section Synstylae) 植物の果実を採集し、multiflorin 類の含有調査を実施した。併せて、これらの植物形態学的調査を実施した (Table 3-1, Photo 3-2)。

分析の結果、ヤマイバラ (*R. sambucina*) を除くすべてのバラ属ノイバラ節 (*Rosa* section Synstylae) 植物は、ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) と同一の HPLC クロマトグラムパターンを示した (Fig. 3-3)。一方、テリハノイバラ (*R. luciae*) については、multiflorin A を含有する個体群 (Type I) と multiflorin A を含有しない個体群 (Type II) の2つのケモタイプの存在を明らかにした (Fig. 3-4 A)。

**Table 3-1 The main collection sites of *Rosa* section *Synstylae* (Rosaceae) in Japan.**

Species	Location				Altitude (m)
	City	Prefecture	Latitude	Longitude	
<i>R. multiflora</i> var. <i>multiflora</i>	Miyaji Fukutsu	Fukuoka	33° 46'59"N	130° 29'29"E	110
<i>R. multiflora</i> var. <i>adenochaeta</i>	Shibetsushiyama Niihama	Ehime	33° 54'05"N	133° 18'41"E	860
<i>R. luciae</i>	Yura Sumoto	Hyogo	34° 30'55" N	134° 92'64"E	1
<i>R. fujisanensis</i>	Hirano Yamanakako	Yamanashi	35° 45'19" N	138° 93'05"E	1090
<i>R. paniculigera</i>	Syuku Okayama	Okayama	34° 41'49" N	133° 55'35"E	50
<i>R. onoei</i> var. <i>onoei</i>	Shibetsushiyama Niihama	Ehime	33° 51'14"N	133° 21'04"E	730
<i>R. onoei</i> var. <i>oligantha</i>	Kitahassaku Yokohama	Kanagawa	35° 32'02"N	139° 32'02"E	25
<i>R. onoei</i> var. <i>hakonensis</i>	Besshiyama Niihama	Ehime	33° 50'56"N	133° 24'25"E	860
<i>R. sambucina</i>	Bitchu Takahashi	Okayama	34° 48'10"N	133° 25'53"E	160

次に、multiflorin A を含有しない Type II の指標成分ピークを同定するため、Type II を示したテリハノイバラ果実のメタノール抽出エキスを各種クロマトグラフィーに付し、化合物 6–10 を単離した。また、これらの化合物は、各種 2 次元 NMR スペクトルの解析により、hyperin (6), isoquercitrin (7), quercetin 3-*O*-glucuronide (8), 3'-methoxy-isoquercitrin (9), quercetin 3-*O*-β-D-(6"-*O*-(*E*)-*p*-coumaryl) glucopyranoside (10) と同定した (Fig. 3-4 B)。さらに、各ピークの同定は LC/MS 分析により行った。各タイプは、フラボノール配糖体の糖鎖構造において差異がみられた。すなわち、Type I は kaempferol および quercetin の 3 位にラムノースが結合した構造 (multiflorin 類) を基本としているのに対し、Type II は quercetin の 3 位にグルコースやグルクロン酸が結合した構造を基本としていた。

一方、ヤマイバラ (*R. sambucina*) およびテリハノイバラ (*R. luciae*) の両種は、植物形態学的観点から他のバラ属ノイバラ節 (*Rosa* section *Synstylae*) 植物と明確に分類可能であったことから、基原植物ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) と混同する可能性は低いと考察した。

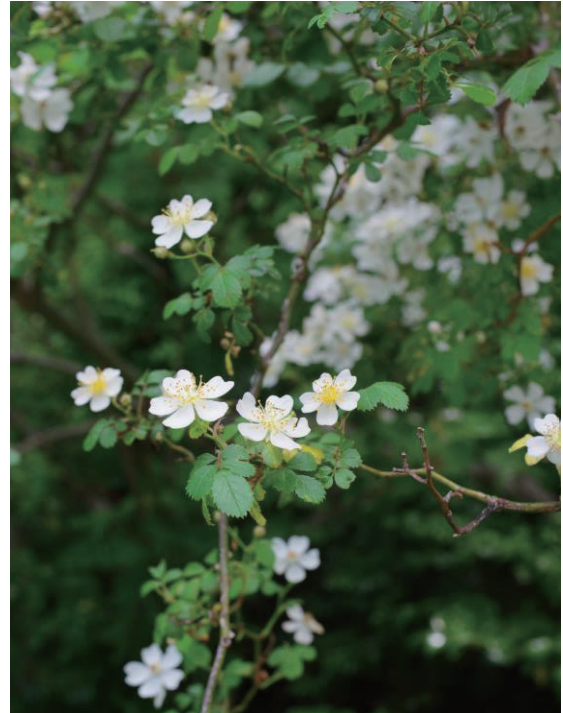




*R. luciae*



*R. multiflora* var. *adenochaeta*

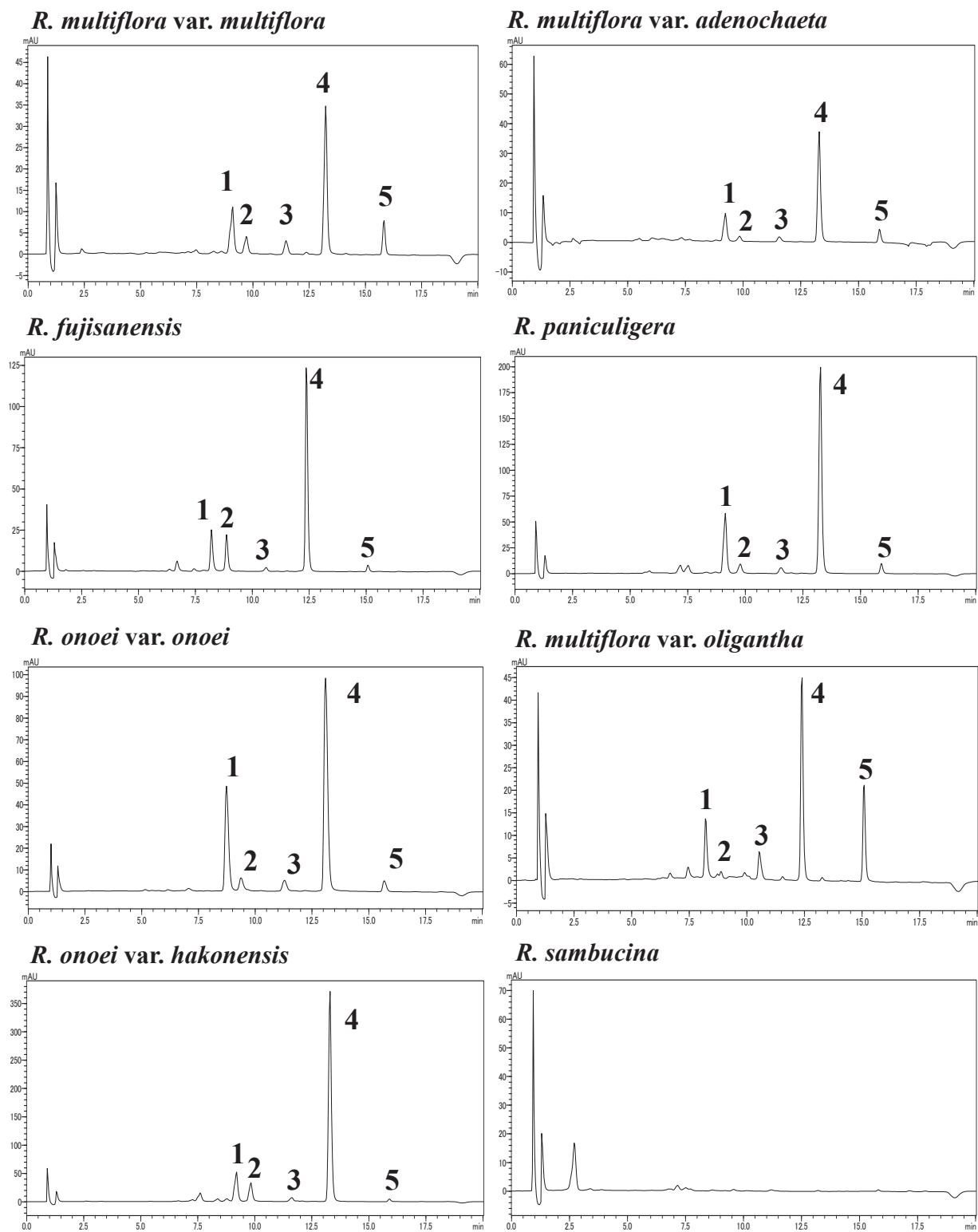


*R. paniculigera*



*R. onoei* var. *onoei*

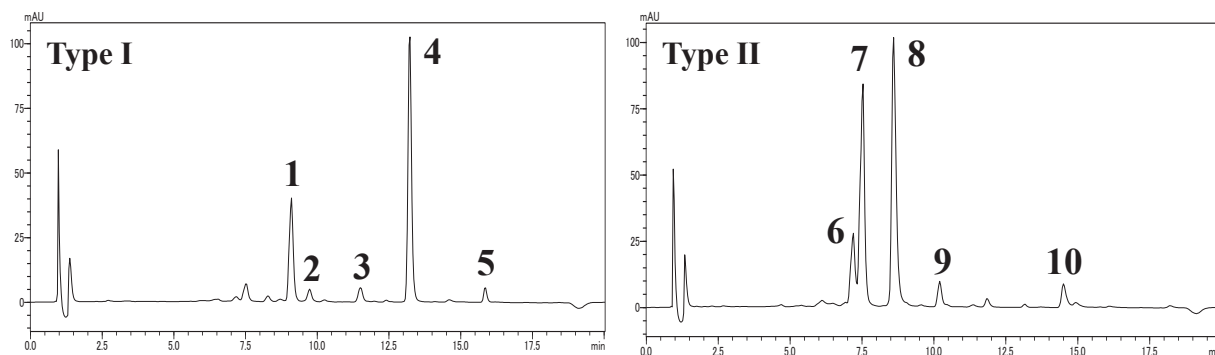
Photo 3-2 *Rosa* section *Synstylae*



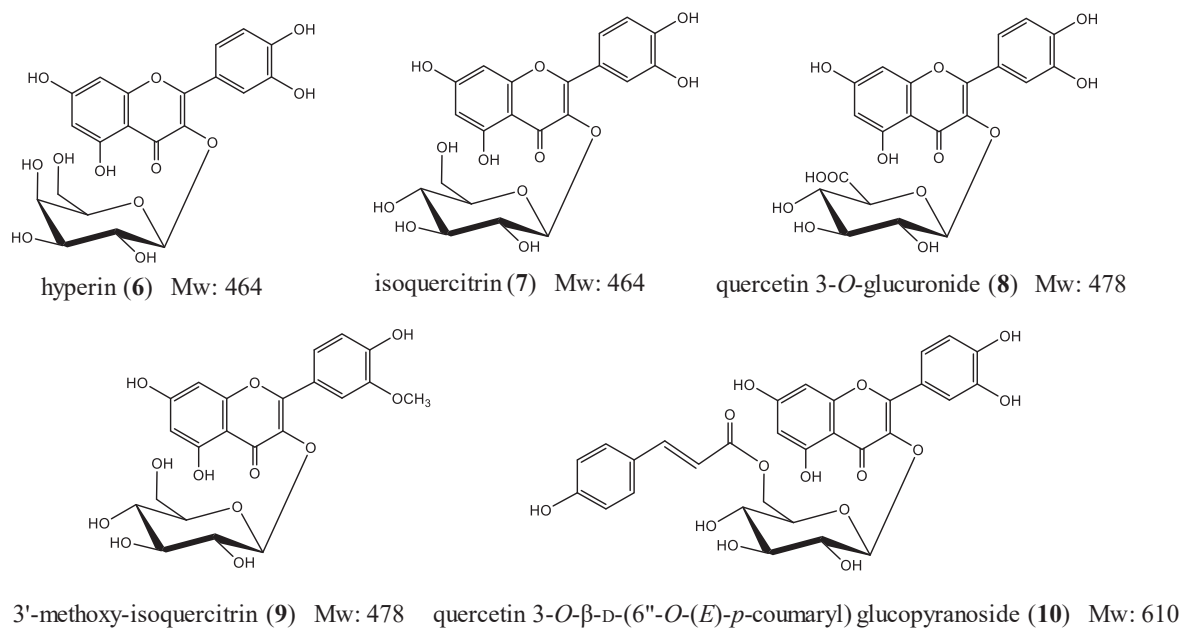
**Fig. 3-3 HPLC profiles of each methanol extracts from *Rosa* section *Synstylae* fruits collected in Japan.**



