

# 漢方生薬蒼朮の抗炎症作用に関する研究

渥美 聡孝

平成 28 年 1 月

# 博 士 論 文

## 漢方生薬蒼朮の抗炎症作用に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科  
創薬科学専攻  
分子生薬学研究室

学 籍 番 号	1329012001
氏 名	渥美 聡孝
主任指導教官名	佐々木 陽平

## 目次

序論	1
本論	
第一章 NO 産生抑制作用を指標とした各種生薬のスクリーニング	
第一節 緒言	4
第二節 実験方法	4
第三節 結果と考察	7
第二章 蒼朮 70%メタノールエキスが iNOS および前炎症性サイトカイン類に与える影響	
第一節 緒言	10
第二節 実験方法	10
第三節 結果と考察	13
第三章 蒼朮成分の分画および活性化合物の決定	
第一節 緒言	18
第二節 実験方法	18
第三節 結果と考察	18
第四章 総括	27
引用文献	29
謝辞	35

## 序論

慢性関節リウマチ（RA）を代表とする炎症性疾患の患者数は、高齢化に伴い増加している<sup>1,2)</sup>。炎症には活性化免疫細胞が関与する複雑なプロセスが関わっており<sup>3)</sup>、その中でもマクロファージは炎症性サイトカイン・ケモカインおよび他のメディエーターを放出することによって Th1 細胞の活性化や炎症組織への単球の遊走を誘導するなど炎症反応の調節に重要な役割を果たしている<sup>4)</sup>（図1）。活性化されたマクロファージは、誘導型一酸化窒素合成酵素（inducible nitric oxide synthase：iNOS）・シクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase：COX）-2等の炎症性酵素やインターロイキン（interleukin：IL）-1 $\beta$ ・IL-6および腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor：TNF）- $\alpha$ など前炎症性サイトカインを分泌し、細菌やウイルスに対する貪食などの生体防御反応を行っている<sup>5-8)</sup>。一方でマクロファージの活性化が持続し、炎症性酵素や前炎症性サイトカインの分泌が過剰になることがRAの原因になると考えられている<sup>9,10)</sup>。

RAは多発する関節炎と進行性の関節破壊を主症状とする<sup>11)</sup>。RAに用いる医薬品としては、主として抗リウマチ薬の金製剤・D-ペニシラミン・メトトレキサートが、他にはステロイド薬のプレドニゾロン、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）のロキソプロフェンやインドメタシン、抗体医薬品等の生物学的製剤が挙げられる。金製剤やD-ペニシラミンは、歴史が古い薬であり確定的な作用機序については報告がないとされるが、マクロファージなどの免疫反応に対する影響が言われている<sup>12,13)</sup>。メトトレキサートは炎症部位への好中球の遊走を抑制するほか、マクロファージからのIL-1産生抑制作用があることが分かっている<sup>14)</sup>。ステロイド薬はマクロファージなどの免疫細胞内の核内受容体に作用して、AP-1やNF- $\kappa$ Bといった転写因子を抑制することで炎症性酵素や前炎症性サイトカインの産生を抑制し、RAの症状を寛解する<sup>15)</sup>。NSAIDsはCOXの働きを阻害し、RAにおける慢性の関節炎に伴う疼痛・腫脹に対して鎮痛効果をもたらす<sup>11)</sup>。これらの他、近年では生物学的製剤が登場し、RAの原因と考えられているIL-1 $\beta$ ・IL-6・TNF- $\alpha$ を直接阻害することで高い効果を挙げている。IL-1は1981年にリウマチ滑膜細胞のコラゲナーゼとプロスタグランジン産生を刺激する物質であることが発見され、IL-1がRAに関連する炎症応答に関与している滑膜細胞とリンパ球の活性化に関与している可能性が示唆された<sup>16)</sup>。現在ではIL-1 $\beta$ が特にRAにおいて破骨細胞様細胞を増強することによって骨破壊を引き起こすことが明らかとなり<sup>17)</sup>、IL-1受容体アンタゴニストであるアナキンラは欧米では医薬品としての承認を受けRA患者に使用されている。IL-6は1982年にB細胞分化因子（BCDF）として発表され<sup>18)</sup>、RA患者の関節液中にはIL-6が増加していることからIL-6とRA発症の関連性が考えられた<sup>19)</sup>。現在ではIL-6のシグナル異常によってRA等の自己免疫疾患が発症することが

明らかとなり<sup>20)</sup>、抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブが医薬品として日本国内での承認を受けている。TNF- $\alpha$  は主に活性化したマクロファージから産生され、固形がんに対して出血性の壊死を生じさせるサイトカインとして発見された<sup>21)</sup>。TNF- $\alpha$  は細胞接着分子の発現やアポトーシスの誘導、IL-1・IL-6 などの炎症性メディエーターの産生を亢進させることにより、感染防御<sup>22, 23)</sup>や抗腫瘍作用<sup>24)</sup>に関与する一方で、過剰な発現は RA などの疾患を発症させる。また、IL-6 と TNF- $\alpha$  の共刺激によって、破骨細胞が誘導されることも近年報告されている<sup>25)</sup>。TNF- $\alpha$  に対しては、インフリキシマブ（キメラ型抗 TNF- $\alpha$  抗体）・アダリムマブ（ヒト型抗 TNF- $\alpha$  抗体）・エタネルセプト（TNF 受容体-Fc 融合蛋白）が医薬品として日本国内での承認を受けて使用されている。また、最近では RA 患者において NO が T 細胞の機能不全に寄与すること<sup>26)</sup>や軟骨細胞でのアポトーシスに関与すること<sup>27)</sup>、破骨細胞による骨吸収の活性化<sup>28)</sup>が示唆されており、治療上の新しい視点となり得る。現在の RA 治療薬における作用点である COX-2・IL-1 $\beta$ ・IL-6・TNF- $\alpha$  や治療上の新たな標的である NO といった、炎症性酵素や前炎症性サイトカインをコントロールすることが RA の治療上有用であることが伺える。

しかしながら、従来使用されてきた医薬品は以下のような副作用が問題となっている。抗リウマチ薬は比較的即効性で効果も良いが、まれに致命的な副作用が起こることが報告されている<sup>29)</sup>。また NSAIDs は胃腸障害、ステロイド薬は消化性潰瘍や骨粗鬆症が治療上の大きな問題となり、長期の薬物投与ができないという難点がある<sup>11)</sup>。近年発展してきた抗体医薬品は高い治療効果がある一方、他の医薬品に比べて非常に高価で、患者の経済的負担が大きい。さらに抗体医薬品の投与経路は注射剤などに限定されるため、入院患者にしか適用出来ないことも問題点として挙げられている。

近年、RA に対して越婢加朮湯と柴胡剤の併用が有効であるとの報告<sup>30)</sup>や変形性膝関節症の疼痛歩行能障害や腫脹に対して越婢加朮湯や防己黄耆湯が有意な改善を示すこと<sup>31, 32)</sup>等が報告され、漢方薬が RA をはじめとする炎症性疾患に効果があることが示されている。漢方薬は西洋薬に対する代替療法として比較的薬価が安く経済的負担が小さいこと、経口投与で用いられることから上記の抗体医薬品を適応しにくい患者が利用出来る重要な代替医薬品である。

そこで本研究では、RA に対する効果が報告されている上記の漢方薬<sup>30・32)</sup>に使用され、中薬大辞典<sup>33)</sup>および教科書等の資料<sup>34)</sup>に炎症性疾患に用いられると記載のある生薬 19 種について、NO 産生の抑制効果を指標に抗炎症効果を検討した。また、その中でも特に NO 産生抑制効果が高かった蒼朮について前炎症性サイトカインの mRNA 発現抑制作用の検討とその活性化化合物の解明を試みた。

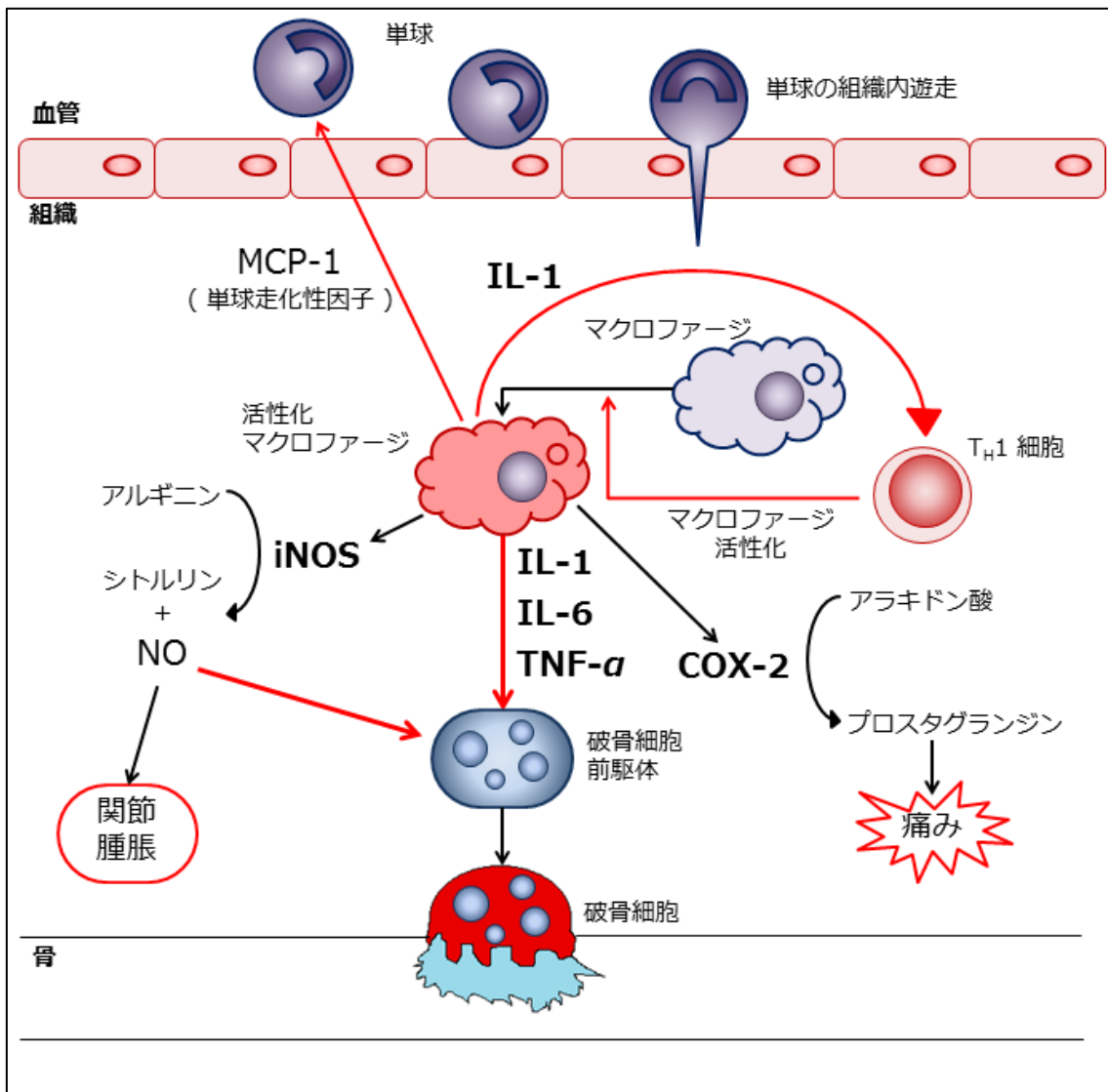


図1 マクロファージの活性化と RA (骨破壊) との関係  
Adamopoulos らの報告<sup>35)</sup>を基に改変した

## 第一章 NO 産生抑制作用を指標とした各種生薬のスクリーニング

### 第一節 緒言

NO は生体内において 3 種類の NOS によって合成され、NOS の種類によって合成された NO の機能が異なる。すなわち神経型 NOS ( neuronal NOS ) は神経組織に主として発現して細胞間の情報伝達の機能に関与し、内皮型 NOS ( endothelial NOS ) は血管内皮細胞で発現して血管拡張作用を示す。iNOS は免疫系の細胞に発現し、病原体に対する生体防御作用を示す。iNOS によって合成される過剰な NO はフリーラジカルとして働き、病原体に対する抵抗性を示す一方で炎症反応を増強するため、iNOS をコントロールすることは患者 QOL を向上するために重要である。特に RA の患者では、患者の血清、尿、および関節液中に NO が多量に存在し、血清サイトカイン量や関節腫脹と相関することが報告されている<sup>36, 37)</sup>。

