

桜皮及び桜皮成分のエストロゲン受容体 β 結合能の評価

遠野弘美,* 堀井周文, 布施貴史, 小此木 明, 与茂田 敏

Evaluation of Estrogen Receptor β Binding of Pruni Cortex and Its ConstituentsHiromi TOHNO,* Chikafumi HORII, Takafumi FUSE,
Akira OKONOGI, and Satoshi YOMODAKracie Pharma, Ltd., Kampo Research Laboratories, 3-1 Kanebo-machi,
Takaoka, Toyama 933-0856, Japan

(Received March 11, 2010; Accepted April 21, 2010; Published online April 26, 2010)

The bark of *Prunus jamasakura* Siebold (Pruni Cortex) has long been used in Japan as a folk remedy and is one of ingredients of the Kampo formula, Jumi-haidoku-to (JHT). JHT is used for treatment of skin diseases such as acne (acne vulgaris). According to Kampo medicinal sources, Quercus Cortex can be used in place of Pruni Cortex. In this study, we found that water extracts of Pruni Cortex, not Quercus Cortex showed a binding effect on estrogen receptor β (ER β). Thus, their chemical analysis was carried out by GC-MS and found that five unique constituents (i.e., sakuranetin, naringenin, genistein, genkwanin and arctigenin) were detected in Pruni Cortex. The ER β binding capacity of these constituents was examined using 70 ng/ml 17 β -estradiol, as the positive control with 100% ER β binding. Among them, genistein (60% at 10 ng/ml) showed the strongest binding capacity than naringenin (60% at 1000 ng/ml) and sakuranetin (40% at 1000 ng/ml). These results suggested that Pruni Cortex in JHT could play an important role in treatment of acne. In addition, those of Pruni Cortex from different harvest places were also examined in their chemical contents and ER β binding capacity. The extracts of Pruni Cortex from Kyushu in Japan and Anhui Province in China showed higher contents of genistein and stronger ER β binding capacity than that of Pruni Cortex from Tokushima Prefecture in Japan.

Key words—Pruni Cortex; estrogen receptor β ; genistein; sakuranetin; naringenin

緒 言

桜皮 (Pruni Cortex) はバラ科 (Rosaceae) ヤマザクラ *Prunus jamasakura* SIEBOLD 又はその他近縁植物の、通例、周皮を除いた樹皮を基原とする生薬であり、¹⁾ 本州 (関東地方以西)、四国、九州及び朝鮮に分布しており、中国ではその同種あるいは近縁植物と考えられる山桜が生育しており、²⁾ 中華本草では学名として *Prunus serrulata* が用いられている。美しい花を鑑賞できるサクラ類は、東アジアに分布が集中し、少数がヒマラヤや中国にも自生している。しかし、園芸的にサクラとして取り扱われているものの大部分は日本に産する。サクラ類が日本を代表する花として有名になったのも、花の美しい自生品種が多いことと、これからたくさんの園芸品種が育成、保存されてきたからである。³⁾ ヤマザクラ

は、日本の暖帯から温帯に分布しており、樹皮を「桜皮」と称して毒消しの薬に用いていた。^{4,5)} 日本の民間薬として開発されたものであり、江戸時代の民間療法の書物に多く収載され、⁶⁾ 桜皮は解毒、鎮咳、咳嗽、湿疹及び蕁麻疹などに煎剤として用いられており、また、桜皮抽出物は、急性気管支炎や肺炎、肺結核に伴う咳嗽及び喀痰喀出困難に医療用の配合剤 (鎮咳去痰剤) の主成分としても知られている。⁵⁾

漢方薬としては、江戸時代の華岡青洲 (生没年 1760–1835 年) が創製した「十味敗毒湯」に唯一配合されている。この十味敗毒湯という処方、「万病回春」に収載されている荊防敗毒湯という急性化膿性疾患の初期などに用いる処方を参考に、日本の気候や風土に合わせ、荊防敗毒湯から羌活、前胡、薄荷葉、連翹、枳殼、金銀花を除いて桜皮を加えた、「本朝経験方」と呼ばれる日本漢方の 1 つである。⁷⁾ 本処方は 1800 年代の中ごろ、華岡青洲が記し

クラシエ製薬株式会社漢方研究所

*e-mail: tohno_hiromi@pkm.kracie.co.jp

た「瘍科方笈」に、十味敗毒湯の方名で記載されており、桜皮が配合生薬として用いられているが、⁸⁾ 浅田宗伯の「勿誤薬室方函」では、十味敗毒湯の方名で、「柴胡、独活、桔梗、川芎、甘草、荊芥、防風、桜皮、茯苓、生姜、右十味、今樸楸を以て桜皮に代う」と記載されており、⁹⁾ ここで薬味の改変が行われている。この樸楸 (*Quercus Cortex*) は、クヌギ (*Quercus acutissima* CARRUTHERS) 又はその他近縁植物 (Fagaceae) の樹皮である。¹⁾