(A)



(B)



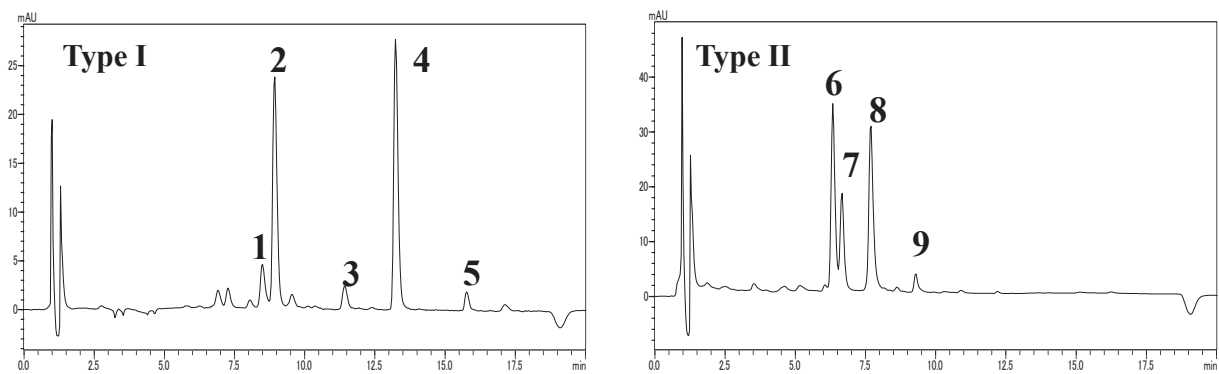
**Fig. 3-4 HPLC profile of methanol extracts from *Rosa luciae* fruits collected in Japan (A) and structure of index main compounds from Type II (B).**

## 第五節 韓国に自生するノイバラの HPLC profile 分析

市場品の主な原産国である韓国においては、ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) の他、テリハノイバラ (*R. luciae*) や *R. maximowicziana* の分布が知られている。韓国に分布するノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) を植物形態学的に調査し、採集した果実について HPLC profile 分析を行った (Table 3-2)。その結果、韓国には multiflorin A を含有する個体群 (Type I) と multiflorin A を含有しない個体群 (Type II) の2つのケモタイプが存在していた (Fig. 3-5)。これらのケモタイプは日本国内においてはテリハノイバラ (*R. luciae*) にみられた (第四節参照)。また、両種の HPLC クロマトグラムパターンがよく類似していたことから、LC/MS 分析により詳細な比較を行った。その結果、化合物 **6**, **7** に由来する  $m/z$  463 のマスクロマトグラムや、化合物 **8**, **9** に由来する  $m/z$  477 のマスクロマトグラムが良い一致を示した (Fig. 3-6)。以上のことから、日本に自生するテリハノイバラ (*R. luciae*) に存在していた2つのケモタイプが、韓国においてはノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) に存在することを明らかにした。一方、2つのケモタイプについては植物形態学的判別を試みたが、ケモタイプと形態に関連性はみられず、判別は不可能だった。また、生薬としての外部形態も一致した (Photo 3-3)。さらに、それらの分布についても明らかな規則性はみられず、その分布割合は multiflorin A を含有しない Type II が 24 サンプル中 13 サンプル (54.2%) であり、Type I よりやや多い傾向にあった (Fig. 3-7)。

**Table 3-2 The main collection sites of *Rosa multiflora* in South Korea.**

Code no.	Chemotype	Location			Altitude (m)
		City	Latitude	Longitude	
K1-2	Type II	Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do	35° 18'34"N	127° 53'57"E	170
K3	Type II	Hamyang-gun, Gyeongsangnam-do	35° 25'58"N	127° 44'00"E	230
K4-7	Type I	Yeonggwang-gun, Jeollanam-do	35° 18'51"N	126° 22'56"E	120
K8-9	Type II	Yeonggwang-gun, Jeollanam-do	35° 21'51"N	126° 25'01"E	15
K10-12	Type I	Damyang-gun, Jeollanam-do	35° 15'15"N	126° 53'52"E	30
K13-15	Type II	Gwangyang-si, Jeollanam-do	34° 59'07"N	127° 46'19"E	20
K16	Type II	Haman-gun, Gyeongsangnam-do	35° 17'36"N	128° 20'49"E	30
K17-22	Type I , Type II	Suwon-si, Gyeonggi-do	37° 19'44"N	127° 00'51"E	130
K23-24	Type I , Type II	Geumsan-gun, Chungcheongnam-do	36° 06'04"N	127° 30'05"E	150



**Fig. 3-5 HPLC profile of methanol extracts from *Rosa multiflora* fruits collected in South Korea.**



**Type I**



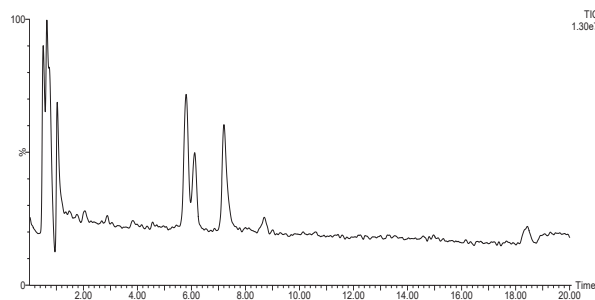
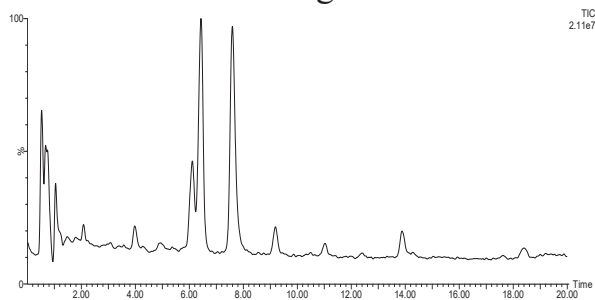
**Type II**

**Photo. 3-3 *Rosa multiflora* fruits of two chemotypes (Type I and Type II) collected in South Korea.**

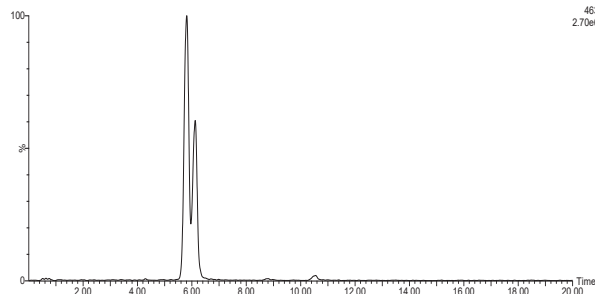
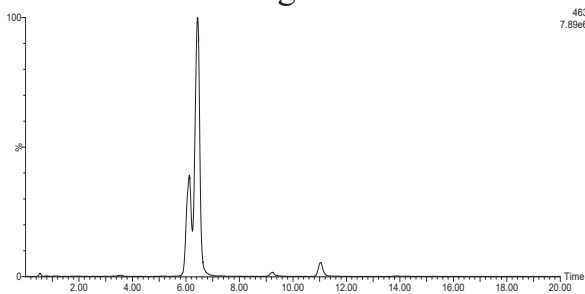
*R. luciae* growing in Japan

*R. multiflora* var. *multiflora*  
growing in South Korea

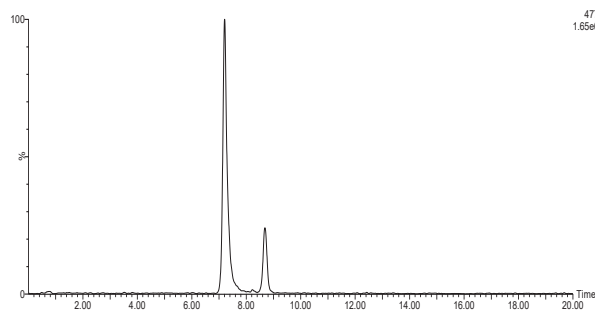
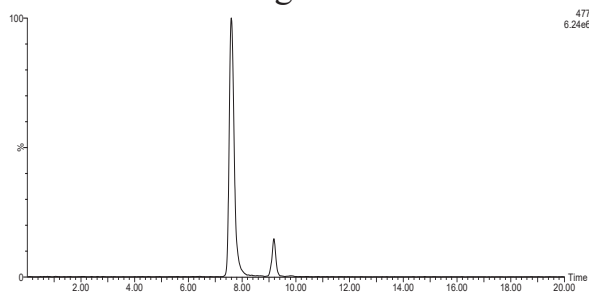
Total ion chromatograms



Mass chromatograms of  $m/z$  463



Mass chromatograms of  $m/z$  477



**Fig. 3-6 Comparison of the chemotypes (Type II) observed in *Rosa multiflora* var. *multiflora* growing in South Korea and *Rosa luciae* growing in Japan using LC/MS analysis.**

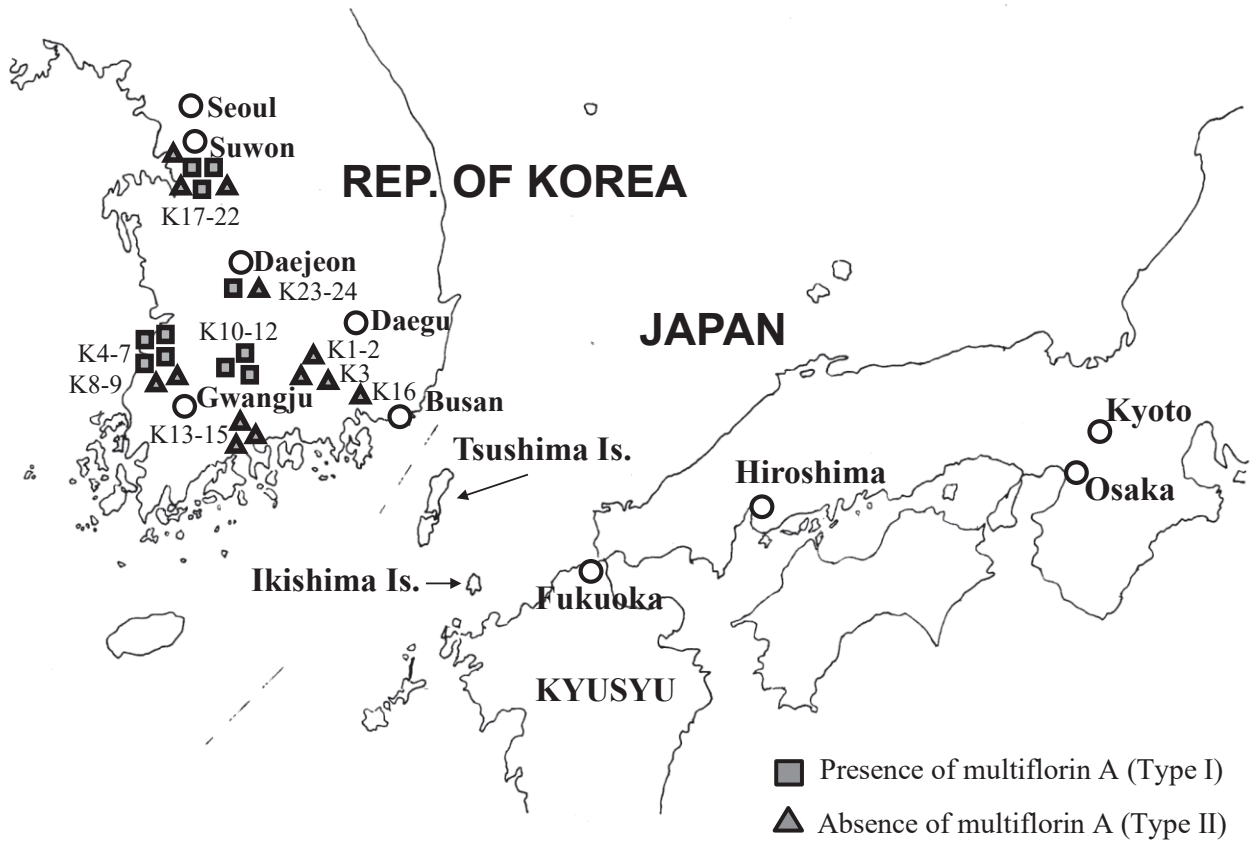


Fig. 3-7 Distribution of two chemotypes of *Rosa multiflora* growing in South Korea.