NO の産生抑制作用について、天然物を用いた検討ではこれまでに *Artemisia* 属植物<sup>38)</sup>や *Cratoxylum* 属植物<sup>39)</sup>の他、数多くの論文が報告されており、いずれの文献もマクロファージ様細胞株である RAW264 を用い、Lipopolysaccharide ( LPS ) 刺激の下、培地中に含有される NO の量を Griess 法で定量している。しかしながら、これまで漢方薬に用いられている生薬について、NO 産生抑制作用を指標とした抗炎症作用をスクリーニングした報告はない。本章では 19 種類の生薬について 70 %メタノールで抽出し、抽出エキスの NO 産生抑制作用を検討した。

### 第二節 実験方法

生薬は株式会社ウチダ和漢薬より入手した。生薬 10.0 g を 300  $\mu\text{m}$  のふるいを通すまでミルサーで粉砕し、100 mL の 70 %メタノールを加えたのち 30 min 超音波を照射して抽出した。抽出液をろ過後、残渣に再び 70 %メタノールを加えて 3 回抽出操作を行い抽出液はまとめて減圧下で濃縮した。熱水抽出エキスは刻み生薬 10.0 g を量り取り、40 min 煮沸抽出した。抽出液は 1000 rpm, 10 min 遠心分離して上清を吸引ろ過し、ろ液を減圧下で凍結乾燥することで水抽出エキスとした。それぞれの生薬抽出エキスは DMSO で溶解し、100 mg/mL の試験溶液を調製した。

24 well plate に  $1.0 \times 10^5$  の RAW264 細胞を播種し、37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 下で一晩プレインキュベートした後、生薬抽出エキスを加えた ( 生薬抽出エキスの最終濃度 : 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DMSO の最終濃度 : 0.1 % )。生薬抽出エキスもしくはポジティブコントロール ( デキサメタゾン, 最終濃度 : 10 mM ) を加えてから 2 時間後に RAW264 の活性化および NO 産生を惹起する目的で、培地に LPS ( 最終濃度 : 10 ng/mL ) を加えた。37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 下でインキュベート後、RAW264

が産生した NO 量を測定するため、等量の培地と Griess 試薬（5%リン酸の1%スルファニルアミド溶液と 0.1% *n*-1-ナフチルエチレンジアミンニ塩酸塩）を混合し、540 nm の吸光度を測定した。吸光度の値は亜硝酸ナトリウムの標準液で作成した検量線を用い、培地中に産生された NO 量として定量した。

統計学的な有意差検定には、SPSS for Windows (SPSS Inc)を用い、群間の差を one-way ANOVA によって解析した。



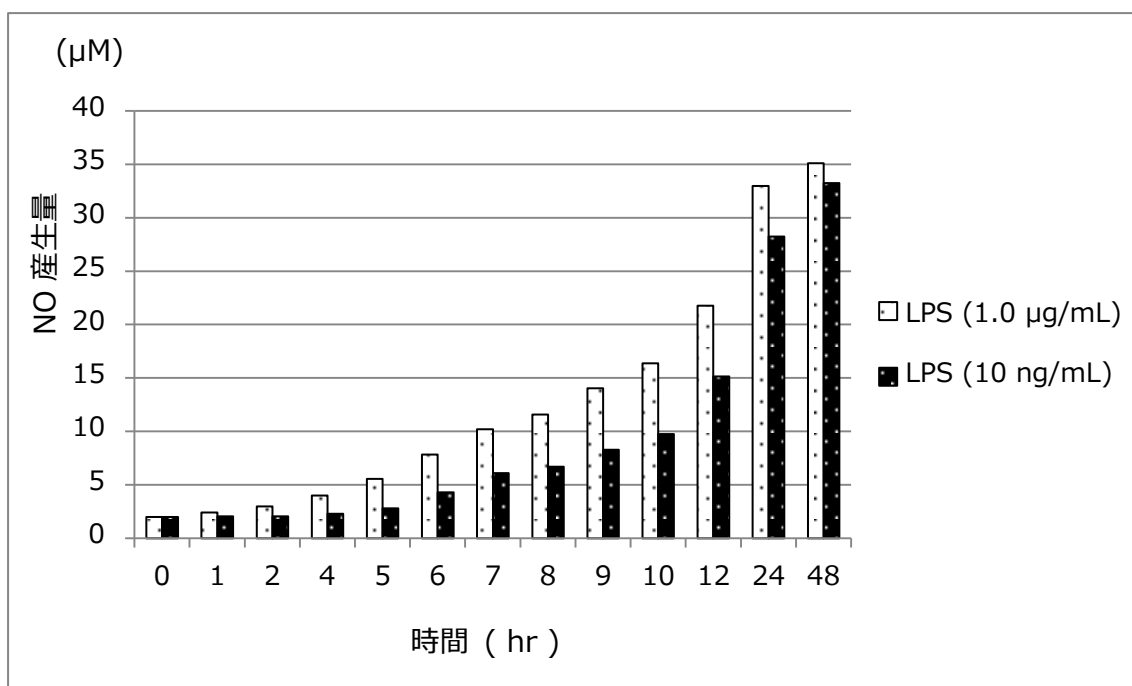


図2 LPS 刺激（1.0 μg/mL および 10 ng/mL）後の NO 産生量の時間変化

表1 RAW264 を LPS 刺激（10 ng/mL）後の NO 産生に対する各種生薬エキスの効果

a : 70 %メタノールエキス（最終濃度 100 μg/mL）

デキサメタゾン（10 mM）をポジティブコントロールとする

b : 使用した生薬のロット番号

c : 3 回の試験における平均抑制率

生薬名 (a)	Lot. No (b)	NO産生抑制率 (c)	生薬名 (a)	Lot. No (b)	NO産生抑制率 (c)
ソウジュツ	8021145	91.8%	トウキ	YA242421	18.0%
ビャクジュツ	252225	67.6%	シャクヤク	YA252316	17.6%
サイシン	242910	61.3%	ゲンチアナ	252128	15.8%
ケイヒ	252216	59.6%	チモ	8951155	15.3%
ハッカ	242817	56.9%	カクコン	252112	13.4%
ハンゲ	252228	56.1%	バクモンドウ	8BJ1251	12.9%
オウゴン	YS192122	53.1%	ジオウ	252126	4.9%
サンズコン	242122	33.1%	サイコ	NP243122	0.3%
カンゾウ	252124	29.6%	オンジ	243119	-4.0%
マオウ	243216	23.3%	dexamethason (10 mM)		58.0%

### 第三節 結果と考察

RAW264 の NO 産生量は LPS 刺激後 24 時間から 48 時間でプラトーに達することが事前検討によって明らかとなった（図 2）。Ryu ら<sup>38)</sup>、Boonnak ら<sup>39)</sup>の論文でも、RAW264 による NO 産生試験は 24 時間で行っている。そこで本試験では LPS 刺激後の設定時間を 24 時間とした。

生薬 70 %メタノール抽出エキス 19 種の内、7 種の生薬エキスが 50 %以上の NO 産生抑制作用を示し（表 1）、蒼朮（*Atractylodis Lanceae Rhizoma* : AL）の抽出エキス（AL70M）が最も高い抑制作用（91.8%）を示した。また、蒼朮と原植物が同属（*Atractylodes* 属）である白朮（*Atractylodis Rhizoma* : AR）のエキス（AR70M）にも NO 産生抑制作用（67.6%）が確認され、蒼朮・白朮のエキスにおける抑制作用は濃度依存的であることが明らかとなった（図 3A）。*Atractylodes* 属植物における抗炎症作用に関する報告としては、*Atractylodes japonica* の根茎を基源とする白朮の熱水抽出エキス（1.0 mg/mL）に RAW264 における LPS 刺激後の iNOS と COX-2 の産生を抑制する作用があることが報告されている<sup>40)</sup>。また、*A. macrocephala* の根茎を基源とする白朮は LPS 刺激をした腹腔マクロファージからの TNF- $\alpha$  や NO 産生を抑制し、有効成分として atractylenolide I と atractylenolide III が報告されている<sup>41)</sup>。

次に高い NO 産生抑制作用を示した細辛（61.3%）は、デカトリエンアミド類が TNF- $\alpha$  で刺激した HepG2 細胞に対して、PPARs を介した iNOS や COX-2 の発現を抑制するとの報告がある<sup>42)</sup>。また、LPS 刺激をした RAW264 に対し、PPAR $\gamma$  のアンタゴニストを反応させることで TNF- $\alpha$  の産生を抑制したという報告<sup>43)</sup>があること、RAW264 における TNF- $\alpha$  と iNOS はともに LPS 刺激後は転写因子の NF- $\kappa$ B および AP-1 の活性化によって転写・翻訳が増加する<sup>44)</sup>との報告がある。

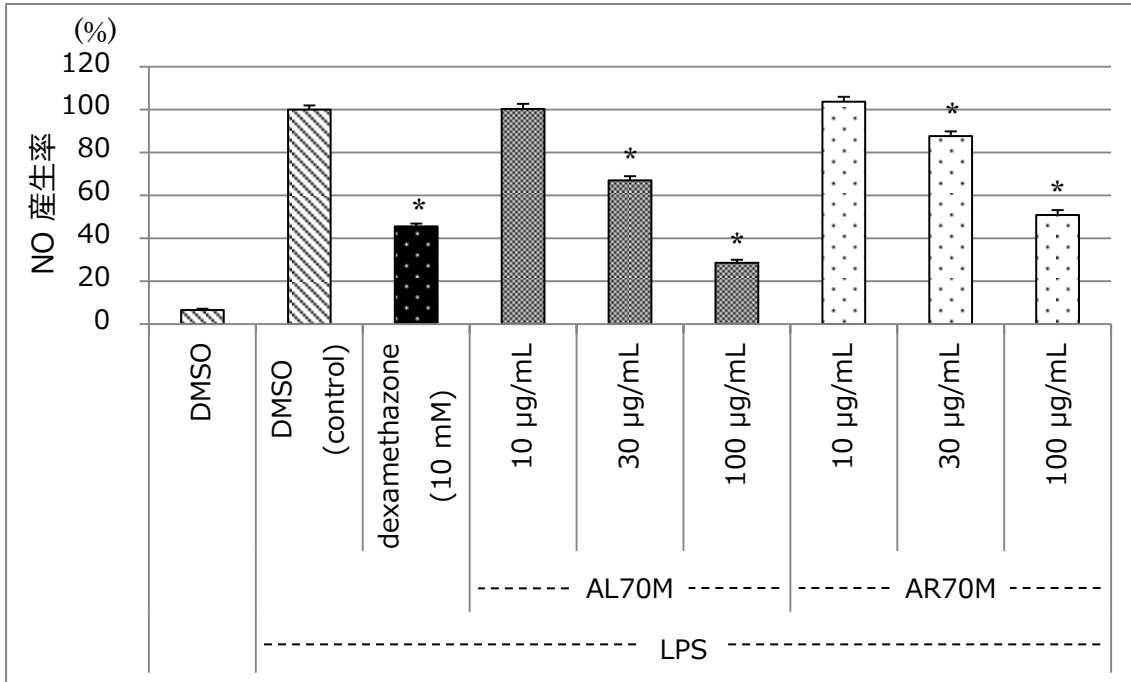
最も NO 産生抑制作用が強かった蒼朮と白朮については、湯液として用いられていることを考え、熱水抽出エキスの NO 産生抑制作用について検討した。その結果、熱水抽出エキス（100  $\mu$ g/mL）では NO 産生抑制作用は示さないことが明らかとなった（図 3B）。このことは前述の白朮における NO 産生抑制作用の主体である atractylenolide I 等の化合物は低極性の化合物であること、水抽出エキスでは糖などの水溶性化合物の混在によって低極性化合物のエキス中の相対的含量が低下したためであると考察した。また、蒼朮においても熱水抽出エキスが効果を示さなかったことから、蒼朮の NO 産生抑制作用についても低極性の化合物によるものと考えられた。