これら桜皮と樸楸を生薬の特徴で比較すると、桜皮は排膿作用が強く、樸楸は瘀血を破る作用が強いと考えられており、それぞれの主効とするところが少々異なるので、本来は適応証によって使い分けられるべきであるという考えもある。¹⁰⁾

わが国における漢方製剤承認基準において、十味敗毒湯の効能・効果は、「体力が中程度なものの皮膚疾患で、発赤があり、ときに化膿するものの次の諸症：化膿性皮膚疾患・急性皮膚疾患の初期、じんましん、湿疹・皮膚炎、水虫」となっており、¹¹⁾ 尋常性痤瘡のような皮膚化膿症を繰り返すものに対して体質改善の目的でよく用いられ、特に、女性の尋常性痤瘡に著効を示すことが報告されている。¹²⁾

桜皮には抗アレルギー作用¹³⁾や皮膚線維芽細胞からのエストロゲン分泌促進作用などが知られており、¹⁴⁾ 十味敗毒湯の尋常性痤瘡の改善に関与することが考えられる。

皮膚線維芽細胞にはエストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) よりもエストロゲン受容体 β ($ER\beta$) が多く発現しており、¹⁵⁾ エストロゲン分泌促進は $ER\beta$ を介したエストロゲン様作用と関連することが考えられ、桜皮中に $ER\beta$ と結合してエストロゲン様作用を示す成分の存在が推測される。桜皮の主な成分は、サクラネチンであり、その前駆体のナリンゲニン¹⁶⁾やゲニステインが知られている。¹⁷⁾ これら成分のうち、ゲニステイン及びナリンゲニンにはエストロゲン様作用が報告されている。^{18,19)} しかし、桜皮に関して、エストロゲン様作用を指標にして成分を解析した報告はほとんどない。

そこで、今回、十味敗毒湯の構成生薬として出典により違いがある桜皮と樸楸に関し、エストロゲン様作用を比較する目的で、それぞれ水を用いて加熱抽出したエキス (水抽出エキス) について、レセプター/コアクチベーター・リガンドバインディング

アッセイ法を用いた $ER\beta$ 結合能の評価を行った。そして、桜皮の産地の違いによる含有成分の差異を、ガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS) を用いた分析及び液体クロマトグラフィー・質量分析 (LC/MS) を用いた定量分析を行うことにより明確にし、さらに、検出された成分について、同様に、 $ER\beta$ 結合能の評価を行うことにより、桜皮中のエストロゲン様作用の活性成分を特定したので報告する。

方 法

1. 材料及び試薬 桜皮刻み生薬は、徳島県産を栃本天海堂株式会社 (Japan 1, Lot. 030909003) 及び新和物産株式会社 (Japan 2, Lot. S-8298) から、九州産の2ロット (Japan 3, Lot. 9CS23K90 及び Japan 4, Lot. 6FS12K70) を株式会社井藤吉商店から、中国安徽省産の2ロット (China 1, Lot. 0952651 及び China 2, Lot. 09N18510) を青島華鐘製薬有限公司より購入したものを使用した。樸楸刻み生薬は、長野県産1ロット (Lot. 031809001) を栃本天海堂株式会社から購入したものを使用した。

サクラネチン (sakuranetin) は EXTRASYN-THESE 社 (Lot. 09052605)、ナリンゲニン (naringenin) は SIGMA 社 (Lot. 102F-0511-1)、ゲニステイン (genistein) は和光純薬工業株式会社 (Lot. PEE1304)、ゲンクワンニン (genkwanin) は Tronto Research Chemicals 社 (Lot. 2-LJM-50-2) より購入し使用した。アルクチゲニン (arctigenin) は牛蒡子より自家で分離精製したものを使用した。

ヒトエストロゲン受容体 β ($ER\beta$) 結合能の評価には、EnBio 社 RCAS for $ER\beta$ キットを使用した。

2. 水抽出エキスの調製 桜皮又は樸楸刻み生薬各 200 g に蒸留水 2000 ml を加え、60 分間加熱抽出した。そして、医療ガーゼを敷いた 100 メッシュのふるいにろ過した後、ろ液を凍結乾燥し、桜皮水抽出エキス及び樸楸水抽出エキスを得た。

3. GC-MS による分析

3-1. 試料溶液の調製 桜皮 (Japan 1) 及び樸楸水抽出エキス各 0.5 g に水/ジエチルエーテル (2:5) 溶液 7 ml を加え、10 分間振り混ぜ、遠心分離した。ジエチルエーテル層を分取し、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過後、ろ液を試料溶液とした。

3-2. GC-MS 分析条件 装置：Shimadzu 社製 GCMS-QP2010, カラム：Restek 社製 Rxi-5ms (20 m×0.18 mm i.d., 膜厚 0.18 μm), キャリアーガス：He (255.9 kPa), スプリット比：50 : 1, 注入量：1.0 μl, 注入口温度：300°C, カラム温度：初期温度 200°C (1 min hold)–昇温 20°C/min–最終温度 330°C (2 min hold), 検出器温度：300°C, イオン化法：EI 法, データ処理用ソフト：GCMSsolution Ver. 2.53 SU3.