## 第六節 長崎県対馬島・壱岐島に自生するノイバラの HPLC profile 分析

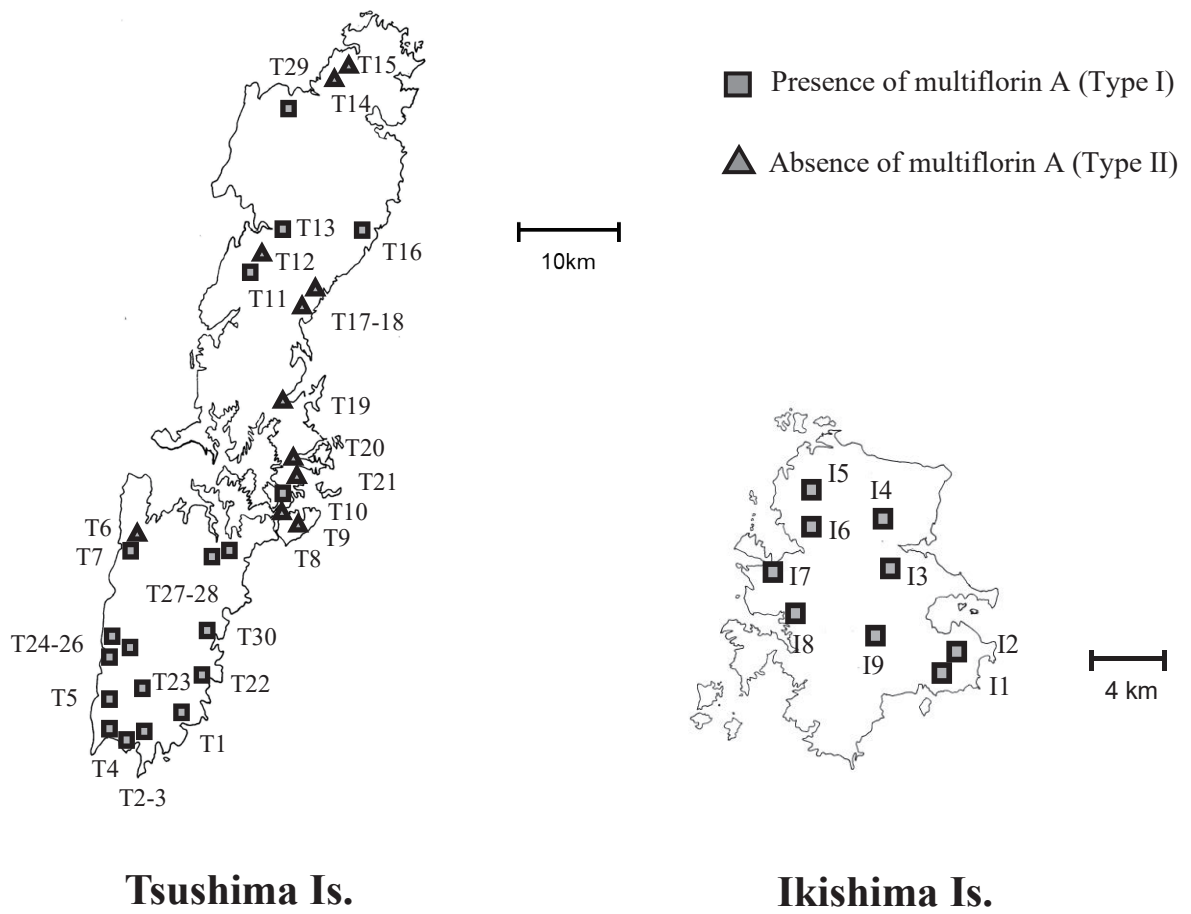
日本と韓国に自生するノイバラの調査結果を受け、Type IIのケモタイプを持つノイバラのさらなる分布調査を行うことを目的に、韓国まで 49.5 km に位置し、ユーラシア大陸との共通種が多く分布する長崎県対馬島および対馬島と九州の中間に位置する壱岐島において調査を行った (Table 3-3).

HPLC profile 分析の結果、対馬島は韓国と同様に、multiflorin A を含有する Type I と multiflorin A を含有しない Type II の 2 種類のケモタイプが混在していた。一方、その分布は規則性がみられなかった韓国とは異なり、北部は Type I と Type II が混在していたのに対し、南部は multiflorin A を含有する Type I のみが分布していた。すなわち、対馬北部は韓国と同様であり、南部は日本本土と同様の分布であった。北部の Type IIの分布割合は 13 サンプル中 10 サンプル (66.7%) で、Type Iより多い傾向にあった。また、壱岐島は日本本土と同様で multiflorin A を含有する Type I のみが分布していた (Fig. 3-8).

**Table 3-3 The main collection sites of *Rosa multiflora* in the Tsushima and Ikishima islands.**

Code no.	Chemotype	Location			Altitude (m)
		City	Latitude	Longitude	
T1	Type I	Kuwa, Izuhara-machi	34°07'43"N	129°15'27"E	20
T2-3	Type I	Tsutsu-naiin, Izuhara-machi	34°06'18"N	129°14'01"E	10
T4	Type I	Tsutsu, Izuhara-machi	34°06'45"N	129°12'09"E	0
T5	Type I	Tsutsu, Izuhara-machi	34°08'03"N	129°11'14"E	50
T6	Type II	Are, Izuhara-machi	34°16'28"N	129°12'10"E	50
T7	Type I	Are, Izuhara-machi	34°16'28"N	129°12'10"E	50
T8	Type II	Ogata, Mitsushima-cho	34°17'01"N	129°21'37"E	40
T9	Type II	Kusubo, Mitsushima-cho	34°17'57"N	129°21'28"E	40
T10	Type I	Oyama, Mitsushima-cho	34°18'16"N	129°21'24"E	0
T11	Type I	Kashitaki, Kamiagata-cho	34°30'43"N	129°20'36"E	100
T12	Type II	Kashitaki, Kamiagata-cho	34°30'43"N	129°20'36"E	100
T13	Type I	Kashitaki, Kamiagata-cho	34°32'03"N	129°21'09"E	10
T14	Type II	Oura, Kamitsushima-machi	34°39'48"N	129°26'23"E	10
T15	Type II	Oura, Kamitsushima-machi	34°39'48"N	129°26'23"E	10
T16	Type I	Hitoe, Kamitsushima-machi	34°31'56"N	129°27'07"E	0
T17-18	Type II	Shitaka, Mine-machi	34°29'21"N	129°23'57"E	70
T19	Type II	Urasoko, Toyotama-cho	34°23'24"N	129°21'15"E	0
T20	Type II	Kofunakoshi, Mitsushima-cho	34°20'11"N	129°21'49"E	0
T21	Type II	Tamazuke, Mitsushima-cho	34°18'48"N	129°21'22"E	0
T22	Type I	Oura, Izuhara-machi	34°09'54"N	129°16'59"E	30
T23	Type I	Tsutsu, Izuhara-machi	34°09'24"N	129°13'07"E	30
T24-26	Type I	Koutsuki, Izuhara-machi	34°11'21"N	129°10'54"E	10
T27-28	Type I	Kechi, Mitsushima-cho	34°16'17"N	129°18'03"E	10
T29	Type I	Sago, Kamiagata-cho	34°38'27"N	129°20'25"E	10
T30	Type I	Higashizato, Izuhara-machi	34°11'56"N	129°17'28"E	10
I1	Type I	Tsutsukihama, Ishida-cho	33°45'14"N	129°47'02"E	30
I2	Type I	Tsutsukihama, Ishida-cho	33°45'33"N	129°47'34"E	20
I3	Type I	Nakanogo-nakafure, Ashibe-cho	33°48'23"N	129°44'25"E	10
I4	Type I	Hakozaki-nakayamafure, Ashibe-cho	33°49'07"N	129°44'02"E	30
I5	Type I	Sakamotofure, Katsumoto-cho	33°50'10"N	129°41'13"E	40
I6	Type I	Hongu-minamifure, Katsumoto-cho	33°49'04"N	129°41'01"E	10
I7	Type I	Satofure, Gounoura-cho	33°48'04"N	129°40'07"E	90
I8	Type I	Ourafure, Gounoura-cho	33°46'59"N	129°40'24"E	30
I9	Type I	Yutake-konzakafure, Ashibe-cho	33°45'20"N	129°43'51"E	100



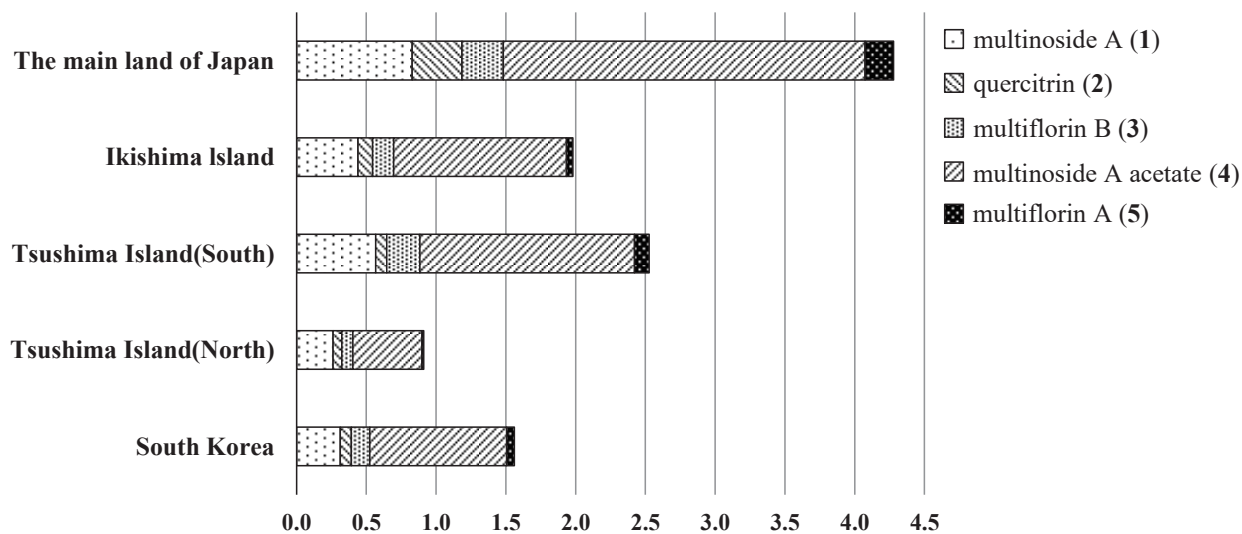


**Fig. 3-8** Distribution of two chemotypes of *Rosa multiflora* growing in Tsushima and Ikishima islands.

## 第七節 営実の化学的品質評価法の検討

日本および韓国に自生するノイバラ果実の multiflorin A をはじめとするフラボノール配糖体 (multiflorin 類) の含量調査の結果, 地域によるばらつきがみられた (Fig. 3-9). 一方, 瀉下作用を目的に生薬・営実を使用する場合は, 瀉下活性成分を確実に含有することと同時に, それらの含有量が安定していることが重要である. そこで, 瀉下活性成分を安定して含有するノイバラの国内栽培化を目的に, 営実の化学的品質評価法の確立を試みた.

評価には, マウスに対する瀉下活性が報告されている multiflorin A (ED<sub>50</sub> 値: 30 mg/kg), multinoside A acetate (150 mg/kg), multiflorin B (222 mg/kg) の 3 成分を考慮した<sup>49, 62)</sup> (Table 3-4). すなわち, multinoside A acetate 含量および multiflorin B 含量に multiflorin A の活性強度を 1 としたときの活性強度 (multinoside A acetate: 0.200, multiflorin B: 0.135) をそれぞれの含量に乗じて換算することで, 全瀉下活性成分含量を「Total multiflorin A」含量として算出した (Table 3-5). Total multiflorin A 含量として各営実の瀉下活性分量を比較することで, 主瀉下活性成分 multiflorin A 以外の成分含量も考慮した評価が可能となった. 現在, 秋田県美郷町において, Total multiflorin A 含量を 1.20 %–2.30 % の範囲で管理することで栽培系統を選抜し, 栽培化を進めている.