一方で NO 産生抑制作用を示さなかった遠志については、抗炎症作用について tenuifoliside A が LPS 刺激を行った RAW264 からの NO 産生を抑制すると

の報告がある<sup>45)</sup>。NO 産生抑制作用を示さなかった原因として、*tenuifolioside A* は遠志中の含有率が 0.13 % であり<sup>46)</sup>エキス中の濃度が極めて低いためと考えられた。

このように高い NO 産生抑制作用を示した白朮と細辛は、本試験の結果と関連する抗炎症作用についての報告がある一方で、本章の実験で最も高い NO 産生抑制作用を示した蒼朮に関してはラットカラゲニン空気嚢炎症モデルにおいて、『*A. lancea* 由来の蒼朮単独では効果は弱い、麻黄と合わせて煎じた場合、相乗的な抗炎症作用があった』とする報告<sup>47)</sup>があるのみである。蒼朮と白朮は同属植物を原植物とする生薬で、「第 16 改正日本薬局方」では蒼朮の原植物を *A. lancea* De Candolle, *A. chinensis* Koidzumi 又はそれらの雑種とし、白朮は *A. japonica* Koidzumi ex Kitamura 又は *A. macrocephala* Koidzumi で、互いに薬用部位は根茎と規定している<sup>48)</sup>。蒼朮と白朮は「神農本草経」では朮の名で収載され、蒼朮と白朮の区別をはじめにしたのは陶弘景の「神農本草経集注」からとされる（神農本草経集注では蒼朮は赤朮と記載されていた）<sup>49, 50)</sup>が、張元素による『赤は瀉し、白は補う』の考え方から、本草綱要・薬徴・古方薬議では蒼朮の方が湿を取り除く効果が高いと書かれている<sup>50)</sup>。漢方医学では RA 等の関節における炎症性疾患は『湿邪』によって起こると考えられており<sup>30)</sup>、これら炎症性疾患に対して用いられる漢方薬およびそれを構成する生薬には『湿』を取り除く効果が求められる。しかしながら、『湿』を取り除く効果がより高いとされる蒼朮については上記の通り、抗炎症作用を示す科学的報告が少ないことから、第二章および第三章において蒼朮に含まれる抗炎症作用を示す活性化合物の探索および他の炎症性メディエーターに対する影響を検討した。

A



B

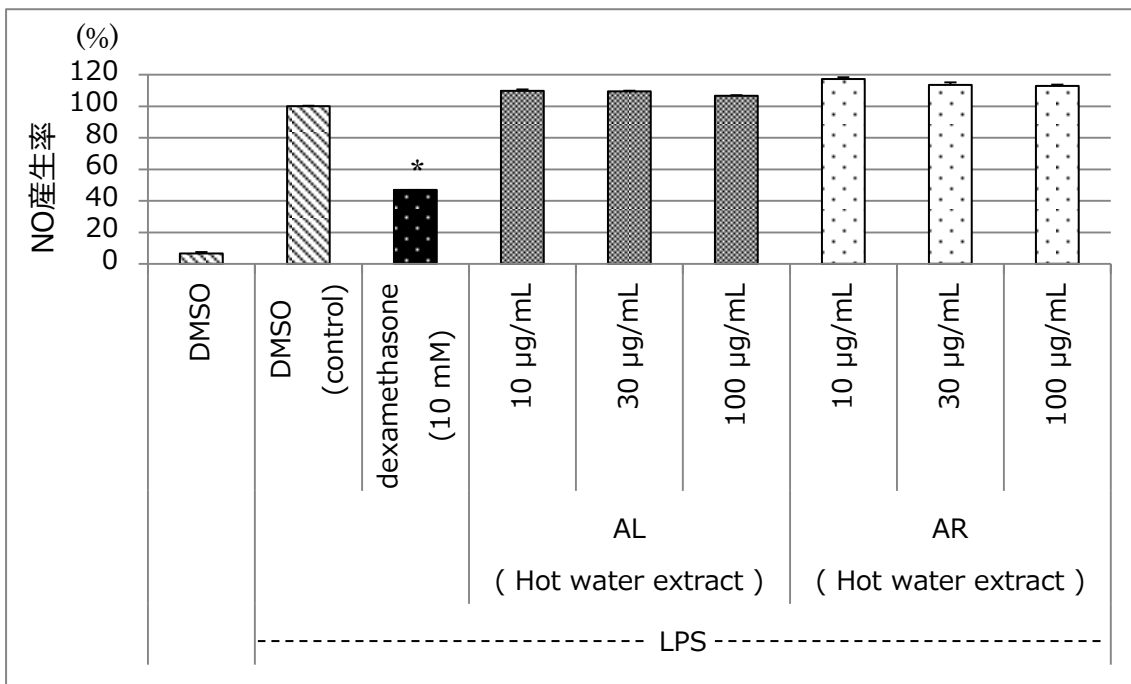


図3 蒼朮および白朮の70%メタノールエキス(A)および熱水抽出エキス(B)によるNO産生抑制作用の検討

LPS刺激(10 ng/mL)し、試料無添加の検体の値を100%とした。グラフの値は3回試験した平均値でエラーバーは標準偏差を示す。\*:コントロールに対して有意( $p < 0.01$ )な低下を示す。ALは蒼朮、ARは白朮を示す。

## 第二章 蒼朮 70%メタノールエキスが iNOS および前炎症性サイトカイン類に与える影響

### 第一節 緒言

マクロファージは細胞表面の Toll Like Receptor (TLR4) で LPS と結合すると、NF- $\kappa$ B や AP-1 が活性化して iNOS mRNA の転写・翻訳を行い、NO を産生する<sup>51, 52)</sup>。このことから、AL70M の NO 産生抑制作用に対し、iNOS が関与している可能性を考え、AL70M が iNOS mRNA 発現量に与える影響について検討した。また、RAW264 は LPS 刺激によって NO 以外にも COX-2・IL-1 $\beta$ ・IL-6・TNF- $\alpha$  といった炎症性メディエーターを産生することが知られている<sup>53)</sup>。

以上のことから本章では、AL70M と、前章で NO 産生抑制作用を示さなかった蒼朮水抽出エキス (ALW) について、iNOS・COX-2・IL-1 $\beta$ ・IL-6・TNF- $\alpha$  を RT-PCR 法を用いて検討した。

### 第二節 実験方法

#### NO 産生量の測定

第一章と同様に行った。

#### 全 RNA 抽出および RT-PCR 法による各種 mRNA の半定量

Han ら<sup>54)</sup>の方法を改変して行った。すなわち RAW264 に対して LPS 刺激後、24 well プレートから培地を取り除き、冷却された PBS を適量ずつ加えて氷上で洗浄した。PBS を取り除き、セパゾール RNA I super (Nacalai Tesque) を 500  $\mu$ L 加え、ピペッティングを行い細胞懸濁液とした。1.5 mL プラスチックチューブに細胞懸濁液を移し変え、クロロホルムを 100  $\mu$ L ずつ加えて激しく攪拌し、12000 $\times$ g, 15 min で遠心分離した。遠心分離終了後に上清約 250  $\mu$ L を、新しい 1.5 mL プラスチックチューブに移し変え、2-プロパノールを上清と等量ずつ加えて 12000 $\times$ g, 15 min で遠心分離した。RNA がプラスチックチューブの底に存在することを確認後、上清を取り除き、75 %エタノールを 1 mL 加えて 12000 $\times$ g, 5 min で遠心分離した。75 %エタノールを取り除いた後、プラスチックチューブのフタを開けたまま 20 min 乾燥させた。DEPC 水\*を 20  $\mu$ L ずつ加えて全 RNA を完全に溶解し、分光光度計にて検体の吸光度を測定して RNA 濃度を算出後、DEPC 水を加えて RNA 濃度を 1.0  $\mu$ g/10  $\mu$ L に調整した。

統計学的な有意差検定には、SPSS for Windows (SPSS Inc)を用い、群間の差を one-way ANOVA によって解析した。

#### \*DPEC 水の作成法

精製水に対して diethylpyrocarbonate (DPEC, 0.01 %) を加え、37°C, 24 時間攪拌しながら反応させた後、オートクレーブ処理して未反応の DPEC を不活化して調製した。

## cDNA 合成

### cDNA reaction mixture (Applied Biosystems Part Number 4374966)

10 × RT buffer	2.0 μL
10 × RT primer	2.0 μL
25 × dNTP ( 100 mM )	0.8 μL
RNase inhibitor	1.0 μL
RT polymerase	1.0 μL
RNA ( 1 μg/10 μL )	10.0 μL
DEPC H <sub>2</sub> O	3.2 μL
<hr/>	
Total	20.0 μL

### Thermal Cycler Program

Heat lid

25 °C 10 min

37 °C 120 min

85 °C 5 min

4 °C —

## PCR

### PCR reaction mixture

10 × PCR buffer for KOD-Plus	2.5 μL
dNTP	2.5 μL
MgSO <sub>4</sub>	1.0 μL
Primer F ( 20 pmol/μL )	0.5 μL
Primer R ( 20 pmol/μL )	0.5 μL
KOD-Plus ( TOYOBO )	0.5 μL
cDNA	1.0 μL
H <sub>2</sub> O	16.5 μL
<hr/>	
Total	25.0 μL

## Program

Heat lid

Hot start 94 °C 2min

Number cycles

94 °C 15 sec

65 °C ( IL-6 · iNOS : 55 °C ) 30 sec

68 °C 30 sec

Final extension 68 °C 5min

Final hold 4 °C

} GAPDH : 21 cycles  
IL-1 $\beta$  : 26 cycles  
IL-6 · iNOS : 28 cycles  
COX-2 · TNF- $\alpha$  : 24 cycles

## Primer

GAPDH Rattus GAPDH 300F

TTCACCACCATGGAGAAGGC

Rattus GAPDH 540R

GGCATGGACTGTGGTCATGA

iNOS iNOS 850F eie

GTTCCAGCATATCTGCAGAC

iNOS 1050R eie

CACAACTGGGTGAACTCCAA

COX-2 Mus COX-2 173F

AACCGTGGGGAATGTATGAGCA

Mus COX-2 609R

AACTCTCTCCGTAGAAGAACCTTTTCCA

IL-1 $\beta$  Mus IL-1 beta 89F

ATGGCAACTGTTTCCTGAACTCAACT

Mus IL-1 beta 545R

ATATTCTGTCCATTGAGGTGGAGAGCT

IL-6 Mus IL-6 583F

TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG

Mus IL-6 982R

CATCTGGCTAGGTAACAGAATATTTATATC

TNF- $\alpha$  TNF alpha 950F  
TACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC  
TNF alpha 2050R  
CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC

### 電気泳動

TAE buffer 50 mL に 0.75 g のアガロース ( 低電気浸透・高ゲル強度 ( Nacalai Tesque ) ) を加えた。電子レンジで加熱し完全に溶解させた後、ethidium bromide ( 10 mg/mL ( Nacalai Tesque ) 1.5  $\mu$ L を加え、1.5 %アガロースゲルを作成した。

PCR 産物を電気泳動し、ethidium bromide による蛍光をゲル撮影装置 ( Densitograph : ATTO ) にてデジタル撮影し、Scion Image ( Scion corporation ) を用いて蛍光強度を数値化した。数値化した発光強度は内部標準遺伝子として増幅した GAPDH の発光強度で割ることにより標準化した。

### \*50 $\times$ TAE buffer の作成法

Tris - hydroxymethyl aminomethane 242 g ( Nacalai Tesque )、酢酸 57.1 mL ( Wako )、0.5M EDTA ( pH = 8.0 ( Wako ) ) 100 mL を混合し、1.0 L にメスアップした。

## 第三節 結果と考察

予備検討として、本研究で用いた RAW264 について LPS 刺激による iNOS $\cdot$  COX-2 $\cdot$  IL-1 $\beta$  $\cdot$  IL-6 $\cdot$  TNF- $\alpha$  の mRNA 転写活性化がされることを確認した。すなわち LPS 刺激を 1.0  $\mu$ g/mL と 10 ng/mL の 2 種類の濃度で振り分けて行ったところ、LPS の 1.0  $\mu$ g/mL と 10 ng/mL の iNOS および各種前炎症性サイトカイン mRNA 発現量に大きな差は無く、LPS 添加 8 時間後に各種 mRNA 発現量が最大になることが明らかとなった ( 図 4 )。このことから LPS 添加濃度は 10 ng/mL、添加後のインキュベーション時間の設定を 8 時間とした。

AL70M と蒼朮の熱水抽出エキス ( ALW ) における iNOS mRNA 発現量への影響を図 5 に示す。AL70M はわずかに LPS 刺激後の iNOS mRNA 発現を抑制した ( 抑制率 7.8 % ) 一方で、ALW は iNOS mRNA 発現量に影響を示さなかった。このことから、AL70M はわずかに iNOS の発現を抑制するが、強力な NO 産生抑制作用は iNOS の発現減少ではなく、むしろ発現した iNOS に対して翻訳阻害 $\cdot$ 分解促進 $\cdot$ アンタゴニストとして作用することで NO 産生を抑制しているものと考えられた。



AL70M は iNOS 以外の前炎症性サイトカイン mRNA 発現に対して抑制的に働く ( COX-2 : 87.8% · IL-1 $\beta$  : 80.6% · IL-6 : 80.8% · TNF- $\alpha$  : 52.7% ) ことが示された ( 図 6 ) 。 RAW264 における LPS 刺激後の細胞内情報伝達については活性化された NF- $\kappa$ B と AP-1 が iNOS · COX-2 · IL-1 $\beta$  · IL-6 · TNF- $\alpha$  の転写活性化を誘導する<sup>51, 52, 55, 56</sup>ことが報告されている。本章で AL70M は iNOS の mRNA 発現に対して抑制率が 7.8%であった一方で、COX-2 · IL-1 $\beta$  · IL-6 · TNF- $\alpha$  の mRNA 発現は強い抑制 ( 各 87.8% · 80.6% · 80.8% · 52.7% ) を示した。共通する転写因子によって誘導される iNOS · COX-2 · IL-1 $\beta$  · IL-6 · TNF- $\alpha$  の中で iNOS のみ抑制率が低かった機構は明らかではない。今後は細胞内情報伝達系に与える影響を深く検討する必要がある。

本章において、AL70M は NO 産生だけでなく、COX-2 · IL-1 $\beta$  · IL-6 · TNF- $\alpha$  までの幅広い前炎症性サイトカインを抑制することが示された。また、NO 産生抑制作用と同様に、熱水抽出エキスは各種 mRNA に対する抑制効果を示さなかったことから、蒼朮における NO 産生抑制作用および前炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制作用を示す活性化合物は低極性の性質をもつと考え、第三章において蒼朮がもつ抗炎症作用の活性化合物の単離を試みた。

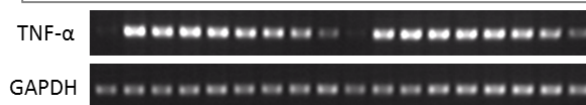
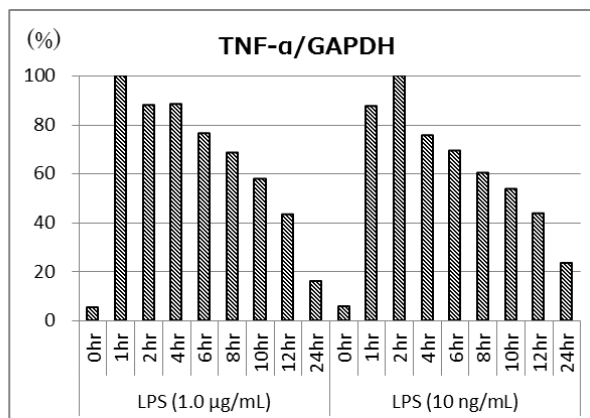
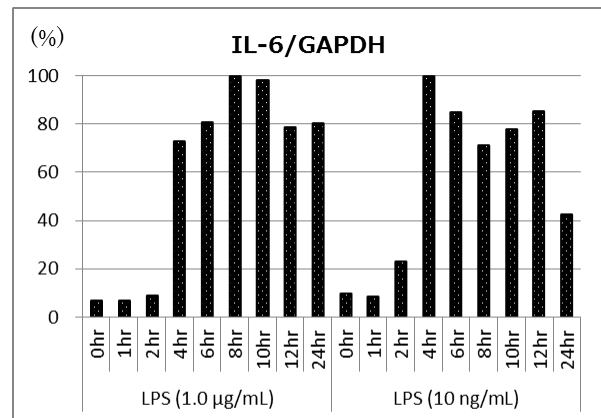
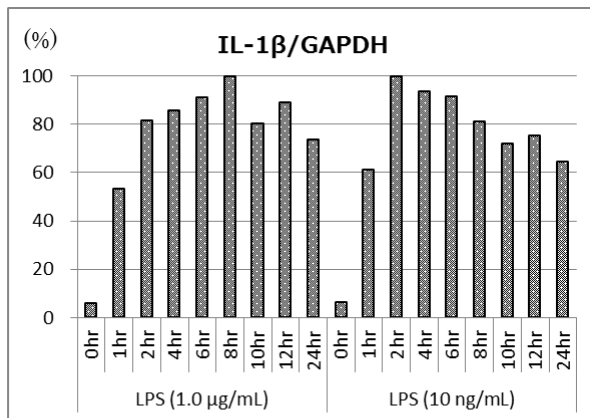
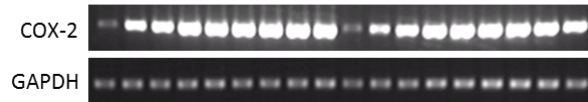
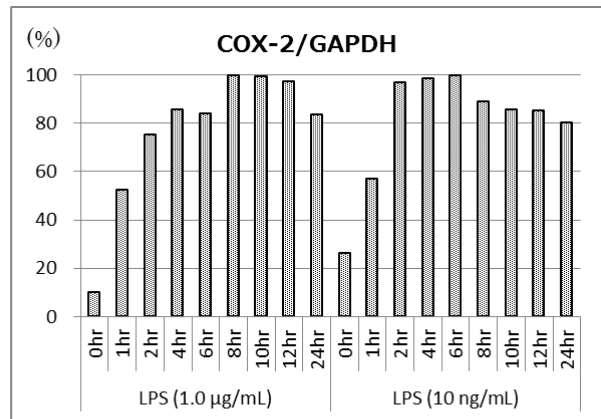
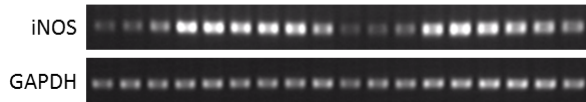
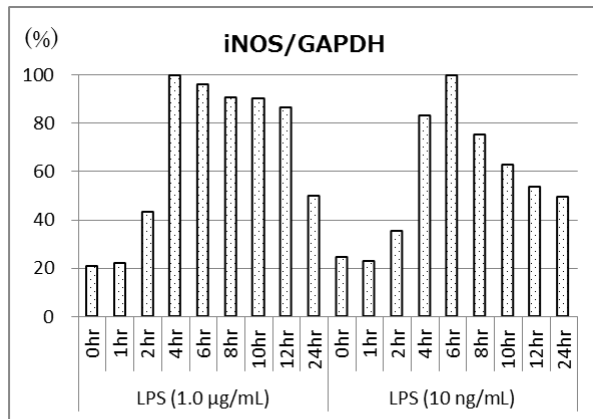


図 4 RAW264 における LPS 刺激 ( 1 µg/mL および 10 ng/mL ) 後の iNOS および前炎症性サイトカイン mRNA 発現量の時間変化  
各 mRNA 発現量の中で最も高い値を 100 % として表示した。縦軸の値は各種 mRNA 発現量の相対値である。

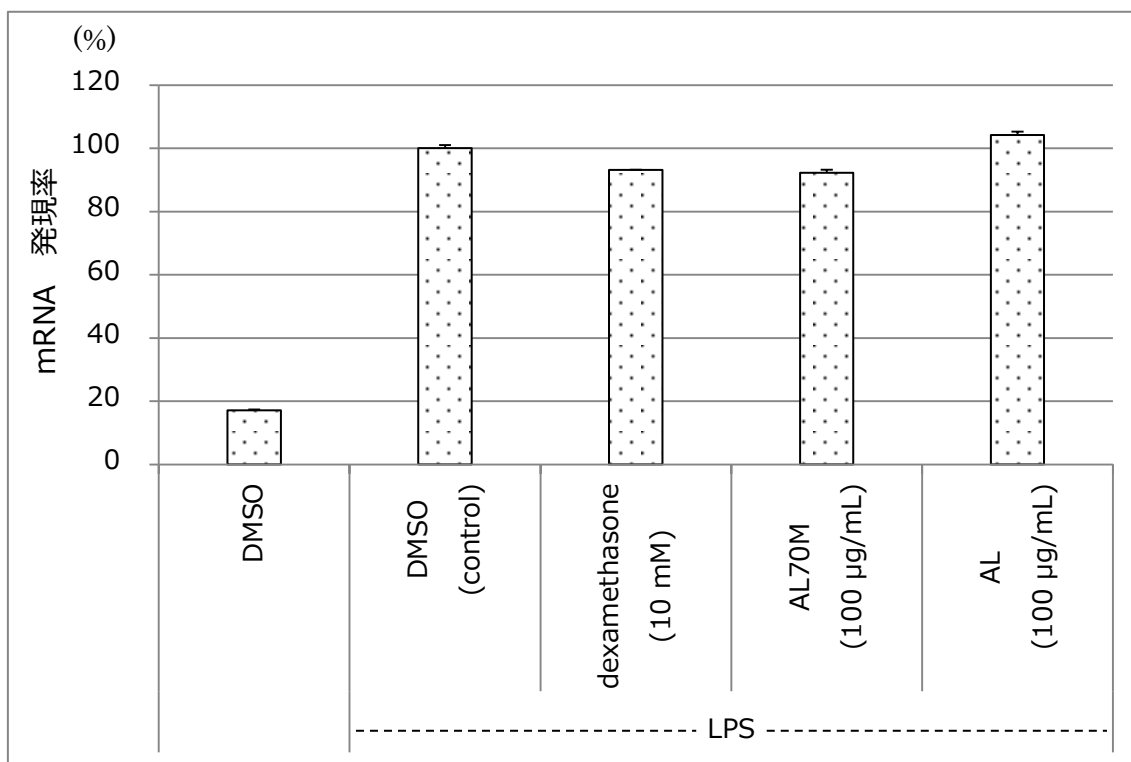


図5 AL70M と ALW における iNOS mRNA 発現量の変化 (%)  
 RAW264 を LPS 刺激したのち試料無添加の検体の値を 100 %とした  
 グラフの値は 3 回試験した平均値でエラーバーは標準偏差