4. LC/MS による定量 GC-MS 定性分析より検出された桜皮の主要な成分であるサクラネチン, ナリンゲニン, ゲニステイン, ゲンクワニン及びアルクチゲニンについて, LC/MS 測定条件の検討及び検量線を作成した. 設定した測定条件及び検量線から, 桜皮及び桜皮水抽出エキス中の各成分含量の測定を行った.

4-1. 標準溶液及び試料溶液の調製 標品のサクラネチン, ナリンゲニン, ゲニステイン及びゲンクワニンは 5–5000 ng/ml, アルクチゲニンは 250–5000 ng/ml になるよう 50%メタノールで段階希釈し標準溶液とした. 桜皮の粉碎品及び水抽出エキス約 0.5 g を精密に量り, 50%メタノール溶液を加えて, 20 分間振り混ぜ, 正確に 50 ml とした. この液をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過し, ろ液を試料溶液とした.

4-2. LC/MS 分析条件 LC/MS 装置：Shimadzu 社製 LCMS-2010A, HPLC 装置：Shimadzu 社製 LC10ADvp, カラム：YMC 社製 YMC-Pack Pro C18 (150×2.0 mm i.d., 5 μm), カラムオープン：Shimadzu 社製 CTO-10ACvp, 検出器：Shimadzu 社製 SPD-M10Avp, 移動相 A：0.1%ギ酸アセトニトリル溶液, 移動相 B：0.1%ギ酸水溶液, グラジエント条件：移動相 A/B 20/80 (0 min)–A/B 70/30 (90 min), 流速：0.2 ml/min, カラム温度：20 °C, 注入量：10 μl, 検出：フォトダイオードアレイ検出器(PDA), 及びシングル四重極質量検出器.

4-3. 質量分析条件 イオン化：CI 法, プローブ：ESI, 分析モード：SIM (負イオンモード), プローブ電圧：2 kV, Q-array RF (radio frequency) 電圧：150 V, Q-array DC (direct current) 電圧：–5 V/–25 V/–20 V, 乾燥ガス流量：N₂ (0.1 MPa), CDL 導入電圧：5 V, ネブライザーガス流量：1500 ml/min, CDL 温度：300°C, ブロッ

ク温度：300°C, データ処理用ソフト：LCMS Solution Ver. 2.04 Su3H3.

5. ヒト ERβ 結合能の評価

5-1. 試料溶液の調製 桜皮又は樅櫨水抽出エキス 2 mg を精密に量り, それぞれジメチルスルホキシド (DMSO) 1 ml を加え溶かし, DMSO で段階希釈し, 試料溶液とした. また, サクラネチン, ナリンゲニン, ゲニステイン, ゲンクワニン及びアルクチゲニン 1 mg を精密に量り, それぞれ 20 μg/ml となるように DMSO を加えて溶かし, DMSO を用いて段階希釈し, 試料溶液とした.

5-2. 測定方法 ERβ 結合能の評価は, コアクチベーター (SRC1), レセプター及びリガンドとの複合体形成を指標に, ERβ 結合能を測定した.

SRC1 固相化プレート及び SRC1 非固相化プレートに, レセプター混合液 95 μl/well と陽性対照の 5 μM (1.4 μg/ml) 又は 2 μM (0.54 μg/ml) 17β-エストラジオール又は各試料溶液 5 μl/well を加え, 室温で 60 分間反応させた. プレートを洗浄後, 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識した検出抗体を 100 μl/well 加えて, 60 分間反応させた. さらに, プレートを洗浄後, HRP の基質であるテトラメチルベンジジン 100 μl/well を加えて, 20 分間酵素反応させた. 反応停止液を 100 μl/well 加え, 450 nm の吸光度を測定した. なお, 本試験系における well 中の試料溶液は 20 倍希釈となるため, 17β-エストラジオール濃度は 5 μM が 250 nM (70 ng/ml), 各水抽出エキス及び各成分の最高濃度は 2 mg/ml が 100 μg/ml, 20 μg/ml が 1 μg/ml として表記した.

そして, ERβ に対する結合率 (%) は, $B/B_{\max} = (C - B) / (A - B) \%$ より算出した. ここで, A は陽性対照の SRC1 (+) の吸光度–陽性対照の SRC1 (–) の吸光度, B は陰性対照の SRC1 (+) の吸光度–陰性対照の SRC1 (–) の吸光度, C は各試料溶液の SRC1 (+) の吸光度–各試料溶液の SRC1 (–) の吸光度とした.