Collected site	N	compound 1	compound 2	compound 3	compound 4	compound 5	total flavonoid
The main land of Japan	10	0.829±0.228	0.357±0.088	0.296±0.069	2.591±0.904	0.205±0.118	4.279±1.224
Ikishima Island	9	0.440±0.184	0.105±0.042	0.151±0.050	1.237±0.580	0.047±0.034	1.981±0.808
Tsushima Island (South)	6	0.566±0.306	0.080±0.034	0.237±0.149	1.538±0.865	0.105±0.112	2.527±1.279
Tsushima Island (North)	5	0.261±0.098	0.063±0.013	0.079±0.015	0.496±0.266	0.012±0.005	0.911±0.385
South Korea	8	0.313±0.118	0.078±0.012	0.133±0.038	0.980±0.403	0.056±0.039	1.561±0.544

N: the number of samples

Each value represents the mean ± standard deviation.

**Fig. 3-9 Comparison of the total flavonoid content of *Rosa multiflora* fruits growing in South Korea, Tsushima , Ikishima Islands, and the main land of Japan.**

**Table 3-4 ED<sub>50</sub> values of three compounds and their conversion factor for purgative property.**

Compound name	ED <sub>50</sub> (mg/kg)	Conversion factor of multiflorin A
multiflorin A	30	1
multinoside A acetate	150	0.2
multiflorin B	222	0.135
sennoside A (stimulant purgative)	13	2.3

**Table 3-5 “Total multiflorin A” content of *Rosa multiflora* fruits collected in Japan.**

Compound name	multiflorin A	multinoside A acetate	multiflorin B	Total flavonoide
Content (%)	0.338	3.194	0.4380	3.97
Conversion factor for multiflorin A content	1	0.2	0.135	—
Converted content (%)	0.338	0.639	0.0591	<u>1.04</u> Total multiflorin A

## 第八節 総括および考察

日本本土に自生するノイバラについて HPLC profile 分析を行った結果、分析した全ての果実は multiflorin A を含有していた。一方、市場品の主な原産国である韓国および長崎県対馬島では multiflorin A を含有するケモタイプ (Type I) と multiflorin A を含有しないケモタイプ (Type II) の2つのケモタイプが存在していた。また、これら2つのケモタイプは日本国内において、テリハノイバラ (*R. luciae*) に存在した。各タイプの差異は、kaempferol および quercetin の3位に結合する糖鎖構造の違いであり、3-O-L-rhamnosyltransferase の有無が関与していると考えられる。すなわち、この酵素の遺伝子が欠損または発現していない場合は、multiflorin A 類を含有しないケモタイプ (Type II) となる可能性が考えられた。一方、各タイプは植物形態学的に同一であり、区別することは不可能であった。これより、2つのケモタイプについてはその生態学や進化論、遺伝学的研究による解明も必要である。また、本研究で明らかにした韓国および対馬島におけるケモタイプの分布については、数万年前に大陸や日本列島から離れて誕生したと推測されている対馬の地史や、植物地理学的な観点からの更なる検討も重要となる。

韓国に自生するノイバラを基原植物とした場合、multiflorin A を含有しない営実が輸入される可能性があり、これは現市場品の瀉下作用が弱い一因であると考えた。また、輸入した製造ロットごとにケモタイプが異なり、品質が安定しなくなることも想定された。

第十三改正日本薬局方以前に収載されていた営実は、「エイジツ *R. multiflora* またはその他近縁植物の偽果または果実」と規定されており<sup>63)</sup>、近縁植物を基原とした営実が市場で確認されている<sup>64)</sup>。一方、第十四改正以降『その他近縁植物』とされていたテリハ

ノイバラ (*Rosa wichuraiana* Crépin) は市場で見られない」という理由より、その文言は削除されている<sup>65, 66)</sup>。これより、過去には本研究で調査したヤマイバラ (*R. sambucina*) や Type II のテリハノイバラ (*R. luciae*) のような multiflorin A を含有しない近縁植物が基原となっていた可能性もある。また、中国最古の本草書である「神農本草経」において、営実は無毒で長期使用が可能とされる「上品」に収載され、中国では古くから利水や解毒効果を目的として浮腫や脚気等に対して用いられてきた<sup>64, 67)</sup>。一方、本草書中には瀉下薬という記載は認められず、瀉下作用は日本国内で独自に発展した使用目的であると考えられる。

以上のように、営実は、基原植物に近縁植物が含まれていたことや日本国内外で使用目的が異なるという背景があり、これらも瀉下作用が弱い営実が流通した一因であると考察した。第十七改正日本薬局方における営実の確認試験はマグネシウム塩酸反応によるフラボノールの呈色であり<sup>48)</sup>、multiflorin A の確認試験は規定されていない。このため、現市場品の multiflorin A を含有しない営実も確認試験に適した場合は生薬として適合するが、日本国内で瀉下作用を主目的として使用する場合は、multiflorin A を安定して含有する、日本本土のノイバラ (Type I) を基原植物とすることが望ましいと結論付けた。

現在、秋田県美郷町において国産営実 (Type I) の安定供給に向けた栽培化を実施している。栽培用ノイバラは、Total multiflorin A を一定量含有し収穫作業効率も考慮したトゲの無い系統を選抜した。また、Total multiflorin A 含量を基に選抜系統を絞り、挿し木による増殖を行っている。今後、収穫した果実の Total multiflorin A 含量を定期的に測定することで、瀉下活性成分を安定して含有する国産営実の生産が確立されることが望まれる。

## 論文目録

本論文の内容は、以下の雑誌に公表した。

- 1) Anti-inflammatory activates of *Ophiopogonis Radix* on hydrogen peroxide-induced cellular senescence of normal human dermal fibroblasts.

Yumi Kitahiro, Atsushi Koike, Aska Sonoki, Mei Muto, Kazuo Ozaki, Makio Shibano

*J. Nat. Med.* , **72** (4), 905-914 (2018).

- 2) Phytochemical Characterization of *Rosa multiflora* Thunb. (*Rosaceae*) in Japan and South Korea, with a focus on the bioactive flavonol glycoside “multiflorin A”

Yumi Kitahiro, Hiroshi Ikeda, Hyoung-Tak Im, Eiichi Kodaira, Makio Shibano

*J. Nat. Med.* , **73** (3), 555-565 (2019).





## 謝 辞

本研究の遂行ならびに本稿をまとめるにあたり、終始懇切なる御指導、御教示を賜りました芝野 真喜雄 准教授（大阪薬科大学 生薬科学研究室）に深甚なる謝意と敬意を表します。

本研究に対して、貴重な御助言を賜りました谷口 雅彦 教授（大阪薬科大学 生薬科学研究室）、平田 佳之 助教（大阪薬科大学 生薬科学研究室）、尾崎 和男 客員講師（大阪薬科大学 生薬科学研究室）、村上 能庸 客員講師（大阪薬科大学 生薬科学研究室）に深謝致します。

ノイバラの植物調査において懇切なる御指導を賜りました池田 博 准教授（東京大学 総合研究博物館）、任 炯卓 教授（全南大学）、古平 栄一 准教授（北里大学）に心より感謝の意を表します。また、国産営実の栽培化について貴重な情報を頂きました熊谷 和幸氏（秋田県美郷町役場農政課）ならびに照井 正樹 氏（(株) 美郷の大地）に感謝申し上げます。

qRT-PCR に関して御指導賜りました小池 敦資 助教（大阪薬科大学 病態生化学研究室）、600 MHz NMR スペクトルを測定して頂きました箕浦 克彦 准教授（大阪薬科大学 共同研究センター）、MS スペクトルを測定して頂きました藤嶽 美穂代 講師（大阪薬科大学 共同研究センター）に厚く御礼申し上げます。また、細胞実験に関して御指導賜りました蘇木 明日香 研究員に感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり御協力頂きました平田 芽以 修士、兼保 薫 学士、中平 美和 学士、竹林 咲喜 学士、岩本 滢奈 学士ならびに大阪薬科大学 生薬科学研究室員の皆様に心から感謝致します。



## 実験の部



## 各種測定装置および使用溶媒等

実験に用いた各種測定装置は次の通りである。質量分析装置：JEOL-MS 700 V；NMR装置（600 または 400 MHz proton NMR, 150 または 100 MHz carbon NMR）：Agilent VNMRS-600 または-400（Santa Clara, CA, USA）；内部標準：tetramethylsilane ( $\delta$  0 ppm)；UHPLC：SHIMADZU UHPLC system (SHIMADZU, Kyoto, Japan)；HPLC：SHIMADZU HPLC system または JASCO HPLC system (JASCO, Osaka, Japan)；LC/MS：Waters ACQUITY TQD LC/MS/MS system (Milford, MA, USA)；CO<sub>2</sub> インキュベーター：KM-CC17R2 (Panasonic, Tokyo, Japan)；自動細胞測定装置：Automated Cell Counter LUNA II™ (Biosystems, Barcelona, Spain)；卓上小型遠心分離機：2420 (KUBOTA, Tokyo, Japan)；紫外可視分光光度計：UV mini 1240 UV-Vis Spectrophotometer (SHIMADZU, Kyoto, Japan)；サーマルサイクラー：MyCycler (Bio-Rad, CA, USA)；qRT-PCR：StepOne™ software ver.2.2.2 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)。マイクロプレートリーダー：Model 680 XR (Bio-Rad, CA, USA)。

実験に用いた溶媒等は次の通りである。HPLC 移動相：acetonitrile, methanol (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)；NMR 測定溶媒：methanol-*d*<sub>4</sub>, CDCl<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Germany), pyridine-*d*<sub>5</sub> (Eurisotop, Saint-Aubin, France)；シリカゲル：PSQ-100B (Fuji Silysia Chemical Ltd, Aichi, Japan), 薄層クロマトグラフィー (TLC)：Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany)；蒸留水：Millipore Milli-Q (Bedford, MA, USA)。

また、生薬の調製には次の機器を使用した。乾燥機：WINDY OVEN WFO-1000ND (EYELA, Tokyo, Japan)；粉碎機：Wander Blender (Osaka Chemical, Osaka, Japan)。



## 第二章の実験

### 細胞

細胞は、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF) (KURABO, Osaka, Japan) (Lot: 00978) を使用した。

### 試液と培地

#### 培地

5% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM), 1% FBS 含有 DMEM, 無血清 DMEM を使用した。調製は、次の通りに行った。すなわち、DMEM 培地粉末 (NISSUI, Tokyo, Japan) 4.51 g (1% FBS 含有 DMEM は 4.70 g) を蒸留水 475 mL (495 mL) に溶解した。高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) した後、7.5 % 炭酸水素ナトリウム ( $\text{NaHCO}_3$ ) 7.2 mL (7.5 mL) と 200 mM L-グルタミン 10 mL を加えた。FBS (Biowest, MO, USA) (Lot: S14411S1820) 25 mL (5 mL) を加え、5 % FBS 含有 DMEM (1 % FBS 含有 DMEM) とした。無血清培地は、DMEM 培地粉末 4.70 g を蒸留水 495 mL に溶解し、高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) した後、7.5 %  $\text{NaHCO}_3$  7.5 mL と 200 mM L-グルタミン 10 mL を加えた。

#### 7.5 % $\text{NaHCO}_3$

炭酸水素ナトリウム ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 7.5 g を高圧蒸気滅菌し (121°C, 20 分), 滅菌蒸留水 100 mL に溶解した。

## 200 mM L-グルタミン

L-グルタミン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 2.92 g を蒸留水 100 mL に溶解した。溶液は 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルター (ステラディスク 25) (KURABO, Osaka, Japan) を用いてろ過滅菌した。

## PBS (-)

塩化ナトリウム (NaCl) 40 g, 塩化カリウム (KCl) 1.0 g, リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1.0 g (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を蒸留水 500 mL に溶かし, 121°C の高圧蒸気滅菌を 20 分間行った [10 倍濃度 PBS (-)]。10 倍濃度 PBS (-) 50 mL を蒸留水 450 mL に溶解し, 高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) を行った。

