[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (4) 268-272 (1990)]

生薬と組織培養生成物の有効成分に基づいた薬理活性の比較による評価.

紫根の肉芽形成促進作用及び黄連の肉芽形成抑制作用

尾崎幸紘,^{*,a} 菅 忠三,^b 吉岡利紘,^b 森本悌次郎,^b 原田正敏^a
国立衛生試験所生薬部,^{*,a} 三井石油化学工業株式会社生物工学研究所^b

**Evaluation on Equivalence of Pharmacological Properties between Natural
Crude Drugs and Their Cultured Cells Based on Their Components.**

**Accelerative Effect of Lithospermi Radix and Inhibitory Effect
of Coptidis Rhizoma on Proliferation of Granulation Tissue**

Yukihiko OZAKI,^{*,a} Chyuzou SUGA,^b Toshihiro YOSHIOKA,^b
Teijirou MORIMOTO,^b and Masatoshi HARADA^a

*Division of Pharmacognosy and Phytochemistry, National Institute of
Hygienic Sciences,^a 1-18, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku,
Tokyo 158, Japan and Bioscience Research Laboratories,
Mitsui Petrochemical Industries, Ltd.,^b Waki-cho,
Kuga-gun, Yamaguchi 740, Japan*

(Received October 24, 1989)

The present study was carried out to evaluate an equivalence of pharmacological properties between natural crude drugs and their cultured cells. The effects of ether extract of *Lithospermi Radix* and cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC. and aqueous extract of *Coptidis Rhizoma* and cultured cells of *Coptis japonica* MAKINO var. *dissecta* NAKAI on proliferation of granulation tissue in rats were compared. The ether extracts of *Lithospermi Radix* and the cultured cells enhanced proliferation of granulation tissue by the cotton pellet method. The potency of both extract was about the same, if results were compared with the corresponding doses which contained the same quantity of shikonin derivatives. On the other hand, the aqueous extracts of *Coptidis Rhizoma* and the cultured cells inhibited it. The potency of both extract was about the same, if results were compared with the corresponding doses which contained the same quantity of berberine-type alkaloids.

From these results, to evaluate an equivalence of pharmacological properties between natural crude drugs and their cultured cells, it is concluded that their qualities and quantities are not so different each other and the almost same pharmacological effect expected on the basis of their uses is required.

Keywords—*Lithospermi Radix*; *Coptidis Rhizoma*; cultured cell; shikonin derivative; berberine-type alkaloid; proliferation of granulation tissue; cotton pellet method

緒 言

薬用植物を対象としたバイオテクノロジーの研究の進歩には目覚ましいものがある。その一環として、組織培養生成物を医薬資源とする可能性が浮かび上がってきた。組織培養生成物は同一植物をほぼ同様の条件で増殖させて得られるため産地、気象条件などの諸条件が異なる場所で栽培された天然品と比べた場合、含有成分の含量がより均一化していると考えられる。この品質の均一化は医薬品としての重要な要因であり、組織培養生成物を医薬資源として利用することの大きな利点の1つである。このほか、組織培養法では、天然品のように自然環境の影響を受けることがないため、安定した生産が可能になるという特徴もある。

生薬の薬理活性は含有成分の種類とそれらがもつ作用の強さの総和に依存する。もし、これらの中の特定成分(又は成分群)がそれ程微量でなく、薬理活性が比較的顕著であれば、通常、この成分を有効成分といい、母生薬

の重要な成分とみなす。そして、生薬中のその有効成分が果たす役割を指標として、その生薬の有効性を適切に理解できるようになる。

生薬の成分を定量的に取り扱うためには、その定量法と標準品が必要となるが、現在ではこれら生薬の成分の定量法は急速に進歩している。したがって、生薬の有効性を成分レベルで考察し、それを基として、生薬の有効性を検討することが可能となってきた。有効成分の量に基づいた薬理活性の評価が可能になれば、生薬の品質評価に広く応用できるであろうし、組織培養生成物の評価においても、同様な方法によって、母生薬との間の同等性、更には、医薬品としての可能性を考察することができる。