結 果

1. GC-MS による分析結果 桜皮 (Japan 1, Lot. 030909003) 及び樅櫨の各水抽出エキスの含有成分について, 実験方法に示した条件で, GC-MS 分析を行った. Figure 1 にトータルイオンクロマト

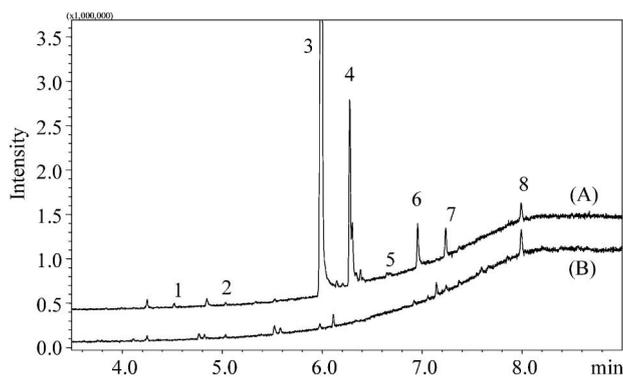


Fig. 1. Total Ion Chromatograms of Water Extracts of Pruni Cortex (A) and Quercus Cortex (B) by GC-MS

1, pinostrobin chalcone; 2, pinocembrin; 3, sakuranetin; 4, naringenin; 5, genistein; 6, genkwaniin; 7, arctigenin; 8, β -sitosterol.

グラムを示した。クロマトグラム上に検出された 8 つのピークについて、保持時間とマススペクトルから解析したところ、Fig. 1 に示したように、桜皮水抽出エキスの含有成分として (1) ピノストロビンカルコン、(2) ピノセンブリン、(3) サクラネチン、(4) ナリンゲニン、(5) ゲニステイン、(6) ゲンクワニン、(7) アルクチゲニン及び (8) β -シトステロールを同定した。一方、樺櫨水抽出エキスについては、成分 (8) を確認したが、それ以外の成分 (1) から (7) については、検出されなかった。

2. LC/MS による定量分析

2-1. LC/MS 条件の検討 桜皮水抽出エキスをを用い、桜皮中の特徴成分で含有量が比較的高かった (3) から (7) の各成分含量について、LC/MS による定量法の検討を行ったところ、紫外吸光スペクトルの各桜皮成分のモニタリング波長 UV を、サクラネチンは 286 nm、ナリンゲニンは 287 nm、ゲニステインは 259 nm、ゲンクワニンは 335 nm 及びアルクチゲニンは 279 nm として分析したが、検出感度、夾雑物の影響により定量することが困難であった。

次に、マススペクトルについて検討したところ、クロマトグラム上には、サクラネチンに付随する小さなピークが認められ、最適な分離条件を見出すことはできなかったため、マススペクトルはピーク面積値ではなく、ピーク高さにて比較し、含量を求めることとした。プローブを正イオンモードで分析した結果、サクラネチン、ナリンゲニン、ゲニステイン及びゲンクワニンは $[M+H]^+$ で検出すること

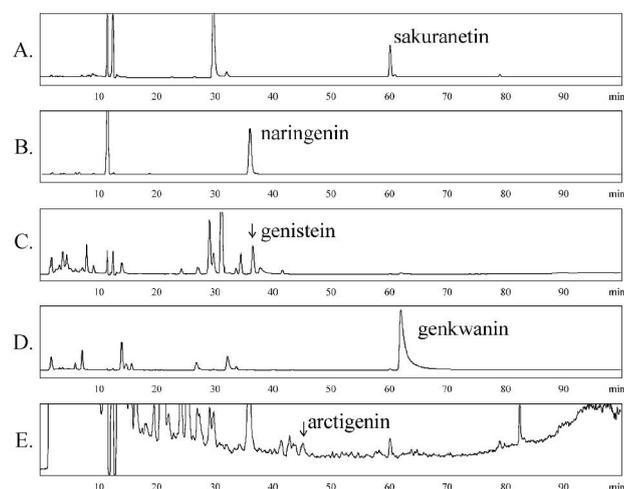


Fig. 2. LC/MS Chromatograms of A-E in Pruni Cortex Water Extract Components

A, sakuranetin; B, naringenin; C, genistein; D, genkwaniin; E, arctigenin.