## PBS (+)

塩化カルシウム (無水物) ( $\text{CaCl}_2$ ) 50 mg, 塩化マグネシウム (六水和物) ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 50 mg (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を蒸留水 100 mL に溶かした溶液を, PBS (-) 400 mL に加えた。

## トリプシン

2.5 g/L-トリプシン/1 mmol/L-EDTA 溶液 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用した。

## $\text{H}_2\text{O}_2$

過酸化水素 (過酸化水素水 30%) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用した。



## 細胞培養

凍結保存していた NHDF を 100 mm dish に  $5 \times 10^5$  cells / dish の密度で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) 内で培養した。3 日から 4 日毎に培地交換を行い、サブコンフルエントの時点で継代を行った。継代は、次の通りに行った。すなわち、37 °C のウォーターバス内で培地、PBS (-), トリプシンを温めた。回収する dish と同じ本数の遠沈管に 5 % FBS 含有 DMEM を 5 mL ずつ加えた。アスピレーターで 100 mL dis

h の培地を吸い取り、PBS (-) 10 mL で洗浄した。トリプシン 2 mL を加え、30 秒間インキュベートした。顕微鏡で細胞が剥がれかけたことを確認し、駒込ピペットで細胞を回収した。回収した細胞を遠沈管に加え、遠心分離を行った (800 rpm, 3 分)。培地上清をアスピレーターで吸い取りタッピングした後、遠沈管 1 本につき 5 % FBS 含有 DMEM 1 mL を加え、50 mL の遠沈管に集め懸濁した。遠沈管からピペットで 25  $\mu$ L 取り出し、細胞数を測定した。得られた細胞数を基に、5 % FBS 含有 DMEM で希釈し、100 mm dish に分注し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

## 第四節の実験

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の最適濃度の検討

NHDF を  $3 \times 10^4$  cells / well の密度で 96 well plate に播種し、一晚培養した。細胞定着後、PBS (-) 200  $\mu$ L/well で洗浄した。無血清 DMEM 190  $\mu$ L / well を加え、終濃度 15  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M になるように調製した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / PBS (+) を培地の 1 / 10 量 (20  $\mu$ L) 添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間暴露させた。培養後、培地を 5 % FBS 含有 DMEM

に置換し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した。この操作を4回繰り返し行った。その後、細胞毒性、細胞増殖率、β-ガラクトシダーゼ染色およびSASP (IL-6, IL-8, IL-1β) の遺伝子発現を評価した。

#### 細胞毒性評価

Cell Count Kit-8 (CCK-8) (色素: WST-8) (DOJINDO, Kumamoto, Japan) を使用した。

操作は、次の通りに行った。すなわち、96 well plate または 48 well plate に培養した細胞に対し、CCK-8 溶液を各 well に培地の 1 / 10 量ずつ添加した。CO<sub>2</sub>インキュベーター内で2時間培養した後、マイクロプレートリーダーで450 nm の吸光度を測定した。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、formazan を生成する。細胞内脱水素酵素活性に応じて産出される NADH および NADPH は、1-methoxy PMS を介して WST-8 を formazan に還元する。この formazan の量は生細胞数に比例する。

#### SA-β-gal 染色

Cellular Senescence Detection Kit-SPiDER-βGal (DOJINDO, Kumamoto, Japan) を使用した。

操作は、次の通りに行った。すなわち、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行った NHDF を 5×10<sup>4</sup> cells / dish の密度で 35 mm dish に播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で一晩培養した。翌日、培地をアスピレーターで吸い取り無血清 DMEM 2 mL で洗浄した。内在性の β-ガラクトシダーゼ活性を抑制する目的で、ジメチルスルホキシド (DMSO) と無血清 DMEM を加えて希釈した Bafilomycin A1 working solution を 1mL 加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で1時間培養した。続いて DMSO と無血清 DMEM を加えて希釈した SPiDER-β gal working solution を 1mL 加え CO<sub>2</sub>インキュベーター内で30分間培養した。その後、上清を除き、無血清

DMEM 2 mL による洗浄を 2 回繰り返した後、励起光 488nm, 蛍光 500 - 600nm の範囲で蛍光顕微鏡による細胞の観察を行った。

#### 細胞増殖評価 (MTT 法)

Cell Proliferation Kit I (色素: MTT) (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) による細胞増殖率の測定を行った。

操作は、次の通りに行った。すなわち、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行った NHDF を  $3 \times 10^4$  cells / well の密度で 96 well plate に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養した。培養後、1 % FBS 含有 DMEM に MTT 試薬を溶解させ、0.2  $\mu$ m のメンブランフィルターを用いてろ過滅菌した試液を 100  $\mu$ L ずつ添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間培養した。培地を除去しイソプロパノールを 100  $\mu$ L ずつ添加した後、マイクロプレートリーダーで 570 nm および 650 nm の吸光度を測定し、570 nm における各 well の吸光度から 650 nm の吸光度を差し引いた値を測定吸光度とした。MTT は生細胞のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素により還元され、不溶性で暗青色の formazan に変化することから、生細胞の標識として用いられている。

#### RNA の抽出

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行った NHDF を  $2.5 \times 10^5$  cells / well の密度で 12 well plate に播種し、24 時間培養した。培養後、細胞を PBS (-) で洗浄し、ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) 500  $\mu$ L を加えピペッティングをしながら細胞を剥がし、オートクレーブ滅菌済みの 1.5 mL チューブに回収した。各チューブにクロロホルム 100  $\mu$ L を加えボルテックスで混和し、3 分間静置した後、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 15 分) を行った。上清 (水層) 225  $\mu$ L をピ

ペットで吸い取り，新たな滅菌済みチューブに回収した．水層に対してイソプロパノールを1:1の比率で加え，転倒混和し，10分間静置した後，遠心分離（15,000 rpm，4°C，10分）を行った．その後，上清を廃棄し，500  $\mu$ L の75% エタノールで洗浄し，遠心分離（15,000 rpm，4°C，5分）を行った．遠心分離後，上清を完全に廃棄し，10分間正確に乾燥させた．乾燥後，滅菌精製水を各チューブに20  $\mu$ L ずつ加えピペティングし，RNA 濃度を測定した．測定値に基づいて滅菌精製水を用いて希釈し，それらを電気泳動にかけ，バンドを確認した．

## qRT-PCR

### Premix 試薬の調製

Premix 試薬を以下の通りに PCR 用チューブに調製した．RNA は500 ng から1000 ng の範囲になるよう調製した．

### 1 サンプルあたりの premix 試薬

5 $\times$ RT Master mix	2 $\mu$ L
滅菌精製水	3 $\mu$ L
<u>RNA</u>	<u>5 <math>\mu</math>L</u>

Total 10  $\mu$ L

ボルテックスで Premix 試薬を混和し遠心分離を数秒かけた後，37°C 15分 $\rightarrow$ 50°C 5分 $\rightarrow$ 98°C 5分の条件で逆転写を行った．逆転写終了後，各チューブに90  $\mu$ L の滅菌精製水を加え10倍に希釈し，5 ng /  $\mu$ L になるように調製した．

### Primer Mix の調製

プライマー (50  $\mu$ M) を, 5  $\mu$ M になるよう以下の通りに調製した.

Primer Fw 20  $\mu$ L

Primer Re 20  $\mu$ L

滅菌精製水 160  $\mu$ L

Total 200  $\mu$ L

プライマーは, 以下の配列を使用した.

標的遺伝子	塩基配列
IL-6	Sense 5'-GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA-3'
	Antisense 5'-CTGCAGCCACTGGTTCTGT-3'
CXCL8 (IL-8)	Sense 5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3'
	Antisense 5'-ATGGTTCCTTCCGGTGGT-3'
IL-1 $\beta$	Sense 5'-TACCTGTCCTGCGTGTTGAA-3'
	Antisense 5'-TCTTTGGGTAATTTTGGGATCT-3'

### Premix の調製

Premix を滅菌済みチューブ内に以下の表の通りに調製し, PCR 用 96 well plate に添加し, qRT-PCR を行った. 測定方法は $\Delta\Delta C_t$ 法, 測定データは GAPDH で補正した.

	GAPDH	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$
Power SYBR Green PCR Master Mix	5	5	5	5
Primer Mix (5 $\mu$ M)	0.5	0.5	0.5	0.5
滅菌精製水	2.5	2.5	2.5	2.5
cDNA	2	2	2	2

(単位:  $\mu$ L)

#### 第五節の実験

市場品麦門冬（セッコウリュウノヒゲ *O. chekiangensis*）は、2015年と2017年にウチダ和漢薬から購入した。栽培品麦門冬（ジャノヒゲ *O. japonicus* var. *japonicus*）は、2015年から2017年にかけて大阪府河内長野市で栽培した。なお、*O. chekiangensis* は、根が太く、根に肥大部を形成し、花序の長さ 3.0–4.5 cm、花被片の長さ 4.5 cm–5.5 cm、花柱の長さ 4–5 mm、葯の長さ約 3 mm、1花あたり 4–5個の種子をつける。一方、*O. japonicus* は花序の長さ 1–3 cm、葯の長さ約 2.5 mm で、1花あたり 1–2個の種子をつけるという特徴がある<sup>26)</sup>。

## 第六節の実験

### 麦門冬メタノール抽出エキスの調製

2種類の麦門冬各1gを刻み、メタノール10mLによる30分間の還流抽出を行った。減圧下で濃縮させた抽出エキスを0.2µmのメンブランフィルター（ステラディスク13, KURABO, Tokyo, Japan）を用いてろ過滅菌した。

### 細胞毒性評価

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理を行ったNHDFを $3 \times 10^4$  cells / wellの密度で96 well plateに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で一晩培養した。培地を無血清DMEMに置換し、70%エタノールで終濃度25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mLに希釈調製した麦門冬メタノール抽出エキスを培地の1/100量添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した。培地を無血清DMEMに置換した後、CCK-8溶液を各wellに培地の1/10量ずつ添加した。CO<sub>2</sub>インキュベーター内で2時間培養し、マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定した。

## 第七節の実験

### SASPモデル細胞の作製

培養した100mm dishの培地をアスピレーターで除去し、PBS(-)10mLで洗浄した。無血清DMEM13.5mLを入れた後、終濃度100µMになるように調整したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS(+)

を培地の 1/10 量 (1.5 mL) ピペットで添加し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間暴露させた. 培養後, 培地を 5% FBS 含有 DMEM に置換し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内 24 時間培養した. この操作を 4 回繰り返し行った. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理終了後, NHDF を 6.25×10<sup>4</sup> cells /cm<sup>2</sup> の密度で 12 well, 24 well および 48 well plate に播種し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した. 培地を無血清 DMEM に置換し, 70 % エタノールで希釈調製した麦門冬メタノール抽出エキスを培地の 1 / 100 量添加し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した.

## RNA の抽出

第四節の実験 (RNA の抽出) を参照.

## qRT-PCR

第四節の実験 (qRT-PCR) を参照.

## ELISA 用サンプル

麦門冬メタノール抽出エキス添加後 24 時間培養した培地を滅菌済みチューブに回収し, ELISA 用サンプルとした. ELISA 用サンプルは, -80 °C で凍結保存した.

## ELISA

キットは Human IL-6 ELISA MAX<sup>TM</sup> Standard Set (BioLegend®, CA, USA) を使用した. 操作は, 次の通りに行った. すなわち, Capture Antibody で約 17 時間コーティングした 96 well plate を 300 μL / well の wash buffer で 4 回洗浄した. 次に 200 μL / well の blocking one (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加し, 室温で 1 時間振とうさせた. 1 時間後, 300 μL



/well の wash buffer で 4 回洗浄した。100  $\mu\text{L}$ /well の Standard Dilution と ELISA 用サンプルを添加し、室温で 2 時間振とうさせた。2 時間後、300  $\mu\text{L}$ /well の wash buffer で 4 回洗浄した。100  $\mu\text{L}$ /well の Detection Antibody を添加し、室温で 1 時間振とうさせた。1 時間後、300  $\mu\text{L}$ /well の wash buffer で 4 回洗浄した。100  $\mu\text{L}$ /well の Avidin-HRP を添加し、室温で 30 分間振とうさせた。30 分後、300  $\mu\text{L}$ /well の wash buffer で 5 回洗浄した。100  $\mu\text{L}$  の TMB Substrate Solution を添加し遮光した後、15 分から 30 分間、室温で静置した。100  $\mu\text{L}$  の Stop Solution を添加し反応を停止させ、15 分以内にマイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

## 第八節の実験

### HPLC 用サンプル調製

麦門冬 1 g を刻み、メタノール 10 mL による 30 分間の還流抽出を行った。抽出液を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過したものを HPLC 用サンプルとした。

### HPLC profile 分析

カラム: Cosmosil 2.5C18-MS-II (2.0 i.d.  $\times$  100 mm)

移動相: A 液 10% アセトニトリル (1% 酢酸含有)

B 液 80% アセトニトリル (1% 酢酸含有)

グラジエントプログラム: 0 分 B 液 30%, 20 分 B 液 100%,

21 分 B 液 30%, 25 分 B 液 30%

流速：0.2 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出: DAD, UV 295 nm, 注入量: 5  $\mu$ L.