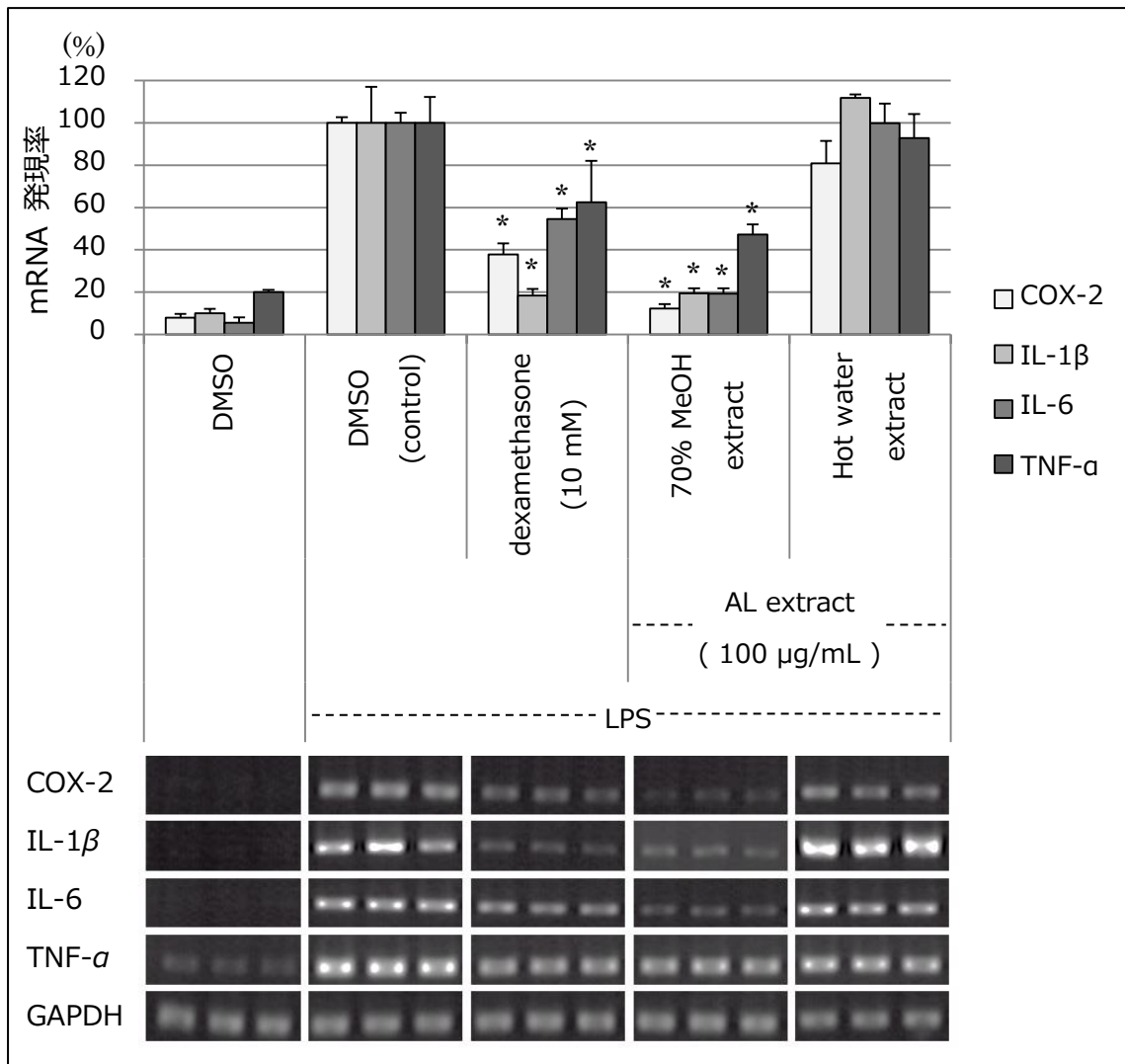


図6 蒼朮の70%メタノールエキス・水エキスによる各種前炎症性サイトカイン mRNA の発現率

グラフの値は3回試験した平均値でエラーバーは標準偏差.

\*: コントロールに対して有意 ( $p < 0.01$ ) な低下を示す

### 第三章 蒼朮成分の分画および活性化合物の決定

#### 第一節 緒言

第二章においてNO産生や各種前炎症性サイトカイン mRNA 発現を抑制する蒼朮の活性化合物は低極性であると考えられた。蒼朮の低極性化合物としてはセスキテルペンの hinesol や  $\beta$ -eudesmol、ポリアセチレンの acetyl-atractylodinol 等が挙げられ、蒼朮はそれらの化合物を含む精油を 3.5~5.6%含有しているとされる<sup>57, 58)</sup>。また、 $\beta$ -eudesmol が主体となって生薬表面に生成する綿状結晶や精油含量は、蒼朮の良品を判断する際の材料となる<sup>59, 60)</sup>。

本章では、蒼朮を 70%メタノールで抽出後、NO産生や各種前炎症性サイトカイン mRNA 発現の抑制活性を指標として各種分配を行うことで活性化合物の決定を行ったので報告する。

#### 第二節 実験方法

蒼朮 15.0g (Lot No. 252129) を粉末とし、スクリーニング時と同様の方法で抽出・乾燥を行った (AL70M, 4.52g)。AL70M は水を加えて懸濁させた後、ヘキサン・クロロホルム・酢酸エチルを用いて液-液分配を行い、それぞれのエキスについて NO 産生および iNOS・COX-2・IL-1 $\beta$ ・IL-6・TNF- $\alpha$  の各 mRNA 発現量の抑制作用について検討した。また、活性の見られたヘキサン層については図 7 のように分離した。10% (w/w) 硝酸銀シリカゲルは硝酸銀水溶液をクロマトグラフィー用シリカゲルと混合した後、攪拌するとともに減圧下にて水を留去して作成した。

#### 第三節 結果と考察

AL70M・ヘキサン層 (AL70M-H) ・クロロホルム層 (AL70M-C) ・酢酸エチル層 (AL70M-A) および水層 (AL70M-W) について NO 産生抑制作用および前炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制作用を検討したところ、活性を示したのは AL70M-H および AL70M-C (各々 NO : 38.8%, 22.0%・COX-2 : 87.9%, 91.0%・IL-1 $\beta$  : 85.0%, 82.4%・IL-6 : 88.6%, 85.7%・TNF- $\alpha$  : 57.9%, 61.4%) であった (図 8)。TLC により、それぞれのエキスに含まれる成分を確認したところ、図 9 のように AL70M-H と AL70M-C には共通して含有される化合物があること、AL70M の TLC スポットの大きさから、その共通化合物は AL70M の主たる構成であると思われた。これらの結果から AL70M の活性化合物が蒼朮の主成分である  $\beta$ -eudesmol と hinesol であると予想し、さらなる分離を試みた。 $\beta$ -eudesmol と hinesol は森田らが 10%硝酸銀シリカゲルを用いた方法で良好な分離が可能であることを示している<sup>61)</sup>。本研究においても両化合物の良好な分離を確認した (図 10) ため、カラムクロマトグラフィー法に 10%硝酸

銀シリカゲルを利用することで AL70M-H より 3 種の化合物を単離した。単離した化合物について NMR スペクトル解析を行い、標準品および文献値<sup>62-64)</sup>とケミカルシフト値を比較したところ、単離した 3 種の化合物をそれぞれ  $\beta$ -eudesmol、hinesol、acetylactylochinol (図 11) と同定した。各化合物の活性を調べたところ、hinesol と acetylactylochinol に NO 産生抑制作用と前炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制作用が確認された (各々 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で NO : 89.2%, 88.8%・COX-2 : 59.4%, 43.7%・IL-1 $\beta$  : 74.0%, 93.0%・IL-6 : 83.5%, 69.5%・TNF- $\alpha$  : 54.5%, 63.4%) 一方で、 $\beta$ -eudesmol にはそれらの抑制作用は見られなかった (図 12)。本章で活性を示した hinesol や acetylactylochinol は同属植物の根茎を基源とする白朮には含有されておらず、蒼朮の特徴的な化合物である。日本と中国では、蒼朮と白朮は互いによく似ている一方で、蒼朮は鎮痛作用と利尿作用、白朮は健胃作用があるなど、その薬効は異なるとされてきた<sup>57, 65)</sup>。本実験で蒼朮における特有の化合物である hinesol と acetylactylochinol が、LPS によって活性化された RAW264 からの NO 産生と COX-2・IL-1 $\beta$ ・IL-6・TNF- $\alpha$  の mRNA 発現を抑制した。しかし本実験で用いた hinesol と acetylactylochinol の濃度は各 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、今回明らかとなった二つの化合物だけでは AL70M の活性強度を説明するのに不十分であると考えられる。今後は蒼朮に含まれるセスキテルペンやポリアセチレンに属する他の化合物についても検討する必要があると思われる。

蒼朮を一般的な漢方薬の剤形である湯液剤として用いることを考えると、低極性化合物である hinesol と acetylactylochinol が湯液中に溶解することが重要である。Hinesol は構造中に水酸基を有する一方で acetylactylochinol は親水基を持たないため、acetylactylochinolの方がより低極性であると言える。これまでに蒼朮が含まれる漢方薬において 3D-HPLC によって acetylactylochinol が検出される報告<sup>66)</sup>があり、hinesol や acetylactylochinol のような低極性化合物であっても漢方薬のような多成分が影響する薬剤中に含有されることが明らかとなっている。これらのことから、蒼朮を含有し、抗炎症作用を期待して用いられる漢方薬においては hinesol と acetylactylochinol がその活性の一端を担っていることが示唆される。さらに、hinesol と acetylactylochinol は蒼朮の精油成分であり、hinesol は  $\beta$ -eudesmol と複合体を形成し、蒼朮の表面に白色の綿状結晶として現れることがある (図 13)。綿状結晶は吉岡らの報告<sup>67)</sup>によると hinesol が 4 割、 $\beta$ -eudesmol が 6 割であるとされているため、蒼朮の表面に析出する結晶の量は、蒼朮に含まれる hinesol 量との間に相関関係があると想定される。

以上のことから、本章では LPS で活性化した RAW264 からの NO 産生および前炎症性サイトカイン mRNA 発現を抑制する蒼朮の化合物として hinesol と

acetyltractylodinol を同定した。また、それらの化合物は古来蒼朮の良品とされてきた『綿状結晶が多く、油分が多く香りが強い』とする蒼朮の性状に対し、科学的根拠となると考えられる。