以上の観点から、本研究では、既に組織培養が成功しており十分量の試料の供給ができ、その含有成分が詳しく検討されている紫根と黄連を取上げて、¹⁻³⁾ 天然品と組織培養により得られたカルスとの間の、薬理作用上の同等性を、有効成分の含量と比較し、検討した。同等性の評価には、紫根では肉芽形成促進作用、黄連では肉芽形成抑制作用の薬理活性を指標とした。

紫根は漢方製剤の紫雲膏や薬効分類上痔疾用剤に属するシコン製剤に含まれるが、抗炎症作用、肉芽形成促進作用を示し、これらの製剤の効能・効果を担っている。重要な有効成分として抗炎症作用、肉芽形成促進作用、抗菌作用が認められているシコン系色素化合物を含み、生薬の有効性の本体と目されている。⁴⁻⁸⁾ 一方、黄連は健胃薬、止瀉薬であるが、漢方処用薬としても広く使用されている。その効能・効果として、健胃作用、止瀉作用、抗菌作用、止血作用、消炎作用、及び鎮静作用などが立証され、あるいは推測される。有効成分はベルベリン系アルカロイドであり、ベルベリンは止瀉薬として使用されており、薬理作用としては抗菌作用を中心に、抗炎症作用（肉芽形成抑制作用）や利胆作用が報告されている。⁹⁻¹²⁾

実 験 の 部

実験材料 紫根は主として有機溶媒画分が外用薬として用いられていることから、鈴粉末薬品（株）より購入した乾燥硬紫根 (*Lithospermum erythrorhizon* STEB. et ZUCC.) を細切したもの (100 g) 及び硬紫根を組織培養して得られた乾燥ムラサキカルス¹⁾ (三井石油生物工学研究所) (100 g) を 60°C の温浴中でエーテル (1000 ml) を用いて 1 時間、3 回の繰り返し還流抽出を行った後、エーテルを減圧下で留去しエーテル抽出エキスを得、これを実験に供した。また、黄連は内服薬として用いられていることから、鳥取県薬農協同組合より購入した乾燥黄連 (*Coptis japonica* MAKINO var. *dissecta* NAKAI) を細切したもの (50 g) 及びセリバ黄連を組織培養して得られた乾燥オウレンカルス³⁾ (三井石油生物工学研究所) (50 g) を水 (1000 ml) を用いて 100°C の温浴上で 2 時間、2 回の繰り返し抽出を行った後、凍結乾燥し水抽出エキスを得、これを実験に供した。

また、これらの操作により得られたエーテル抽出エキス及び水抽出エキスに含有される総シコン系色素量、¹⁾ 及び総ベルベリン系アルカロイド量^{2,8)} は既に報告した方法により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量した。

実験方法 肉芽形成に及ぼす作用の検討実験には、体重 250 g 前後の Wistar 系雄ラットを用いた。エーテル麻酔下で背部の皮膚を 0.2% アクリノールで消毒した後、切開して、肩甲部皮下にあらかじめ消毒及び滅菌し、秤量しておいた 20 mg 前後の綿球を挿入した。紫根及びムラサキカルスエキスの局所投与（綿球浸漬）群では 10 日後に、黄連及びオウレンカルスエキスの連続経口投与群では 5 日後にこの綿球を取り出しその乾燥重量を測定した。⁶⁻⁸⁾

試料は、紫根とムラサキカルスではそれぞれ含有される総シコン系色素量が等しくなるようなエキスの 2 用量を 1% Tween 80 に溶解 (0.14% 及び 0.49%) して綿球に 0.1 ml 注入し、それを埋め込んだ (0.14 mg/rat 及び 0.49 mg/rat)。対照群には 1% Tween 80 溶液のみを綿球に 0.1 ml 注入し埋め込んだ。