#### 化合物 1-4 の単離精製

2種類の麦門冬〔セッコウリュウノヒゲ *O. chekiangensis* (Type A) とジャノヒゲ *O. japonicus* var. *japonicus* (Type B)〕各 100g を細かく刻み, メタノール 300 mL で還流抽出を 3 回繰り返した. その抽出液を減圧下濃縮させ, メタノールエキスを得た. 次にメタノール抽出エキスをシリカゲルクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 150 g, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10 : 0 → 0 : 10) に付し, Fr. 1-14 にフラクショネーションした. Fr. 7-9 について, 分取 HPLC を繰り返すことにより, Type A から methylophiopogonanone A (1) (9.6 mg) と methylophiopogonanone B (2) (16.8 mg) を, Type B から methylophiopogonanone A (1) (10.6 mg) と ophiopogonanone A (3) (7.1 mg) を単離精製した. 分取 HPLC の条件は次の通りである. カラム: Cosmosil 5C18-MS-II または 5C18-AR-II または 5PE または Nacalai Tesque Cholester (10 i.d. × 250 mm), 移動相: アセトニトリル 55 % (1% 酢酸含有), 流速: 1.2 mL/min, 検出: UV 295 nm, カラム温度: 室温. また, ophiopogonin B (4) (20.4 mg) については, Type A, B の Fr. 2-4 から単離精製した. 分取 HPLC の条件は次の通りである. カラム: Cosmosil 5C18-MS-II または 5C18-AR-II または 5PE または Nacalai Tesque Cholester (10 i.d. × 250 mm), 移動相: アセトニトリル 50 % (1% 酢酸含有), 流速: 1.2 mL/min, 検出: RI, カラム温度: 室温.

## 化合物 1-4 のスペクトルデータ

### methylophiopogonanone A (1)

A colorless powder; FAB-MS  $m/z$ : 343,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4.08 (1H, dd,  $J = 11.5, 7.0$  Hz, H-2), 4.28 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.0$  Hz, H-2), 2.68 (1H, m, H-3), 2.63 (1H, dd,  $J = 14.0, 10.0$  Hz, H-9), 3.18 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.0$  Hz, H-9), 6.74 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz, H-2'), 6.78 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.65 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, H-6'), 5.94 (2H, s, H-7'), 1.98 (3H, s,  $CH_3$ -C6), 2.02 (3H, s,  $CH_3$ -C8), 12.10 (1H, s, OH-C5). LC/MS:  $t_R = 12.5$  min, negative ESI  $m/z$ : 341,  $[M-H]^-$

### methylophiopogonanone B (2)

A colorless powder; FAB-MS  $m/z$ : 329,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4.09 (1H, dd,  $J = 11.5, 7.0$  Hz, H-2), 4.28 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.0$  Hz, H-2), 2.79 (1H, m, H-3), 2.68 (1H, dd,  $J = 14.0, 10.0$  Hz, H-9), 3.17 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.0$  Hz, H-9), 7.15 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2', H-6'), 6.86 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3', H-5'), 2.00 (3H, s,  $CH_3$ -C6), 2.06 (3H, s,  $CH_3$ -C8), 3.78 (3H, s,  $OCH_3$ -C7'), 12.16 (1H, s, OH-C5). LC/MS:  $t_R = 13.2$  min, negative ESI  $m/z$ : 327,  $[MH]^-$

### ophiopogonanone A (3)

A colorless powder; FAB-MS  $m/z$ : 329,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4.08 (1H, dd,  $J = 11.5, 7.0$  Hz, H-2), 4.27 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.0$  Hz, H-2), 2.76 (1H, m, H-3), 5.95 (1H, s, H-8), 2.63 (1H, dd,  $J = 14.0, 10.0$  Hz, H-9), 3.15 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.0$  Hz, H-9), 6.82 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz, H-2'), 6.88 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.73 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, H-6'), 5.97 (2H, s, H-7'), 1.98

(3H, s, CH<sub>3</sub>-C6), 12.10 (1H, s, OH-C5). LC/MS:  $t_R$  = 10.8 min, negative ESI  $m/z$ : 327, [M-H]<sup>-</sup>

#### ophiopogonin B (4)

A colorless powder; FAB-MS  $m/z$ : 723, [M+H]<sup>+</sup>, <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, Pyridine-d<sub>5</sub>)  $\delta$ : 85.1 (C-1), 37.7 (C-2), 69.3 (C-3), 43.4 (C-4), 139.7 (C-5), 126.0 (C-6), 33.0 (C-7), 34.1 (C-8), 51.7 (C-9), 43.5 (C-10), 24.7 (C-11), 41.5 (C-12), 41.2 (C-13), 58.3 (C-14), 32.8 (C-15), 82.3 (C-16), 64.1 (C-17), 17.2 (C-18), 15.3 (C-19), 43.0 (C-20), 14.9 (C-21), 110.7 (C-22), 32.5 (C-23), 29.9 (C-24), 31.5 (C-25), 67.9 (C-26), 17.5 (C-27), 100.9 (Fuc-1), 75.1 (Fuc-2), 77.0 (Fuc-3), 73.9 (Fuc-4), 71.5 (Fuc-5), 17.9 (Fuc-6), 101.6 (Rha-1), 72.4 (Rha-2), 72.2 (Rha-3), 74.2 (Rha-4), 69.6 (Rha-5), 18.4 (Rha-6).

#### LC / MS 分析

麦門冬粉末 100 mg をはかり，メタノール 10 mL による 30 分間の還流抽出を行った。抽出液をフィルターろ過した。条件は次の通りである。カラム: Cosmosil 2.5C18-MS-II (2.0 i.d. × 100 mm)，移動相: A 液 10 % アセトニトリル (1% 酢酸含有)，B 液 80 % アセトニトリル (1% 酢酸含有)，グラジエント条件: 0 分 B 液 30 %，20 分 B 液 100 %，21 分 B 液 30 %，25 分 B 液 30 %，流速 0.2 mL/min，カラム温度: 40°C，エレクトロスプレー法 (electrospray ionization: ESI)，コーン電圧 40 V，注入量: 1  $\mu$ L。

## 第九節の実験

### 化合物 1-4 溶液の調製

70 % エタノールに溶解した化合物 1-4 およびポジティブコントロールの apiin を 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターを用いてろ過滅菌した。

### 細胞毒性評価

$\text{H}_2\text{O}_2$  処理を行った NHDF を  $3 \times 10^4$  cells / well の密度で 96 well plate に播種し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で一晩培養した。培地を無血清 DMEM に置換し、70 % エタノールで終濃度 3.75  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , 7.5  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , 15  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , 75  $\mu\text{mol} / \text{L}$  に希釈調製した化合物 1-3, 3.5  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , 7.0  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , 35  $\mu\text{mol} / \text{L}$  に希釈調製した化合物 4 および 9.0  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , 45  $\mu\text{mol} / \text{L}$  に希釈調製した apiin を培地の 1 / 100 量添加し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 24 時間培養した。培地を無血清 DMEM に置換した後、CCK-8 溶液を各 well に培地の 1 / 10 量ずつ添加した。 $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 2 時間培養し、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

## 第十節の実験

### qRT-PCR

第四節の実験 (qRT-PCR) を参照。

## ELISA 用サンプルおよび ELISA

第七節の実験を参照.

## 第十一節の実験

### 漢方薬水抽出エキスの調製

医療用漢方エキス製剤（ツムラ又は小太郎）100 mg を蒸留水 4 mL に溶解させ、5 分間超音波抽出した後、遠心分離を行った（12,000 rpm, 15°C, 10 分）。抽出液をポリアミド樹脂カラム（Discovery<sup>®</sup> DPA-6S 6mL Tube SUPELCO）（Merck, Darmstadt, Germany）に付し、得られた抽出液を減圧下で濃縮させた。蒸留水 1 mL で溶解し、0.2 μm のメンブランフィルターを用いてろ過滅菌したものを 100 mg / mL 漢方薬水抽出エキスとした。

## ELISA 用サンプルおよび ELISA

第七節の実験を参照.

### 統計学的処理

実験結果は、平均値 ± 標準偏差で表した。2 群間における有意差検定は、Student's *t* test を行った。3 群間以上の有意差検定は、Tukey-Kramaer post hoc test を行った。判定は、 $P < 0.05$  の場合に有意差があると判定した。解析は、Pharmaco Basic ver. 15 と IBM SPSS Statistics ver. 22 を使用した。

## 第三章の実験

### 第三節，第四節の実験

#### ノイバラ類（バラ属ノイバラ節）果実の採集

採集期間：2016年8月－2017年12月

採集場所：秋田県，青森県，神奈川県，長野県，岐阜県，山梨県，愛知県，大阪府，  
京都府，兵庫県，奈良県，和歌山県，岡山県，愛媛県，香川県，高知県，  
徳島県，長崎県，福岡県

サンプル：ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) N=109

（そのうち8月採集未熟果実 N= 16）

ツクシイバラ (*R. multiflora* var. *adenochaeta*) N= 3

フジイバラ (*R. fujisanensis*) N= 3

ミヤコイバラ (*R. paniculigera*) N= 3

ヤブイバラ (*R. onoei* var. *onoei*) N= 10

アズマイバラ (*R. onoei* var. *oligantha*) N= 3

モリイバラ (*R. onoei* var. *hakonensis*) N= 5

ヤマイバラ (*R. sambucina*) N= 5

テリハノイバラ (*R. luciae*) N= 26

## HPLC 用サンプル調製

十分に乾燥させたノイバラ果実（40℃温風乾燥後，シリカゲルにより乾燥）を粉末機にて粉末にした．粉末をスピッツ管に 100 mg 精秤し，ホールピペットを用いてメタノール 10 mL を加えた．次に，30 分間の超音波抽出を行い，抽出液を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過したものを HPLC 用サンプルとした．

## HPLC profile 分析

カラム：Shim-pack XR-ODS III (2.0 i.d.×150 mm)

移動相：A 液 10% アセトニトリル（1% 酢酸含有）

B 液 30% アセトニトリル（1% 酢酸含有）

グラジエントプログラム：

A 液 95%，B 液 5% から 15 min で A 液 40%，B 液 60% へリニアグラジエント  
17.5 min A 液 40%，B 液 60%，17.6 min A 液 95%，B 液 5%，22.5 min 終了

流速：0.4 mL/min，カラム温度：40℃，検出：PDA（UV 350 nm），注入量：3  $\mu\text{L}$ ．

## 化合物 1-10 の単離精製

兵庫県淡路島泉南市で採集したノイバラ果実とテリハノイバラ（multiflorin A を含有しない Type II）果実（各 100 g）を粉砕機で粉末にし，メタノールで還流抽出を 3 回繰り返した．その抽出液を減圧下で濃縮させ，メタノールエキスを得た．次にメタノール抽出エキスをシリカゲルクロマトグラフィー（SiO<sub>2</sub> 200 g，CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:0 → 0:10）に付し，Fr. 1-17 の分画を得た．Fr. 8-14 について，分取 HPLC を繰り返すことにより，ノイバラから multinoside A (**1**) (14.6 mg)，quercitrin (**2**) (16.2 mg)，multiflorin B (**3**) (16.8 mg)，



multinoside A acetate (**4**) (106.0 mg), multiflorin A (**5**) (55.6 mg), テリハノイバラ (Type II) から hyperin (**6**) (3.2 mg), isoquercitrin (**7**) (6.2 mg), quercetin 3-*O*-glucuronide (**8**) (3.8 mg), 3'-methoxy-isoquercitrin (**9**) (4.3 mg), quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-(*E*)-*p*-coumaryl) glucopyranoside (**10**) (4.9 mg) を単離, 精製した. 分取 HPLC の条件は, 次の通りである. カラム: Cosmosil 5C18-MS-II または 5C18-AR-II または 5PE または Nacalai Tesque Cholester (10 i.d.  $\times$  250 mm), 移動相: 20 %アセトニトリル (1% 酢酸含有), 流速: 1.2 mL/min, 検出: UV 254 nm, カラム温度: 40  $^{\circ}$ C.