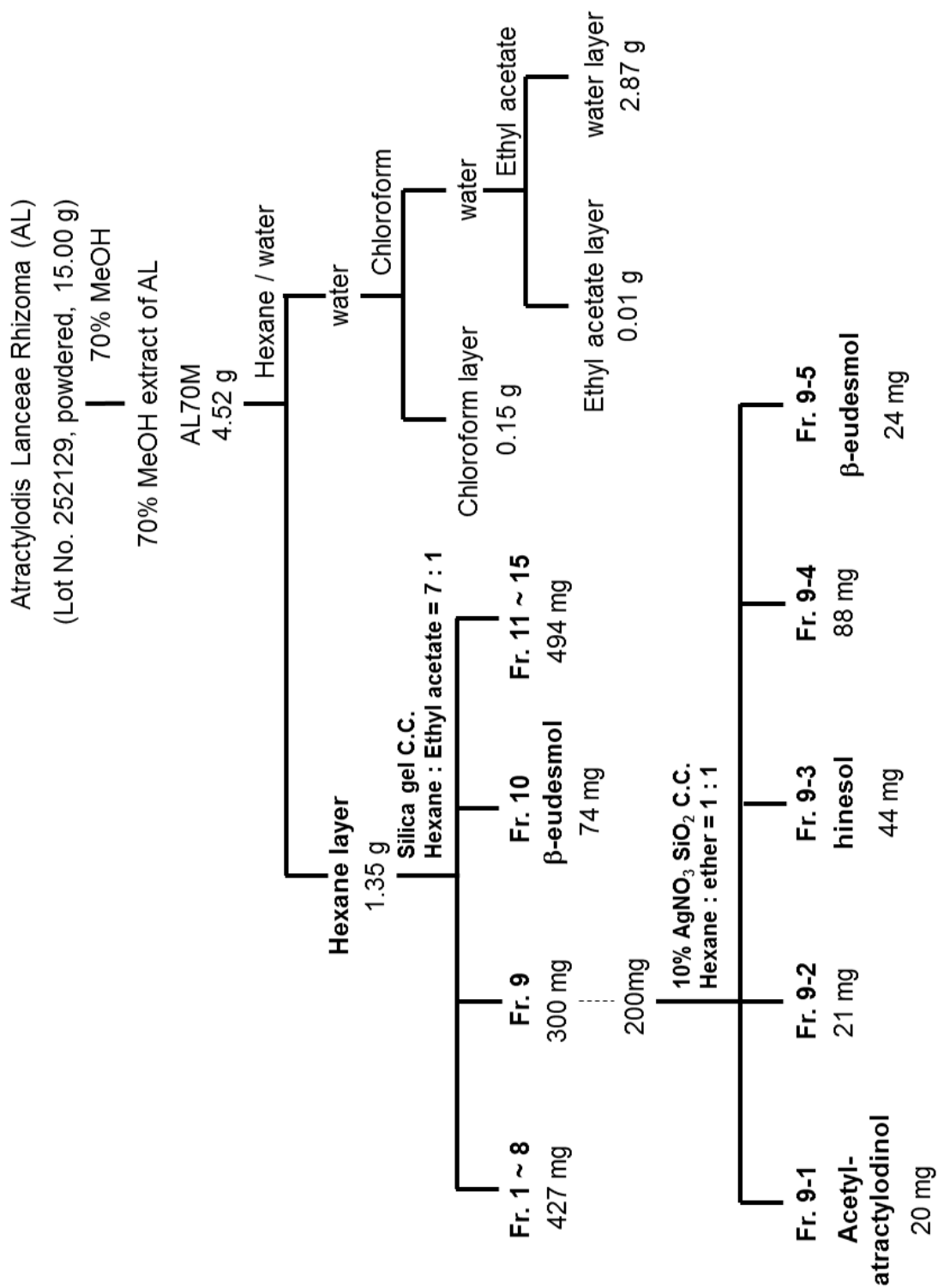


図 7 蒼朮における抗炎症作用を示す活性化合物の分離スキーム



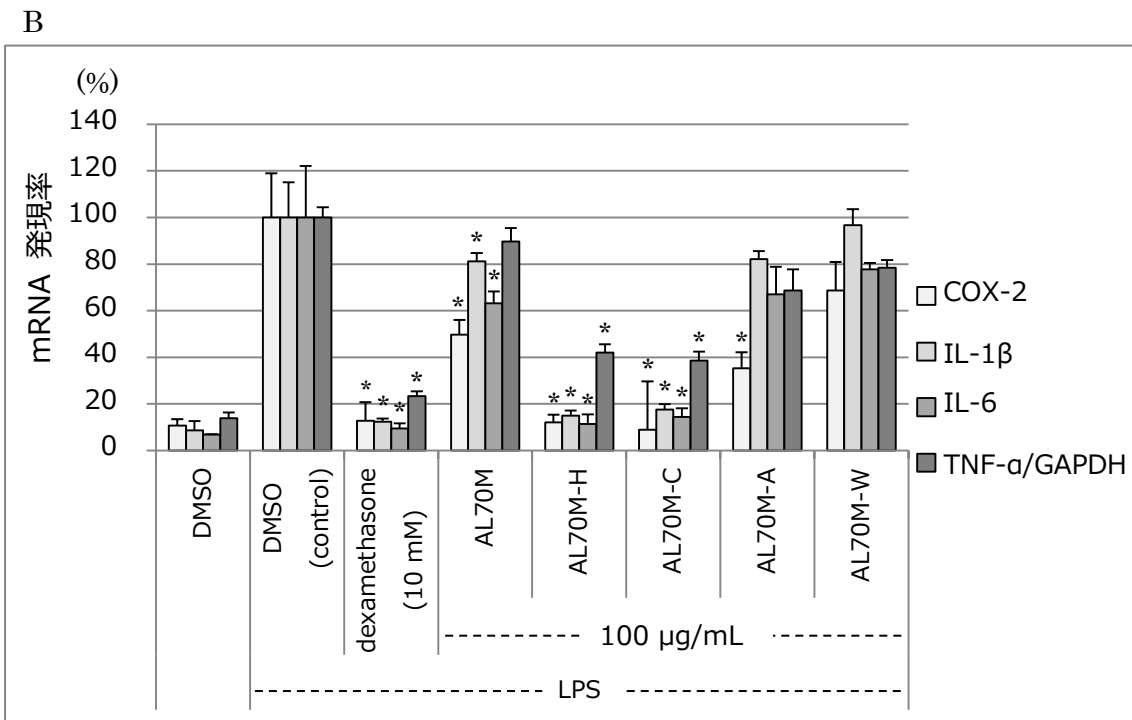
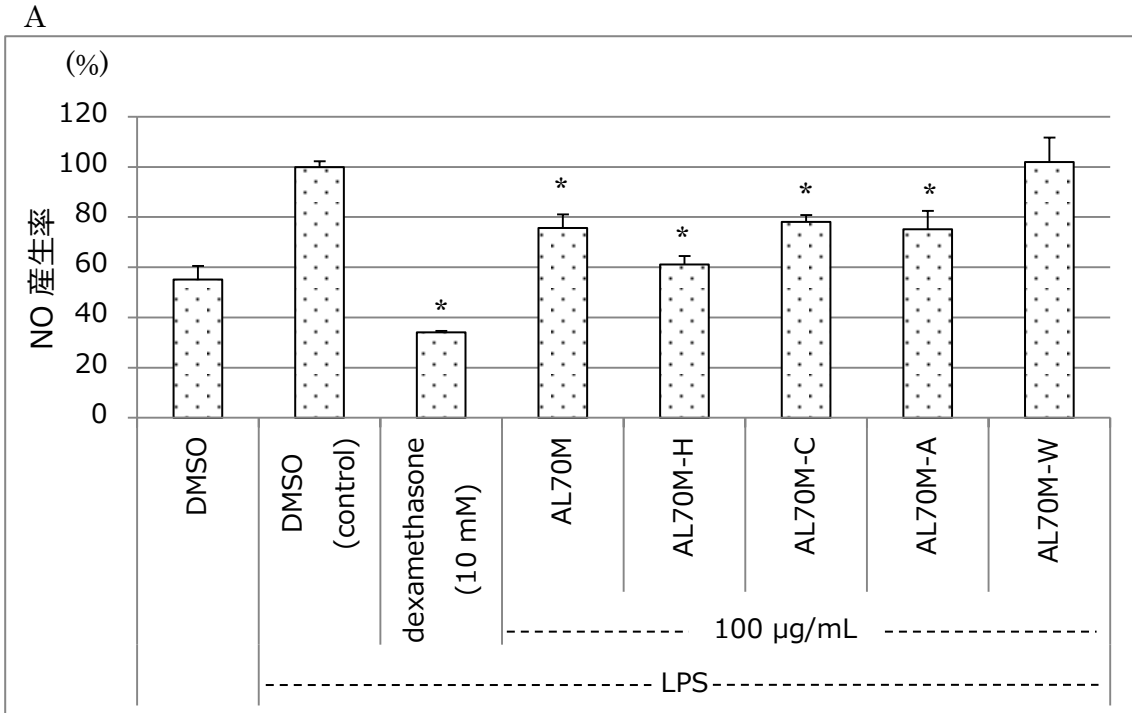


図8 AL70M と分配したエキスによる NO 産生量 (A) および各種 mRNA 発現量 (B) の変化

LPS 刺激し、試料無添加の検体の値を 100 %とした。

グラフの値は 3 回試験した平均値でエラーバーは標準偏差。

\* : コントロールに対して有意 ( $p < 0.01$ ) な低下を示す

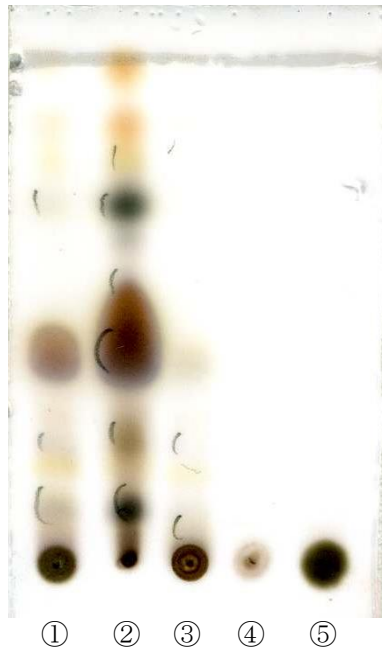


図9 AL70M と分配したエキスの順相 TLC による展開

移動相：ヘキサン / 酢酸エチル混液（7：1）、発色試薬：希硫酸

①AL70M ②AL70M-H ③AL70M-C ④AL70M-A ⑤AL70M-W

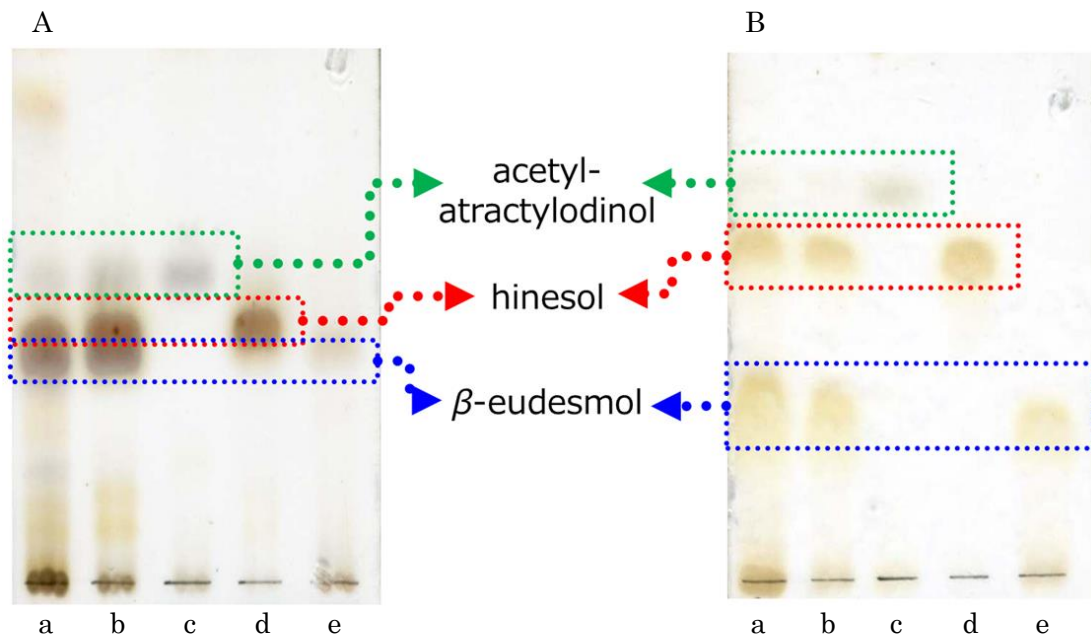
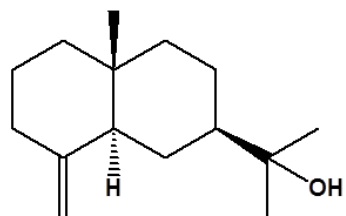