一方、黄連及びオウレンカルスではそれぞれ含有される総ベルベリン系アルカロイド量が等しくなるようなエキスの 2 用量 (30 及び 100 mg/kg) を蒸留水に溶解し綿球挿入日から始めて 5 日間連続して経口投与した。⁹⁻¹²⁾ また、対照群には同容量の蒸留水を 5 日間連続して経口投与した。

また、これらエキスに含有されるアセチルシコン (三井石油生物工学研究所) 及びベルベリン (硫酸ベルベリン、三水化物、和光純薬) を positive control として使用した。なお、ベルベリンの用量はすべて遊離型の量で示した。

得られた結果は、埋め込む前の綿球の重量を基準とし、実験終了後の乾燥綿球の重量の増加率 (%) で表し、平均値±標準誤差で表示した。また、有意差の検定には Duncan の多重比較検定法を適用した。

結 果

1. エキス試料中の総シコニン系色素量及び総ベルベリン系アルカロイド量

HPLCを用いて得られた紫根とムラサキカサのエーテル抽出エキス中に含まれる総シコニン系色素量, 及び黄連とオウレンカサ水抽出エキスの総ベルベリン系アルカロイド量を Table I 及び Table II にそれぞれ示した.

ムラサキ及びオウレンカサのエキス中に含有される総シコニン系色素量及び総ベルベリン系アルカロイド量は天然産の紫根及び黄連エキス中の含量と比較してそのばらつきは少なかった.

これらエキスの中で薬理試験には, 紫根及びムラサキカサのエキスでは総シコニン系色素を 36% 及び 60% 含有しているものを使用した. また, これらエキス中には薬理活性成分の 1 つと考えられるアセチルシコニンが 21% 及び 49% 含有されており, カサエキスの方がほぼ 2 倍程度多かった.

一方, 黄連及びオウレンカサのエキスは総ベルベリン系アルカロイドを 26% 及び 14% 含有しているものを使用した. また, これらのエキス中の総アルカロイドに対するベルベリンの割合は 76% 及び 69% とほぼ同程度であった.

2. 肉芽形成に及ぼす作用

紫根及びムラサキカサのエーテルエキスは用量依存的に肉芽形成促進作用を示し, それぞれの相当量の効力は同等か, 又は, 若干カサエキスの方が強い傾向を示した. また, これらのエキスが示した作用効力は positive control として用いたアセチルシコニン 0.1% 及び 0.3% (0.1 及び 0.3 mg/rat) (それぞれ, 紫根のエキスに含まれる量に比べて約 3 倍, ムラサキカサのエキスに含まれる量に比べて約 1.4 倍濃い濃度) の効力とほぼ同程度か, 若干カサにおいて強い傾向であった. これらの結果を Fig. 1 に示した.

TABLE I. Comparison of Shikonin Derivatives of Lithospermi Radix and Cultured Cells of *Lithospermum erythrorhizon* in Ether Extract

Content of shikonin derivatives in ether extract (%)	Cultured cells ^{a)} 61.7±2.2 (60)	Lithospermi Radix ^{b)} 38.7± 9.5 (36)
Composition (%)		
Acetylshikonin	46.9±1.7 (49)	34.1±12.5 (21)
Isobutylshikonin	17.5±1.0 (17)	19.0± 8.2 (4)
β-Hydroxyisovalerylshikonin	17.5±0.8 (17)	11.9± 5.2 (1)
Isovalerylshikonin+α-methyl-n-butylshikonin	13.3±1.0 (12)	29.4±17.3 (70)
β,β-Dimethylacrylshikonin	2.1±0.6 (1)	2.6± 1.0 (1)
Shikonin+deoxyshikonin	2.6±0.8 (4)	3.0± 1.3 (3)

a) Results from 20 samples, b) results from 7 samples.