が可能であったが、アルクチゲニンは $[M+H-H_2O]^+$ 、 $[M+H]^+$ 及び $[M+K]^+$ が検出された。そこで、負イオンモードで分析した結果、全体的に夾雑物の影響は減少し、サクラネチン、ナリンゲニン、ゲニステイン、ゲンクワニン及びアルクチゲニンのすべてを $[M-H]^-$ で検出することができた。Figure 2 に LC/MS のクロマトグラムを示す。

2-2. 検量線作成 実験方法に示した条件下で、サクラネチン、ナリンゲニン、ゲニステイン、ゲンクワニン及びアルクチゲニンの検量線を検討した結果、良好な直線性を示し ($R^2 = 0.9969 - 1.0000$)、クロマトグラフのピークと注入量の間には良好な直線関係が得られた。回帰方程式、相関関係及び保持時間は次の通りであった。

サクラネチン : $Y = 0.1665X - 3304.0$ ($R^2 = 0.9969$) ; 保持時間 60.4 min, ナリンゲニン : $Y = 1.7121X - 2320.7$ ($R^2 = 1.0000$) ; 保持時間 36.0 min, ゲニステイン : $Y = 1.6025X - 2371.2$ ($R^2 = 1.0000$) ; 保持時間 36.7 min, ゲンクワニン : $Y = 0.4404X - 922.79$ ($R^2 = 0.9999$) ; 保持時間 62.8 min, アルクチゲニン : $Y = 0.0051X - 9.8227$ ($R^2 = 0.9999$) ; 保持時間 45.4 min.

2-3. 日本産及び中国産桜皮の成分定量 徳島県産及び九州産の日本産桜皮と中国安徽省産桜皮の粉碎品について、実験方法に示した LC/MS 設定条件下で定量を行った結果 (Table 1)、桜皮の主成分はサクラネチンであり、徳島県産、九州産及び安徽

Table 1. Compounds Contents ($\mu\text{g/g}$) of Shredded Pruni Cortex from Different Harvest Places

Places of harvest	Compounds				
	sakuranetin	naringenin	genistein	genkwanin	arctigenin
Tokushima Pref. (Japan 1)	297.1	163.4	2.3	72.8	22.1
Tokushima Pref. (Japan 2)	297.6	207.6	23.5	58.7	23.7
Kyushu Area (Japan 3)	330.9	450.9	171.3	195.5	31.9
Kyushu Area (Japan 4)	393.5	430.5	308.1	259.1	50.7
Anhui Prov. (China 1)	759.1	146.8	133.1	186.3	0.8
Anhui Prov. (China 2)	937.7	141.5	157.0	275.9	1.0

省産の桜皮中の含量は、それぞれ 297 $\mu\text{g/g}$, 331–394 $\mu\text{g/g}$ 及び 759–938 $\mu\text{g/g}$ で、安徽省産が日本産よりも約 2 倍高かった。また、ナリンゲニン含量はそれぞれ 163–208 $\mu\text{g/g}$, 431–451 $\mu\text{g/g}$ 及び 142–147 $\mu\text{g/g}$ であり、九州産が徳島県産及び安徽省産よりも 2 倍以上高く、ゲニステイン含量はそれぞれ 2–24 $\mu\text{g/g}$, 171–308 $\mu\text{g/g}$ 及び 133–157 $\mu\text{g/g}$ であり、九州産及び安徽省産が比較的の高い値を示した。そして、ゲンクワンニン含量はそれぞれ 59–73 $\mu\text{g/g}$, 196–259 $\mu\text{g/g}$ 及び 186–276 $\mu\text{g/g}$ で、九州産及び安徽省産が比較的に高かった。また、アルクチゲニン含量はそれぞれ 22–24 $\mu\text{g/g}$, 32–51 $\mu\text{g/g}$ 及び 0.8–1.0 $\mu\text{g/g}$ で、日本産の方が高い値を示した。

2-4. 水抽出エキス中の成分定量 徳島県産及び九州産と中国安徽省産の桜皮水抽出エキスの LC/MS 分析を行うため、実験方法に従って、桜皮の刻み生薬から水抽出エキスを調製した。それぞれの水抽出エキスの収率は、7.5–9.3%であった (Table 2)。

実験方法に示した LC/MS 設定条件下、負イオンモードで徳島県産及び九州産の日本産桜皮と中国安徽省産の桜皮水抽出エキスについて成分定量を行った (Table 3)。

徳島県産、九州産及び安徽省産の桜皮水抽出エキスは、主成分のサクラネチンをそれぞれ 4.65–6.12 mg/g, 5.80–5.97 mg/g 及び 4.43–4.69 mg/g 含有し、産地による大きな差がなかった。水抽出エキス中の各成分の回収率について、桜皮粉碎品の各成分の含量を桜皮水抽出エキスの収率で除した含量と、水抽出エキスの含量とを比較して求めたところ、ナリンゲニン、ゲニステイン、ゲンクワンニン及びアルクチゲニンの回収率は、40–60%程度であった。しかし、徳島県及び九州の日本産のサクラネチンの回

Table 2. Water Extraction Rate (%) of Contents in Shredded Pruni Cortex from Different Harvest Places