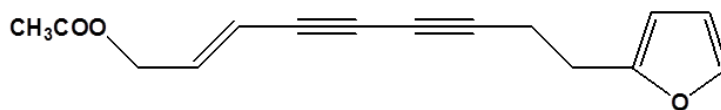
図10 順相 TLC (A) および 10%硝酸銀シリカゲル TLC (B) を用いた時の hinesol と  $\beta$ -eudesmol の分離状況の違い

移動相：ヘキサン / エーテル（1：1）、発色試薬：希硫酸

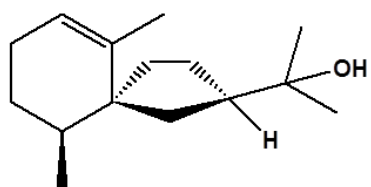
a: AL70M-H b: AL70M c: Fr. 9-1 d: Fr. 9-3 e: Fr. 9-5



$\beta$ -eudesmol



acetyltractylodinol



hinesol

図 11 本研究で単離した化合物の構造

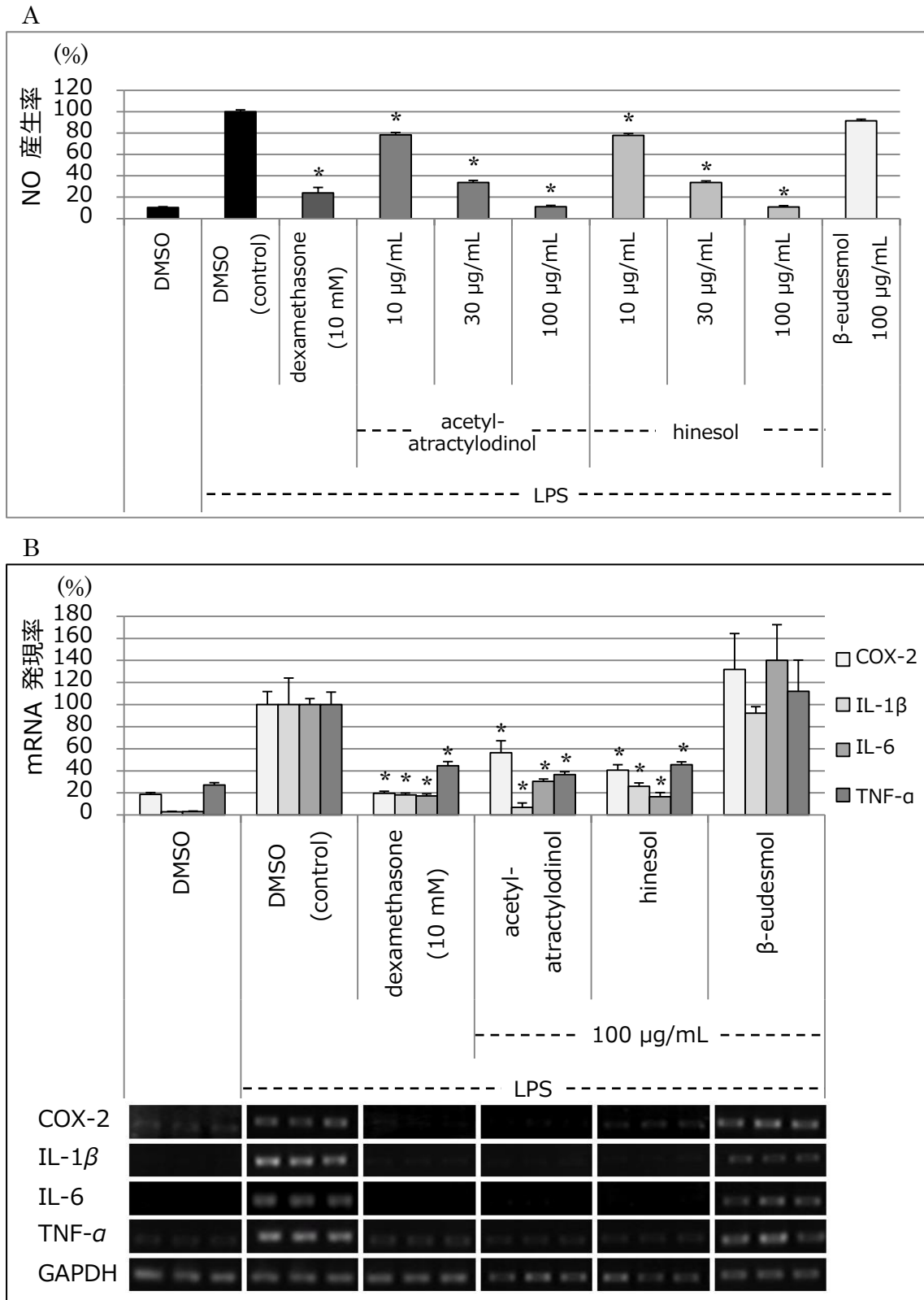


図 12 単離した化合物 (acetyl-atractylodinol・hinesol・β-eudesmol) による NO 産生抑制作用 (A) と mRNA 発現抑制作用 (B)

グラフの値は 3 回試験したものの平均値でエラーバーは標準偏差.

\* : コントロールに対して有意 ( $p < 0.01$ ) な低下を示す.



図 13 蒼朮原植物 (A : *A. lancea*、B : *A. chinensis*) および綿状結晶を呈する蒼朮 (C : 全形生薬、D : 片製)

## 第四章 総括

1. 生薬 19 種の 70 %メタノール抽出エキスについて、NO 産生抑制作用を指標に抗炎症作用のスクリーニングを行った結果、蒼朮・白朮・細辛にそれぞれ 91.8%、67.6%、61.3%の活性を確認した。蒼朮と白朮は同属植物の根茎を基源とする一方で、古くから使い分けがされてきた生薬である。本草書には『蒼朮の方が湿を取り除く効果が高い』など、漢方では「湿邪」が原因とされる関節炎などに対する処方に蒼朮を配剤するよう推奨するような記載が見られるが、これまでに抗炎症作用については白朮の報告が多く、蒼朮については科学的根拠が無かった。本研究において蒼朮の抗炎症作用について新たな知見を得たことは、漢方薬に対する科学的根拠を供する上で重要な意義をもつものと考えられ、漢方薬における蒼朮の配剤意義や白朮との違いについて再考する資料となり得る。
2. AL70M について、iNOS・COX-2・IL-1 $\beta$ ・IL-6・TNF- $\alpha$  の各 mRNA の発現量を指標に蒼朮の抗炎症作用を評価したところ、AL70M は LPS 刺激による各種 mRNA 発現量を抑制（COX-2：87.8%・IL-1 $\beta$ ：80.6%・IL-6：80.8%・TNF- $\alpha$ ：52.7%）することが明らかとなった。一方で、iNOS mRNA の抑制作用は 7.8%であったことから、AL70M による NO 産生抑制作用は iNOS の発現量の減少ではなく、iNOS の翻訳阻害・分解促進・アンタゴニストとして作用するなどの可能性が示唆された。
3. AL70M に含まれる活性化合物を探索するため熱水抽出や AL70M の分離を行い、活性を比較したところ、熱水抽出物には活性が見られず、AL70M を液-液分配した際のヘキサン層やクロロホルム層に NO 産生抑制作用や前炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制作用がみられた。ヘキサン層を各種クロマトグラフィーで分離・精製した結果、acetylactyloidinol および hinesol が活性化合物として単離された。Acetylactyloidinol と hinesol は蒼朮に含まれる重要な精油成分である。また、hinesol は $\beta$ -eudesmol と共に綿状結晶を形成し、その割合は 4：6 であるとされる。これらの化合物は精油および綿状結晶は古来本草書で書かれている『蒼朮はにおいが強く、白色の綿状結晶が析出するものを良品とする』という記載に係るものと考えられ、acetylactyloidinol や hinesol といった精油成分が多い蒼朮を指すものと思われる。このことから、本研究によって経験的に良いとされてきた生薬の性状について、科学的な裏付けに資する結果を得ることができた。

4. 蒼朮を一般的な漢方薬の剤形である湯液剤として用いることを考えると、低極性化合物である **hinesol** と **acetylactyloodinol** が湯液中に溶解することが重要である。漢方薬は多成分系であり、他の生薬に含まれるサポニン等の存在によって低極性化合物でも湯液中に存在するとされ、**3D-HPLC** で湯液中に **acetylactyloodinol** が存在することが報告されている。このことから蒼朮の活性化合物として **hinesol** や **acetylactyloodinol** が漢方薬の薬効成分として作用していることは十分に考えられる。
  
5. 本研究では蒼朮の抗炎症作用について、*in vitro* の実験において **NO** 産生と各種前炎症性サイトカイン **mRNA** 発現量の抑制作用の面から評価した。しかしながら、蒼朮の抗炎症作用を説明するには検討すべき課題が多く残っている。**AL70M** や活性化合物の細胞内での作用メカニズムについては本研究の中で検討していないため、**iNOS** 発現量と **NO** 産生量の関係など本研究だけでは説明できない部分が多い。本研究内で考察した **NF- $\kappa$ B**・**AP-1** などの転写因子やさらにその下流に位置する細胞内シグナルへの影響を検討することで、メカニズムの詳細が明らかになると考えられる。さらに活性化合物についても蒼朮に含まれる特徴的成分であるポリアセチレン系化合物やセスキテルペン系化合物についても検討することで、蒼朮の抗炎症作用についてより詳細に解明できると考えられる。

## 引用文献

- 1) 厚生科学審議会疾病対策部会, リウマチ・アレルギー対策委員会 : リウマチ・アレルギー対策委員会報告書 (2005), <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/10/dl/s1031-6a.pdf>
- 2) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J. Bone Miner. Metab.*, **27**(5), 620-628, (2009).
- 3) Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **91**(6), 2046-2050, (1994).
- 4) Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol.*, **2**, 283-318, (1984).
- 5) Hsu YW, Chi KH, Huang WC, Lin WW. Ceramide inhibits lipopolysaccharide-mediated nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction in macrophages: effects on protein kinases and transcription factors. *J Immunol.*, **166**(9), 5388-5397, (2001).
- 6) Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med.*, **22**(1-2), 269-285, (1997).
- 7) Surh YJ, Kundu JK, Na HK, Lee JS. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *J Nutr.*, **135**(12 Suppl), 2993S-3001S, (2005).
- 8) Palanki MS. Inhibitors of AP-1 and NF-kappa B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Curr Med Chem.*, **9**(2), 219-227, (2002).
- 9) Ling S, Lai A, Borschukova O, Pumpens P, Holoshitz J. Activation of nitric oxide signaling by the rheumatoid arthritis shared epitope. *Arthritis Rheum.*, **54**(11), 3423-3432, (2006).
- 10) Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochem Pharmacol.*, **59**(2), 187-194, (2000).