() value of pharmacologically tested sample.

TABLE II. Comparison of Berberine-type Alkaloids of Coptidis Rhizoma and Cultured Cells of *Coptis japonica* in Aqueous Extract

Content of berberine-type alkaloids in aqueous extract (%)	Cultured cells ^{a)} 12.5±2.2 (14)	Coptidis Rhizoma ^{b)} 20.9± 9.1 (26)
Composition (%)		
Berberine	64.8±5.3 (69)	62.0±10.7 (76)
Palmitine	9.8±2.3 (6)	11.5± 6.6 (3)
Coptisine	10.4±2.2 (8)	14.6± 4.3 (12)
Jateorrhizine	14.9±2.1 (17)	12.0± 5.0 (9)

a) Results of 5 samples, b) results of 8 samples.

() value of pharmacologically tested sample.

Fig. 1. Effects of Ether Extract of *Lithospermi Radix* and Cultured Cells of *Lithospermum erythrorhizon* on Proliferation of Granulation Tissue in Rats

■, *Lithospermi Radix* ether extract ($N=7$); □, cultured cell ether extract ($N=7$); △, acetylshikonin ($N=7$).

a, b) Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. c, d) Not significantly different from individual *Lithospermi Radix* ether extract. e, f) Not significantly different from individual *Lithospermi Radix* and cultured cell ether extract.

Fig. 2. Effects of Aqueous Extract of *Coptidis Rhizoma* and Cultured Cells of *Coptis japonica* on Proliferation of Granulation Tissue in Rats

●, *Coptidis Rhizoma* aqueous extract ($N=6$); ○, cultured cell aqueous extract ($N=6$); △, berberine ($N=6$).

a, b) Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. c, d) Not significantly different from individual *Coptidis Rhizoma* aqueous extract. e, f) Not significantly different from individual *Coptidis Rhizoma* and cultured cell aqueous extract.

一方、黄連及びオウレンカルの水エキ스는用量依存的に肉芽形成を抑制して抗炎症作用を示し、それぞれの相当量の効力はほとんど等しかった。また、これらのエキ스가示した作用効力は positive

control として用いたベルベリン 20.9 mg/kg 及び 69.6 mg/kg (それぞれ、黄連及びオウレンカルのエキ스에 含有される量と比べてほぼ同じ用量) の効力に比べてほぼ同程度か若干強い傾向を示した。これらの結果を Fig. 2 に示した。

考 察

紫根とその有効成分と考えられるアセチルシコニンの局所投与による肉芽形成促進作用⁶⁻⁸⁾ 及び黄連とその有効成分であるベルベリンの経口投与による肉芽形成抑制作用は、^{11,12)} 既報のごとくに、本研究での条件においてもそれぞれ認められた。

紫根については、紫根とムラサキカルのエキスの両者において、総シコニン系色素量を投与量の基準とした場合、薬理活性はカルスエキスの方が若干強い傾向を示した。この場合、エキス中に含有される総シコニン系色素量は紫根エキスでは 36%、カルスエキスでは 60% であったため、投与量中に含有される色素以外の成分は前者の方がほぼ 2 倍程度後者より多い。この色素以外の成分の含有量の相違が、若干両者の効力に影響したことが考えられる。また、positive control のアセチルシコニンは両エキスに含有される量が異なるため、両エキスにおける総シコニン系色素量のほぼ 70% を使用したが、その効力は紫根エキスと比較するとほぼ等しく、カルスエ

キスと比較すると若干弱かった。アセチルシコニンの含有量は両エキスにおいて一定でなく、総シコニン系色素中に含まれる量は 50% 以下であり、さらに他の色素成分の含量も両エキス間でかなりの差が見られるので、肉芽形成促進作用をアセチルシコニンを代表とした成分で考察することは多少困難であると考えられる。また、本実験での試料の投与方法は綿球浸漬による局所投与であるので、その生体内での利用率に関して未知の部分が存在する。