Places of harvest	Contents (%)
Tokushima Pref. (Japan 1)	8.3
Tokushima Pref. (Japan 2)	8.9
Kyushu Area (Japan 3)	7.5
Kyushu Area (Japan 4)	7.6
Anhui Prov. (China 1)	8.5
Anhui Prov. (China 2)	9.3

収率は、115–170%であり、エキス中のサクラネチンの含量が粉碎品に比べて増加した。これは、サクラネチンの配糖体であるサクラニンが、サクラネチンに変化したためと考えられる。

また、ナリンゲニン含量はそれぞれ 0.81–0.92 mg/g, 1.80–2.71 mg/g 及び 0.70–0.82 mg/g であり、桜皮粉碎品の定量結果と同様に、九州産が徳島県産及び安徽省産よりも 2 倍以上高く、ゲニステイン含量はそれぞれ 0.02–0.15 mg/g, 1.24–1.72 mg/g 及び 0.66–0.85 mg/g であり、粉碎品の定量結果と同様に九州産と安徽省産が比較的の高い値を示した。そして、ゲンクワンニン含量は、それぞれ 0.61–0.81 mg/g, 1.08–1.24 mg/g 及び 0.63–0.76 mg/g, アルクチゲニン含量はそれぞれ 5–11 $\mu\text{g/g}$, 21–54 $\mu\text{g/g}$ 及び 13–22 $\mu\text{g/g}$ であり、産地による大きな差はなかった。

3. ER β 結合能の評価 陽性対照 17 β -エストラジオール 70 ng/ml の ER β との結合能を 100%として、徳島産 (Japan 1) 桜皮水抽出エキスは 40 及び 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で 40%の結合能を示し、樺椒水抽出エキスの結合能は認められなかった (Fig. 3)。そして、GC-MS 及び LC/MS 分析により検出した桜皮成分 5 種類については、サクラネチンが 1000

Table 3. Compounds Contents (mg/g) of Water Extracts of Pruni Cortex from Different Harvest Places

Places of harvest	Compounds				
	sakuranetin	naringenin	genistein	genkwanin	arctigenin
Tokushima Pref. (Japan 1)	6.12	0.81	0.02	0.81	0.01
Tokushima Pref. (Japan 2)	4.65	0.92	0.15	0.62	0.01
Kyushu Area (Japan 3)	5.80	2.71	1.24	1.08	0.02
Kyushu Area (Japan 4)	5.97	1.80	1.72	1.24	0.05
Anhui Prov. (China 1)	4.43	0.70	0.66	0.63	0.01
Anhui Prov. (China 2)	4.69	0.82	0.85	0.76	0.02

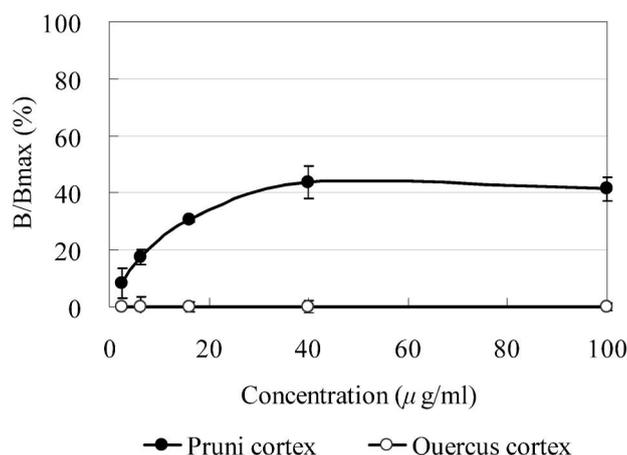


Fig. 3. Agonistic Action of Pruni Cortex and Quercus Cortex on ERβ

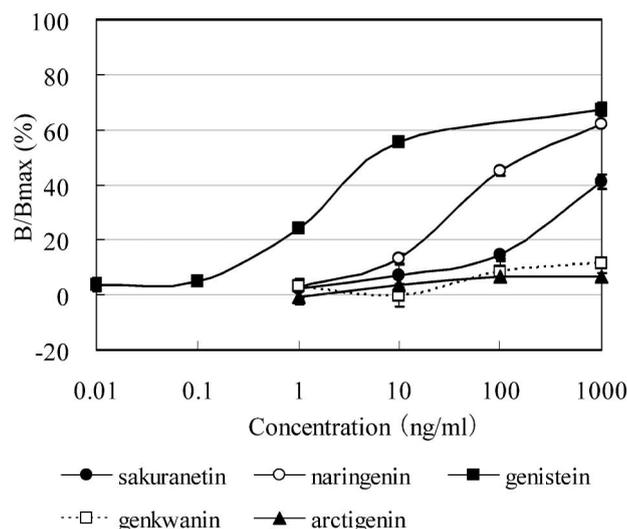


Fig. 4. Agonistic Action of Compounds of Pruni Cortex on ERβ

ng/ml 濃度で最大 40% の結合能, ナリンゲニンが 1000 ng/ml で最大 60% の結合能, ゲニステインが 10 ng/ml 濃度で最大 60% と最も高い結合能が確認された. 一方, ゲンクワニン及びアルクチゲニンでは結合能が認められなかった (Fig. 4).