- 11) 公益財団法人日本リウマチ財団:関節リウマチの治療マニュアル(改訂版),  
診断のマニュアルと EBM に基づく治療ガイドライン(2004), <http://www.rheuma-net.or.jp/rheuma/rm400/library/guideline.html>
- 12) 医薬品インタビューフォーム : シオゾール® (2010), file:///C:/Users/Owner/Downloads/400186\_4420402A1031\_2\_011\_1F.pdf
- 13) 医薬品インタビューフォーム : メタルカプターゼ® (2010), <http://medical.taishotoyama.co.jp/data/if/pdf/mc.pdf>
- 14) 医薬品インタビューフォーム : リウマトレックス® (2015), file:///C:/Users/Owner/Downloads/671450\_3999016M1021\_2\_1F.pdf
- 15) 大島久二, ステロイド剤の新しい考え方—基礎と臨床—, *日本内科学会雑誌*, **89**(2), 374-380, (2000).
- 16) Mizel SB, Dayer JM, Krane SM, Mergenhagen SE. Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **78**(4), 2474-2477, (1981).
- 17) 神宮政男, 橋本通, 諫山哲郎, 腰原康子, 黒木健文, 直野敬, 延永正, 骨芽細胞と破骨細胞における接着分子発現と細胞間相互作用—慢性関節リウマチの骨破壊における関与—, *炎症*, **6**, 467-472, (1993-1994).
- 18) Teranishi T, Hirano T, Arima N, Onoue K. Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor- (TRF) like factor(s). *J Immunol.*, **128**(4), 1903-1908. (1982).
- 19) Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, kishimoto T. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.*, **18**(11), 1797-1801, (1988).
- 20) Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park SJ, Saeki Y, Kitamura Y, Hirano T. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med.*, **196**(7), 979-990, (2002).
- 21) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **72**(9), 3666-3670, (1975).
- 22) Gong JH, Sprenger H, Hinder F, Bender A, Schmidt A, Horch S, Nain M, Gemsa D. Influenza A virus infection of macrophages. Enhanced tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression and lipopoly-

- saccharide-triggered TNF-alpha release. *J Immunol.*, **147**(10), 3507-3513, (1991).
- 23) Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenefelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol.*, **111**(3), 579-582, (1998).
- 24) van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist.*, **11**(4), 397-408, (2006).
- 25) Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Kitaura H, Kayama H, Miyoshi F, Araki Y, Akiyama Y, Takeda K, Mimura T. Combination of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both in vitro and in vivo. *Arthritis Rheumatol.*, **66**(1), 121-129, (2014).
- 26) Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, Perl A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.*, **12**(3), 210, (2010).
- 27) van't Hof RJ, Hocking L, Wright PK, Ralston SH. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology (Oxford)*, **39**(9), 1004-8, (2000).
- 28) Ralston SH, Grabowski PS. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. *Bone*, **19**(1), 29-33, (1996).
- 29) 伊藤善規, 千堂年昭, 大石了三, 薬剤性肺障害, *日薬理誌*, **127**, 425~432, (2006).
- 30) 松田史彦, 新井信, 佐藤弘, 代田文彦, 関直樹, 漢方治療が有効であった回帰性リウマチの3症例, *日本東洋医学雑誌*, **51**(4), 741-749, (2001).
- 31) 杉山誠一, 変形性膝関節症に対する越婢加朮湯の効果, *日本東洋医学雑誌*, **48**(3), 319-325, (1997).
- 32) 下手公一, 山下一也, 萬谷直樹, 小林祥泰, 変形性膝関節症に対する防己黄耆湯と桂枝加苓朮附湯併用治療の試み, *和漢医薬学雑誌*, **19**(4), 148-152, (2002).
- 33) 上海科学技術出版社, 「中薬大辞典」, 小学館, 東京, (1998).
- 34) 指田豊, 山崎和男, 竹谷孝一, 「パートナー生薬学」, 南江堂, 東京, (2007).
- 35) Adamopoulos IE, Mellins ED. Alternative pathways of osteoclastogenesis

- in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.*, **11**(3), 189-194, (2015).
- 36) Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, **23**(2), 230-236, (1996).
- 37) Grabowski PS, England AJ, Dykhuizen R, Copland M, Benjamin N, Reid DM, Ralston SH. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate:creatinine ratio. *Arthritis Rheum.*, **39**(4), 643-647, (1996).
- 38) Ryu JC, Park SM, Hwangbo M, Byun SH, Ku SK, Kim YW, Kim SC, Jee SY, Cho IJ. Methanol Extract of *Artemisia apiacea* Hance Attenuates the Expression of Inflammatory Mediators via NF- $\kappa$ B Inactivation. *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2013**, 494681, (2013).
- 39) Boonnak N, Chantrapromma S, Tewtrakul S, Sudsai T. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophages by isolated xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*. *Arch Pharm Res.*, **37**(10), 1329-1335, (2014).
- 40) Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y, Kim EH. *Atractylodes japonica* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. *Biol Pharm Bull.*, **27**(3), 324-327, (2004).
- 41) Li CQ, He LC, Jin JQ. Atractylenolide I and atractylenolide III inhibit Lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  and NO production in macrophages. *Phytother Res.*, **21**(4), 347-353, (2007).
- 42) Quang TH, Ngan NT, Minh CV, Kiem PV, Tai BH, Thao NP, Song SB, Kim YH. Anti-inflammatory and PPAR transactivational effects of secondary metabolites from the roots of *Asarum sieboldii*. *Bioorg Med Chem Lett.*, **22**(7), 2527-2533, (2012).
- 43) Park JY, Kawada T, Han IS, Kim BS, Goto T, Takahashi N, Fushiki T, Kurata T, Yu R. Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor alpha by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: a PPAR $\gamma$  ligand-like action as a novel mechanism. *FEBS Lett.*, **572**(1-3), 266-270, (2004).
- 44) Jung Y, Byeon SE, Yoo DS, Lee YG, Yu T, Yang Y, Kim JH, Kim E, Jeong D, Rhee MH, Choung ES, Hong S, Cho JY. 8-(Tosylamino)quinoline inhibits macrophage-mediated inflammation by suppressing NF- $\kappa$ B signaling. *Acta Pharmacol Sin.*, **33**(8), 1037-1046, (2012).
- 45) Kim KS, Lee DS, Bae GS, Park SJ, Kang DG, Lee HS, Oh H, Kim YC.

- The inhibition of JNK MAPK and NF- $\kappa$ B signaling by tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* in lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. *Eur J Pharmacol.*, **721**(1-3), 267-276, (2013).
- 46) Ikeya Y, Sugama K, Okada M, Mitsuhashi H. Four new phenolic glycosides from *Polygala tenuifolia*. *Chem Pharm Bull.*, **39**(10), 2600-2605, (1991).
  - 47) 布施信三, 城石平一, 黎昌瓊, 新谷卓弘, 寺澤捷年, ラット慢性増殖性炎症モデルにおける, 単味生薬と二味生薬の薬理効果の変化について, *和漢医薬学会誌*, **7**, 362-363, (1990).
  - 48) 厚生労働省, 「第 16 改正日本薬局方」, p.1537 (2011).
  - 49) 日本薬局方解説書編集委員会編, 「第 16 改正日本薬局方解説書」, 廣川書店, 東京, pp.D-497 - 501 (2011).
  - 50) 鳥居塚和生, 「モノグラフ 生薬の薬効・薬理」, 医歯薬出版株式会社, 東京, pp.225 - 238 (2005).
  - 51) Jacobs AT, Ignarro LJ. Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem.*, **276**(51), 47950-47957, (2001).
  - 52) Lee CJ, Lee SS, Chen SC, Ho FM, Lin WW. Oregonin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS gene transcription and upregulates HO-1 expression in macrophages and microglia. *Br J Pharmacol.*, **146**(3), 378-88, (2005).
  - 53) 小山内優, 菅野秀一, 佐々木崇光, 平塚真弘, 石川正明, RAW 264.7 細胞における LPS で誘導される誘導型 NO 合成酵素の発現に対する Caffeic Acid Undecyl Ester の阻害について, *東北薬科大学研究誌*, **55**, 99-109, (2008).
  - 54) Han JM, Lee WS, Kim JR, Son J, Kwon OH, Lee HJ, Lee JJ, Jeong TS. Effect of 5-O-Methylhirsutanonol on nuclear factor-kappaB-dependent production of NO and expression of iNOS in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. *J Agric Food Chem.*, **56**(1), 92-98, (2008).
  - 55) Murakami A, Shigemori T, Ohigashi H. Zingiberaceous and citrus constituents, 1'-acetoxychavicol acetate, zerumbone, auraptene, and nobiletin, suppress lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 murine macrophages through different modes of action. *J Nutr.*, **135**(12 Suppl), 2987S-2992S, (2005).

- 56) McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **4**, 52, (2013).
- 57) 指田豊, 山崎和男, 竹谷孝一, 「パートナー生薬学」, 南江堂, 東京, pp283-286, (2007).
- 58) 指田豊, 山崎和男, 「Integrated Essentials 生薬学 (改訂第6版)」, 南江堂, 東京, pp280-281, (2002).
- 59) 生薬の解説 : ソウジュツ : [http://www.nikkankyo.org/kampo/guide\\_galenical/11.html](http://www.nikkankyo.org/kampo/guide_galenical/11.html) (日本漢方生薬製剤協会ホームページ, 2015年12月17日閲覧)
- 60) 御影雅幸, 木村正幸, 「伝統医薬学・生薬学 (増補)」, 南江堂, 東京, pp.109-110, (2013).
- 61) Morita M, Mihashi S, Itokawa H, Hara S. Silver nitrate impregnation of preparative silica gel columns for liquid chromatography. *Anal Chem.*, **55**, 412-414, (1983).
- 62) Morita M, Nakanishi H, Morita H, Mihashi S, Itokawa H. Structures and spasmolytic activities of derivatives from sesquiterpenes of *Alpinia speciosa* and *Alpinia japonica*. *Chem Pharm Bull.*, **44**, 1603-1606, (1996).
- 63) Ueda J, Shiotani Y, Kojima T, Kato J, Yokota T, Takahashi N. Identification of hinesol as a chlorophyll-preserving substance. *Plant & Cell Physiol.*, **24**, 873-876, (1983).
- 64) Nishikawa Y, Yasuda I, Watanabe Y, Seto T. Studies on the components of *Atractylodes*. II. New polyacetylenic compounds in the rhizome of *Atractylodes lancea* DE CANDOLLE var. *chinensis* KITAMURA. *YAKUGAKU ZASSHI*, **96**, 1322-1326, (1976).
- 65) The Chinese Pharmacopoeia (Chinese Edition), Chemical Industry Press, Beijing, pp.150-151, (2010).
- 66) Takahashi K, Hou X-L, Takahashi K. Practical application of Kampo formulations: implications for pharmacokinetic herb-drug interaction. *Folia Pharmacol. Jpn.*, **132**, 270-275, (2008).
- 67) Yosioka I, Takahashi S, Hikino H, Sasaki Y. Studies on the constituents of *Atractylodes*. III. Separation of atractylol into eudesmol and hinesol. *Chem. Pharm. Bull.*, **7**, 319-323, (1959).

## 謝辞

本研究は金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 佐々木 陽平 准教授のご教示を受け、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

有益な御助言から投稿論文および博士論文の作成に至るまで終始懇切な御指導と御教示を賜りました、九州保健福祉大学薬学部 垣内 信子 教授、東京農業大学農学部 御影 雅幸 教授に深謝致します。

本研究は昭和大学薬学部 岩下 明穂 学士にご協力頂きました。ここに感謝致します。

日頃より叱咤して下さいました九州保健福祉大学薬学部 大塚 功 准教授および金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 安藤 広和 助教に深く感謝します。

本研究および学位論文の作成に関わった昭和大学薬学部生薬学・植物薬品化学教室、九州保健福祉大学薬学部生薬学講座、金沢大学薬学類・創薬科学類分子生薬学研究室の諸氏に感謝致します。

最後に、元昭和大学 鳥居塚 和生 教授には、漢方薬理の魅力とその課題について、懇切丁寧に御指導を賜りました。この場を借りて、深くお礼申し上げます。