このようなことを踏まえて考察すると、紫根中には、総シコニン系色素化合物以外のエーテル可溶性成分として今のところ特異的な成分が見当たらないこと、色素成分がカルスエキス中に 60% と比較的多量に含まれていることから、カルスエキスの薬理活性には色素成分の関与が大きいと考えられる。また、紫根エキスの効力がカルスエキスと比較して若干弱いのは、総シコニン系色素量中のアセチルシコニン量が 21% とカルスエキスに比べてほぼ半分しかないこと、反対に色素以外の成分が、カルスエキスに比べてその投与量中にほぼ倍量あることなどが総シコニン系色素成分の局所部位からの吸収、その代謝及び排泄などの生体内利用に影響を与えたためと考えられる。

一方、黄連に関しては、黄連及びカルスエキスの両者において、総ベルベリン系アルカロイド量を投与量の基準とした場合、肉芽形成の抑制作用はほとんど等しかった。また、エキス中の総ベルベリン系アルカロイドの含有量は、黄連エキスは 26%、カルスエキスでは 14% であることから、後者は前者に比べてその投与量中に含有されるアルカロイド以外の成分はほぼ倍量であるにもかかわらず、薬理効力はほぼ等しかった。このことから、薬理作用の発現には主として総ベルベリン系アルカロイド群が関与するものと考えられる。

Positive control として使用したベルベリンの量は、両エキス中の総ベルベリン系アルカロイドの含有量のほぼ 70% であったが、黄連及びカルスエキスと比較して効力は若干弱かった。ベルベリンの含有量が等しいカルスエキスの効力は、**positive control** のベルベリンよりも若干強かったことから、薬理活性の発現には、共存する他のアルカロイドも少なからず寄与していると考えられる。^{7,8)} また、エキス中に含まれるアルカロイド以外の他の成分の協力作用も考えられる。

以上のことから、本研究で使用した紫根と黄連について、それぞれの重要な薬理作用としての肉芽形成促進作用と肉芽形成抑制作用には、それぞれの有効成分群の総シコニン系色素化合物及び総ベルベリン系アルカロイドが主に関与していると考えられるが、これら成分以外の他の共存成分もこれらの薬理作用に影響を与えているものと推察される。したがって、本研究で検討したように、天然品と組織培養生成物との比較をするためには、有効成分の含有量を測定すると同時に、適切な薬理効果をも評価することが重要であると考えられる。

謝辞 本研究は、ヒューマンサイエンス振興財団長寿関連基礎科学研究の一環として行ったものである。

引用文献

- 1) Y. Fujita, Y. Maeda, C. Suga, T. Morimoto, *Plant Cell Reports*, **2**, 192 (1983).
- 2) T. Misaki, K. Sagara, M. Ojima, S. Kakizawa, T. Oshima, H. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 354 (1982).
- 3) 菅 忠三, 森谷紀江, 吉岡利紘, 森本悌次郎, 藤田泰宏, 日本生薬学会第 35 年回講演要旨集, 新潟, 1988, p. 20.
- 4) 一般用漢方処方の手引, 厚生省薬務局監修, 薬業事報社, 1975, p. 117.
- 5) 医薬品製造指針 1982 年度版, 日本公定書協会編, 薬業事報社, 1982, p. 410.
- 6) 林 元英, 日薬理, **73**, 177 (1977).
- 7) 林 元英, 日薬理, **73**, 193 (1977).
- 8) 林 元英, 日薬理, **73**, 204 (1977).
- 9) 桑野重昭, 生薬, **24**, 1 (1970).
- 10) 萩庭丈寿, 原田正敏, 薬誌, **82**, 726 (1962).
- 11) 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 實, 薬誌, **90**, 782 (1970).
- 12) 大塚紘司, 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 實, 薬誌, **101**, 883 (1981).