また, 陽性対照 17β-エストラジオール 27 ng/ml の ERβ との結合能を 100% として, 日本産及び中国産の各桜皮水抽出エキスについては, 九州産 (Japan 3 及び 4) 及び安徽省産 (China 1 及び 2) が 8 μg/ml 濃度で 60% の結合能, 徳島県産 (Japan 1 及び 2) が 40 μg/ml で 50% の結合能を示した. 以上から, 徳島県産に比べて九州産及び安徽省産の方が, 低濃度の添加量で高い結合能を示すことが確認された (Fig. 5).

考 察

漢方薬の構成生薬である桜皮と樸椒の成分を, GC-MS 及び LC/MS により分析したところ, 桜皮

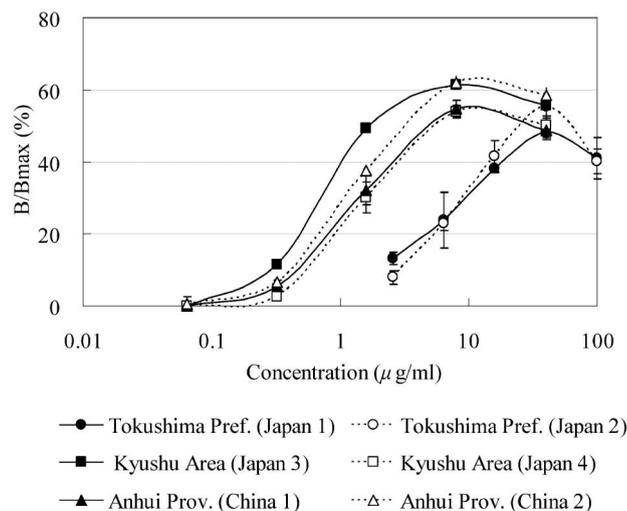


Fig. 5. Agonistic Action of Pruni Cortex from Different Harvest Places on ERβ

のみに含有される特徴成分として、サクラネチン、ナリンゲニン、ゲニステイン、ゲンクワニン及びアルクチゲニンが確認された。そして、これらの桜皮成分について産地による含量の違いをLC/MSにより検討した結果、桜皮の粉碎品から50%メタノール溶液により抽出した場合、主成分であるサクラネチンの含量は、中国安徽省産の方が日本の徳島県産及び九州産に比べて約2倍高かった。しかし、日本産桜皮の刻み生薬に水を用いて加熱抽出したエキス粉末のサクラネチン含量の回収率が100%を超えたことより、産地による差はほとんどない結果となった。これは、日本産桜皮では、サクラネチンの配糖体であるサクラニン²⁰⁾が水による加熱抽出過程で糖が切断され、アグリコンであるサクラネチンが増加したためであると考えられる。

その他成分については、ナリンゲニンが九州産、ゲニステイン及びゲンクワニンが九州産及び安徽省産、アルクチゲニンが日本産で含量が高かった。このように、中国産と日本産又は日本産においても産地間に含量差があるものの、桜皮はサクラネチンが主成分で、ナリンゲニン、ゲニステイン、ゲンクワニン及びアルクチゲニンの含有が確認できた。

桜皮と樸櫨の水抽出エキスについて、レセプター/コアクチベーター・リガンドバイディングアッセイ法を用いたER β 結合能を検討したところ、桜皮水抽出エキスはER β 結合能を示したが、樸櫨水抽出エキスは全くER β 結合能を示さず、桜皮のみにエストロゲン様作用を有することが確認された。そして、桜皮中のゲニステイン、ナリンゲニン及びサクラネチンの順で強いER β 結合能を示し、これら成分がエストロゲン作用の活性成分であることが明らかになった。

産地の異なる桜皮水抽出エキスの成分含量とER β 結合能を比較すると、九州産及び安徽省産桜皮は徳島県産桜皮よりもゲニステイン含量が高く、ER β 結合能も高かった。この結果より、桜皮のエストロゲン作用はゲニステインの関与が大きいことが示唆された。

桜皮が配合される唯一の漢方処方である十味敗毒湯は、荊芥、防風及び生姜など辛温解表薬の生薬を中心に構成されており、温めて血行改善し、邪を発散治癒することが目標である。また、桔梗、柴胡、独活、防風及び桜皮には、抗炎症作用及び鎮痛作用

があることから、皮膚疾患に非常に有用であると考えられている。⁷⁾そして、尋常性痤瘡のような皮膚化膿症を繰り返すものに対して体質改善の目的でよく用いられ、女性の尋常性痤瘡に効果が高いことが示されている。¹²⁾