#### 化合物 **1–10** のスペクトルデータ

##### multinoside A (**1**)

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 611,  $[M+H]^+$ ,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.28 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-6), 6.08 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-8), 7.22 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.83 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-5'), 7.16 (1H, dd,  $J=8.2, 2.0$  Hz, H-6'), 5.24 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, Rha-1), 0.91 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, Rha-6), 4.45 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Glc-1). LC/MS:  $t_R=9.2$  min, negative ESI  $m/z$ : 609,  $[M-H]^-$

##### quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (**2**)

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 449,  $[M+H]^+$ ,  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.37 (1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-6), 6.19 (1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-8), 7.31 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.90 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-5'), 7.29 (1H, dd,  $J=8.2, 2.0$  Hz, H-6'), 5.34 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, Rha-1), 0.94 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, Rha-6). LC/MS:  $t_R=9.7$  min, negative ESI  $m/z$ : 447,  $[M-H]^-$

**multiflorin B (3)**

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 595,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.25 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 6.10 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-8), 6.93 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2', 6'), 7.22 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3', 5'), 5.24 (1H, d,  $J=1.4$  Hz, Rha-1), 0.96 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, Rha-6), 4.39 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Glc-1). LC/MS:  $t_R=11.5$  min, negative ESI  $m/z$ : 593,  $[M-H]^-$

**multinoside A acetate (4)**

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 653,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.25 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-6), 6.08 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-8), 7.21 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-2'), 6.81 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 7.16 (1H, dd,  $J=8.4, 2.2$  Hz, H-6'), 5.26 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, Rha-1), 0.85 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, Rha-6), 4.46 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, Glc-1), 1.92 (3H, s, Glc-6 Ac). LC/MS:  $t_R=13.3$  min, negative ESI  $m/z$ : 651,  $[M-H]^-$

**multiflorin A (5)**

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 637,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.24 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-6), 6.07 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-8), 6.82 (2H, d,  $J=8.6$  Hz, H-2', 6'), 7.61 (2H, d,  $J=8.6$  Hz, H-3', 5'), 5.24 (1H, d,  $J=1.7$  Hz, Rha-1), 0.85 (3H, d,  $J=6.1$  Hz, Rha-6), 4.38 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Glc-1), 1.91 (3H, s, Glc-6 Ac). LC/MS:  $t_R=15.8$  min, negative ESI  $m/z$ : 635,  $[M-H]^-$

hyperin (**6**)

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 465,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 6.90 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-6), 6.82 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-8), 8.70 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-2'), 7.47 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 8.33 (1H, dd,  $J=8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 6.26 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Glc-1).  
LC/MS:  $t_R=6.4$  min, negative ESI  $m/z$ : 463,  $[M-H]^-$

isoquercitrin (**7**)

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 465,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 6.90 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-6), 6.82 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-8), 8.72 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-2'), 7.44 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 8.23 (1H, dd,  $J=8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 6.41 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Glc-1).  
LC/MS:  $t_R=6.6$  min, negative ESI  $m/z$ : 463,  $[M-H]^-$

quercetin 3-*O*-glucuronide (**8**)

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 479,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 6.88 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-6), 6.78 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-8), 8.60 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-2'), 7.44 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 8.38 (1H, dd,  $J=8.5, 2.2$  Hz, H-6'), 6.62 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, GlcA-1).  
LC/MS:  $t_R=7.7$  min, negative ESI  $m/z$ : 477,  $[M-H]^-$

3'-methoxy-isoquercitrin (**9**)

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 479,  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (600 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 6.75 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 6.73 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-8), 8.54 (1H, d,  $J=1.7$  Hz, H-2'), 7.27 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 7.81 (1H, dd,  $J=8.5, 1.7$  Hz, H-6'), 3.96 (3H, s, C-3'-OCH<sub>3</sub>), 6.57

(1H, d,  $J = 7.9$  Hz, Glc-1), 4.36\* (1H, Glc-2), 4.43\* (1H, Glc-3), 4.36\* (1H, Glc-4), 4.09 (1H, m, Glc-5), 4.36\* (1H, Glc-6), 4.43\* (1H, Glc-6).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 157.6 (C-2), 134.8 (C-3), 178.8 (C-4), 162.9 (C-5), 99.9 (C-6), 166.0 (C-7), 94.7 (C-8), 157.3 (C-9), 105.4 (C-10), 123.2 (C-1'), 114.5 (C-2'), 148.1 (C-3'), 151.3 (C-4'), 116.3 (C-5'), 122.2 (C-6'), 56.3 (C-3'-OCH<sub>3</sub>), 103.5 (Glc-1), 76.4 (Glc-2), 78.6 (Glc-3), 71.5 (Glc-4), 79.2 (Glc-5), 62.3 (Glc-6). LC/MS:  $t_R = 10.3$  min, negative ESI  $m/z$ : 477, [M-H]<sup>-</sup> (\*: overlapped signals)

quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-(*E*)-*p*-coumaryl) glucopyranoside (**10**)

A pale yellowish powder; FAB-MS  $m/z$ : 611, [M+H]<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 6.68 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 6.62 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 8.36 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-2'), 7.30 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-5'), 8.13 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.3$  Hz, H-6'), 6.24 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, Glc-1), 4.38\* (1H, Glc-2), 4.38\* (1H, Glc-3), 4.13 (1H, m, Glc-4), 4.21 (1H, m, Glc-5), 5.02 (1H, dd,  $J = 11.8, 6.2$  Hz, Glc-6), 4.84 (1H, dd,  $J = 11.8, 2.1$  Hz, Glc-6), 7.50 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2'''), 6'''), 7.14 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3''', 5'''), 6.52 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7'''), 7.84 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8''').  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 158.0 (C-2), 135.2 (C-3), 178.7 (C-4), 162.7 (C-5), 99.8 (C-6), 165.9 (C-7), 94.6 (C-8), 157.6 (C-9), 105.2 (C-10), 122.4 (C-1'), 117.7 (C-2'), 146.9 (C-3'), 150.8 (C-4'), 116.2 (C-5'), 122.8 (C-6'), 104.3 (Glc-1), 76.0 (Glc-2), 78.5 (Glc-3), 71.3 (Glc-4), 76.1 (Glc-5), 64.3 (Glc-6), 126.2 (C-1'''), 130.7 (C-2''', 6'''), 116.7 (C-3''', 5'''), 161.3 (C-4'''), 115.0 (C-7'''), 145.1 (C-8'''), 167.4 (C-9'''). LC/MS:  $t_R = 14.5$  min, negative ESI  $m/z$ : 609, [M-H]<sup>-</sup> (\*: overlapped signals)

## LC/MS 分析

カラム : Shim-pack XR-ODS III (2.0 i.d.×150 mm)

移動相 : A 液 10 % アセトニトリル (1 % 酢酸含有)

B 液 30 % アセトニトリル (1 % 酢酸含有)

グラジエントプログラム :

A 液 95 %, B 液 5 % から 15 min で A 液 40 %, B 液 60 % へリニアグラジエント,  
17.5 min A 液 40 %, B 液 60 %, 17.6 min A 液 95 %, B 液 5 %, 22.5 min 終了

流速 : 0.4 mL / min カラム温度 : 40 °C

検出 : positive or negative electrospray ionization (ESI) コーン圧 : 40 V 注入量 : 1 µL

## 第五節の実験

ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) 果実の採集

採集期間 : 2016 年 12 月 - 2018 年 9 月

採集場所 : 韓国 水原, 大田, 光州 (総論の部 第三章 Table 3-2 参照).

サンプル : ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) N=24

## HPLC 用サンプル調製および HPLC profile 分析

第三節, 第四節の実験 (HPLC 用サンプル調製, HPLC profile 分析) を参照.

## 第六節の実験

ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) 果実の採集

採集期間：2018年2月，2018年10月

採集場所：長崎県対馬島，壱岐島（総論の部 第三章 Table 3-3 参照）.

サンプル：ノイバラ (*R. multiflora* var. *multiflora*) N=39

## HPLC用サンプル調製およびHPLC profile分析

第三節，第四節の実験（HPLC用サンプル調製，HPLC profile分析）を参照.

## 第七節の実験

### 標準品の調製

収量を正確に測定した化合物 **1-5** のサンプル管に，ホールピペットを用いてメタノール 15 mL を加えた. 2 mL をホールピペットではかった後，10 mL のメスフラスコに加え，メタノールで 10 mL にメスアップした (STD1). STD1 から 2 mL をメスピペットではかり，10 mL のメスフラスコに加え，メタノールで 10 mL にメスアップした (STD2, 5倍希釈). STD1 から 1 mL をメスピペットではかり，10 mL のメスフラスコに加え，メタノールで 10 mL にメスアップした (STD3, 10倍希釈). STD3 から 1 mL をメスピペットではかり，10 mL のメスフラスコに加え，メタノールでメスアップした (STD4, 100倍希釈). STD4 から 5 mL をメスピペットではかり，10 mL のメスフラスコに加え，メタノール

ルで 10 mL にメスアップした (STD5, 200 倍希釈). STD1-5 を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過したものを HPLC 用サンプルとした.

## HPLC 条件

カラム : Shim-pack XR-ODS III (2.0 i.d.×150 mm)

移動相 : A 液, 10 % アセトニトリル (1 % 酢酸含有)

B 液, 30 % アセトニトリル (1 % 酢酸含有)

グラジエントプログラム :

A 液 95 % , B 液 5 % から 15 min で A 液 40 % , B 液 60 % ヘリニアグラジエント,  
17.5 min A 液 40 % , B 液 60 % , 17.6 min A 液 95 % , B 液 5 % , 22.5 min 終了

流速 : 0.4 mL / min カラム温度 : 40  $^{\circ}\text{C}$  検出 : PDA (UV 350 nm) 注入量 : 3  $\mu\text{L}$

## 検量線

### multinoside A (1)

濃度 : 1.824 mg/mL, 0.3648 mg/mL, 0.1824 mg/mL, 0.01824 mg/mL, 0.00912 mg/mL

検量線 :  $y = 2330350x - 4250, r = 0.9999$

### quercitrin (2)

濃度 : 0.680 mg/mL, 0.1360 mg/mL, 0.0680 mg/mL, 0.00680 mg/mL, 0.0034 mg/mL

検量線 :  $y = 2453897x - 7707, r = 0.9999$

multiflorin B (3)

濃度 1.000 mg/mL, 0.2000 mg/mL, 0.100 mg/mL, 0.0100 mg/mL, 0.00500 mg/mL

檢量線 :  $y = 1898581 x - 8670, r = 0.9999$

multinoside A acetate (4)

濃度 : 0.656 mg/mL, 0.1312 mg/mL, 0.0656 mg/mL, 0.00656 mg/mL, 0.00328 mg/mL

檢量線 :  $y = 1879946 x - 8671, r = 0.9997$

multiflorin A (5)

濃度 : 1.110 mg/mL, 0.222 mg/mL, 0.111 mg/mL, 0.0111 mg/mL, 0.00555 mg/mL

檢量線 :  $y = 2974876 x - 1877, r = 0.9999$



## 引用文献

- 1) 第十七改正日本薬局方, じほう, 1881 (2016).
- 2) Watanabe Y. , Sanada S. , Tada A. , Shoji J. , *Chem Pharm Bull*, **25** (11), 3049-3055 (1977).
- 3) Tada A. , Shoji J. , *Chem Pharm Bull*, **20** (8), 1729-1734 (1972).
- 4) Tada A. , Kobayashi M. , Shoji J. , *Chem Pharm Bull*, **21** (2), 308-311(1973).
- 5) Tada A. , Kasai R. , Saitoh T. , Shoji J. , *Chem Pharm Bull*, **28** (5), 1477-1484(1980).
- 6) Kaneda N. , Nakanishi H. , Kuraishi T. , Kaori T. , *Chem Pharm Bull*, **103** (3), 1133-1139 (1983).
- 7) Asano T. , Maruyama T. , Hirai Y. , Shoji J. , *Chem Pharm Bull*, **41** (2), 391-393 (1993).
- 8) Kou J. , Sun Y. , Lin Y. , Cheng Z. , Zheng W. , Yu B. , Xu Q. , *Biol Pharm Bull*, **28** (7), 1234-1238 (2005).
- 9) Qian J. , Jiang F. , Wang B. , Yu Y. , Zhang X. , Yin Zhimin. , Liu C. , *J. Ethnopharmacol*, **128**, 438-445 (2010).
- 10) Ishibashi H. , Mochidome T. , Okai J. , Ichiki H. , Shimada H. , Takahama K. , *Br. J. Pharmacol*, **132**, 461-466 (2001).
- 11) Chen M. , Du Y. , Qui M. , Wang M. , Chen K. , Huang Z. , Jiang M. , Xiong F. , Chen J. , Zhou J. , Jiang F. , Yin L. , Tang Y. , Ye L. , Zhan Z. , Duan JA. , Fu HA. , Zhang Xu. , *Oncol Rep*, **29**, 430-436 (2013).
- 12) Wang H. , *Asian Pac J Trop Med*, **6** (4), 269-299 (2013).
- 13) Hayflick L. , Moorhead PS. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621 (1961).
- 14) Childs BG. , Durik M. , Baker DJ. , van Deursen JM. , *Nat Med*, **21** (12), 1424–1435 (2015).
- 15) Campisi J. , *Annu Rev Physiol*, **75**, 685-705 (2013).
- 16) Coppé JP. , Desprez PY. , Krtolica A. , Campisi J. , *Annu Rev Pathol*, **5**, 99–118 (2010).

- 17) Moon SC. , Park SC. , Yeo EJ. , Kwak CS. , *J Med Food*, **12** (3), 485-492 (2009).
- 18) Takata T. , Motoo Y. , Tomosugi N. , *J Integr Med*, **12** (6), 495-503 (2014).
- 19) Chen JH. , Stoeber K. , Kingsbury S. , Ozanne SE. , Williams GH. , Hales N. , *J Biol Chem*, **279** (47), 49439-49446 (2004).
- 20) Park MA. , Sim MJ. , Kim YC. , *Toxicol Res*, **33** (2) 125-134 (2017).
- 21) Deng M. , Li D. , Zhang Y. , Zhou G. , Liu W. , Cao Y. , Zhang W. , *Mol Med*, **18**, 1439-1446 (2018).
- 22) Baker DJ. , Childs BG. , Durik M. , Wijers ME. , Sieben CJ. , Zhong J. , Saltness RA. , Jeganathan KB. , Verzosa GC. , Pezeshki A. , Khazaite K. , Miller JD. , van Deursen JM. , *Nature*, **530**, 184-189 (2016).
- 23) Xu M. , Pirtskhalava T. , Farr JN. , Weigand BM. , Palmer AK. , Weivoda MM. , Inman CL. , Ogrodnik MB. , Hachfeld CM. , Fraser DG. , Onken JL. , Johnson KO. , Verzosa GC. , Langhi LGP. , Weigl M, Giorgadze N. , LeBrasseur NK. , Miller JD. , Jurk D. , Singh RJ. , Allison DB. , Ejima K. , Hubbard GB. , Ikeno Y. , Cubro H. , Garovic VD. , Hou X. , Weroha SJ. , Robbins PD. , Niedernhofer LJ. , Khosla S. , Tchkonja T. , Kirkland JL. , *Nature Med*, **24**, 1246-1256 (2018).
- 24) Xie L. , Tsaprailis G. , Chen QM. , *Mol Cell Proteomics*, **4** (9), 1273-1283(2005).
- 25) Fukuda T. , *J Jpn Bot*, **94** (5), 306-317 (2019).
- 26) Tanaka T. , Mizuno M. , Noro Y. , Kimura K. , *Shoyaku Zasshi*, **32** (3), 136-148 (1978).
- 27) Lim H. , Park H. , Kim HP. , *Biochem Pharmacol*, **96** (4), 337-348 (2015).
- 28) Kevin M. , Perrott CD. , Wiley J. , *Gero Science*, **39**, 161-173 (2017).
- 29) 桑木共之, 黒澤美枝子, 高橋研一, 細谷安彦, トートラ 人体の構造と機能 第4版, 丸善出版, 128-129, 154 (2012).

- 30) Argilés JM. , Busquets S. , Stemmler B. , López-Soriano FJ. , *Nat Rev Cancer*, **14** (11), 754-762 (2014).
- 31) Fearon K. , Strasser F. , Anker SD. , Bosaeus I. , Bruera E. , Fainsinger RF. , Jatoi A. , Loprinzi C. , MacDonald N. , Mantovani G. , Davis M. , Muscaritoli M. , Ottery F. , Radbruch L. , Ravasco P. , Walsh D. , Wilcock A. , Kaasa S. , Baracos V. , *Lancet Oncol*, **12**, 489-95 (2011).
- 32) Shioda S. , Takenoya F. , Yagi M. , Wang L. , Hori Y. , Kageyama H. , *Nutrition*, **24** (9), 848-853 (2008).
- 33) Kojima M. , Hosoda H. , Date Y. , Nakazato M. , Matsuo H. , Kanagawa K. , *Nature*, **402**, 656-660 (1999).
- 34) Granada M. , Priego T. , Martín AI. , Villanúa MÁ. , López-Calderón A. , *Am J physiol Endocrinol Metab*, **288**, 486-492 (2005).
- 35) Kishimoto I. , Tokudome T. , Hosoda H. , Miyazato M. , Kanagawa K. , *J Cardiol*, **59**, 8-13 (2012).
- 36) Katakami N. , Uchino J. , Yokoyama T. , Naito T. , Kondo M. , Yamada K. , Kitajima H. , Yoshimori K. , Sato K. , Saito H. , Aoe K. , Tsuji T. , Takiguchi Y. , Takayama K. , Komura N. , Takiguchi T. , Eguchi K. , *Cancer*, **124** (3), 606-616 (2018).
- 37) 日刊薬業 <https://nk.jiho.jp/article/144570> (参照 2019-11-27)
- 38) 日刊薬業 <https://nk.jiho.jp/article/146070> (参照 2019-11-27)
- 39) Madeddu C. , Mantovani G. , Gramignano G. , Macciò A. , *Expert Opin Pharmacother*, **16** (14), 2163-2177 (2015).
- 40) Terawaki K. , Kashiwase Y. , Sawada Y. , Hashimoto H. , Yoshimura M. , Ohbuchi K. , Sudo Y. , Suzuki M. , Miyano K. , Shiraishi S. , Higami Y. , Yanagihara K. , Hattori T. , Kase Y. , Ueta Y. , Uezono Y. , *PLoS ONE*, **12** (3), 1-25 (2017).

- 41) Fujitsuka N. , Asakawa A. , Morinaga A. , Amitani MS. , Amitani H. , Katsuura G. , Sawada Y. , Sudo Y. , Uezono Y. , Mochiki E. , Sakata I. , Sakai T. , Hanazaki K. , Yada T. , Yakabi K. , Sakuma E. , Ueki T. , Niijima A. , Nakagawa K. , Okubo N. , Takeda H. , Asaka M. , Inui A. , *Mol Psychiatry*, **21**, 1613-1623 (2016).
- 42) Takeda H. , Sadakane C. , Hattori T. , Katsurada T. , Ohkawara T. , Nakagai K. , Asaka M. , *Gastroenterol*, **134**, 2004-2013 (2008).
- 43) Yakabi K. , Kurosawa S. , Tamai M. , Yuzurihara M. , Nahata M. , Ohno S. , Ro S. , Kato S. , Aoyama T. , Sakurada T. , Takabayashi H. , Hattori T. , *Regulatory Peptides*, **161**, 97-105 (2010).
- 44) Sadakane C. , Muto S. , Nakagawa K. , Ohnishi S. , Saegusa Y. , Nahata M. , Hattori T. , Asaka M. , Takeda H. , *Biochem Biophys Res*, **412**, 506-511 (2011).
- 45) Yae S. , Takahashi F. , Yae T. , Yamaguchi T. , Tsukada R. , Koike K. Minakata K. , Murakami A. , Nurwidya F. , Kato M. , Tamada M. , Yoshikawa M. , Kobayashi H. , Seyama K. , Takahashi K. , *Evid Based Complement Alternat Med*, **2012**, 1-10 (2012).
- 46) Jeong JS. , Ryu BH. , Kim JS. , Park JW. , Choi WC. , Yoon SW. , *Integr Cancer Ther*, **9** (4), (2010).
- 47) 医療用漢方製剤 2018 —148 処方への添付文書情報—, 日本漢方生薬製剤協会, 医療用漢方製剤委員会, 有用性研究部会, ver. 2. 1 (2019).
- 48) 第十七改正日本薬局方, じほう, 1742 (2016).
- 49) 高木修造, 山本正枝, 増田京子, 窪田真理子, 薬誌, **96** (10), 1217-1222 (1976).
- 50) Endo S. , Matsuoka T. , Nishiyama T. , Arai Y. , Kashiwagi H. , Abe N. , Oyama M. , Matsunaga T. , Ikari A. , *Nutr Res*, 1-13 (2019).
- 51) 中川歩美, 奥尚枝, 八木照世, 松永久美, 萩中淳, 石黒京子, 日本薬学会第 129 年会

要旨集, 2, 212 (2009).

- 52) Yang JH. , Kondratyuk TP. , Marler LE. , Qiu X. , Choi Y. , Cao H. , Yu R. , Sturdy M. , Pegan S. , Liu Y. , Wang LQ. , Mesecer AD. , Breeman RB, Pezzuto JM. , Fong HHS. , Chen YG. , Zhang HJ. , *Phytochemistry*, **71**, 641-647 (2010).
- 53) Shirosaki M. , Goto Y. , Hirooka S. , Masuda H. , Koyama T. , Yazawa K. , *Biol Pharm Bull*, **35**(8), 1264-1268 (2012).
- 54) Guo D, Xu L, Cao X, Guo Y, Ye Y, Chan CO, Mok DKW, *J Ethnopharmacol*, **138** (2011), 717-722 (2011).
- 55) 大野みずき, 工藤美和, 串橋研吾, 八巻英彦, 飯沼和三, *J Soc Cosmet Chem Jpn*, **27** (2), 159-165 (1993).
- 56) 早川裕司, 太田昌孝, 川嶋善仁, 木曾昭典, 伊藤洋子, 公開番号 2008-285423, (公開日 2008. 11.27)
- 57) Kawakami S. , Matsunami K. , Otsuka H. , Kawahata M. , Yamaguchi K. , *J Nat Med*, **63**, 46-51 (2009).
- 58) 北村四郎, 村田源, 原色日本植物図鑑 (木本篇 2), 保育社, 40-43 (1979).
- 59) Zhu ZM. , Gao XF. , Danezan MF. , *Mol Phylogenetics Evol*, **87**, 50-64 (2015).
- 60) Danezan MF. , Joly S. , Bruneau A. , Gao XF. , Zhang LB. , *Annal of Botany*, **115**, 275-291 (2015).
- 61) Jeon JH. , Kim SC. , *genes*, **10** (23), 1-14 (2019).
- 62) Seto T. , Yasuda I. , Akiyama K. , *Chem Pharm Bull*, **40** (8), 2080-2082 (1992).
- 63) 第十三改正日本薬局方, 厚生省, 1101 (1996).
- 64) 御影雅幸, 小松かつ子, 難波恒雄, 生薬学雑誌, **42** (4), 284-290 (1988).
- 65) 第十四改正日本薬局方, じほう, 816 (2001).

- 66) 第十四改正日本薬局方解説書（生薬等），廣川書店，97-99 (2001).
- 67) 中薬大辞典，上海科学技术出版社，小学館，82 (1985).