尋常性痤瘡とは、主に青年男女の顔や胸背部に好発する慢性炎症性疾患で、痤瘡の中で最も代表的な疾患であり、一般にニキビと呼称される。痤瘡発症のメカニズムは、脂線性毛包の皮脂腺の活性化であり、食事生活などの生活習慣、年齢、性別、及びホルモンなどの要因が挙げられるが、中でも男性ホルモンが最も影響を与えられている。男性ホルモンのアンドロゲンは、脂腺の発達や皮脂の合成、毛包漏斗上皮(角化)細胞の角化亢進を引き起こす。そのため、男性ホルモンの分泌量が増加する思春期は、男女ともに痤瘡が発症し易い時期と言える。一方、女性ホルモンであるエストロゲンは、男性ホルモンのアンドロゲンに拮抗的に働き、²¹⁾アンドロゲンの皮脂分泌によるニキビの産生促進を抑制すると言われている。²²⁾

これは、男性ホルモンであるテストステロンがタイプIの5 α -リダクターゼによって更に強い男性ホルモン作用を有するジヒドロテストステロン(DHT)に変換され、DHTが皮脂腺を活性化し、皮脂分泌の亢進及び角化細胞の角化亢進を起こすのに対して、エストロゲンは血中性ホルモン結合グロブリン(SHBG)を産生促進し、血中の遊離テストステロン(FT)を減少させることで、5 α -リダクターゼ活性を抑制し、ジヒドロテストステロン(DHT)の変換を減少させることによるものであると考えられている。^{21,22)}

また、ニキビ跡の改善には皮膚の真皮に存在する線維芽細胞の機能を活性化して、コラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチン等の真皮成分を産生して皮膚の修復を行うことが有効である。この皮膚線維芽細胞の活性化には女性ホルモンが深く関わっており、女性ホルモンは線維芽細胞に働きかけ、ヒアルロン酸やコラーゲンの合成を活性化することが知られている。このエストロゲンの作用は線維芽細胞に存在するER β を介して引き起こされるものである。

そして、桜皮は*in vitro*で皮膚線維芽細胞からのエストロゲン分泌を増加させることが報告されており、¹⁴⁾エストロゲンの生理的機能は、エストロゲン

受容体 (ER) を介して引き起こされるものである。エストロゲンが ER の C 端側にあるリガンドドメイン (LBD) に結合すると, ER は中央に存在するゲノム DNA 上のエストロゲン応答配列 (ERE) と二量体で結合し, 近傍の標的遺伝子の転写制御を行う。ER の発現部位によって標的遺伝子が変わり, 細胞増殖及び抑制に作用したり, ER が直接的及び間接的にエストロゲン作用を行ったりすることが報告されている。²³⁾

そして, 皮膚線維芽細胞には ER α よりも ER β が多く発現しており,¹⁵⁾ 線維芽細胞からはエストロゲンが分泌されることが報告されていることから,²⁴⁾ エストロゲン様作用を有する成分が, 線維芽細胞の ER β に結合することにより, 細胞増殖因子であるトランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF- β 1) 又は上皮細胞増殖因子 (EGF) を誘導し, 線維芽細胞が増殖促進されるため,^{25,26)} エストロゲンが相対的に増加することが推察される。

したがって, 桜皮を配合した十味敗毒湯は, 桜皮由来成分のエストロゲン様作用により, 尋常性痤瘡のような皮膚化膿症を繰り返すものの体質改善に有用であると考えられる。

また, エストロゲン受容体及び血中エストロゲン濃度は一般に女性が多いと言われており, 今回得られた結果は, 竹村らの報告¹²⁾で桜皮を配合した十味敗毒湯が女性の尋常性痤瘡に著効を示したことを支持するものであると考えられる。

REFERENCES

- 1) “The Japanese Standards for Herbal Medicines,” YAKUJI NIPPO LIMITED, Tokyo, 1993, pp. 11–76.
- 2) Kitamura S., Murata G., “Coloured Illustrations of Woody Plants of Japan,” Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, 1979, pp. 13–14.
- 3) Akiba T., “Engei Shokubutsu Daijiten,” Syogakukan, Tokyo, 1994, pp. 932–933.
- 4) Imai J., *Gekkan Toyo Igaku*, **28**, 4–6 (2000).
- 5) Nomura T., Miyashita H., Yoshimitsu H., Matsuoka C., Ikeda T., Tsukamoto S., Manabe H., Murakami Y., Abstracts of Papers, the 53th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy, Saitama, 2006, p. 204.
- 6) Namba T., “The Encyclopedia of Wakan-Yaku: Traditional Sino-Japanese Medicines,” Vol. 2, Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, 1994, pp. 160–161.
- 7) Hanawa T., *J. Jpn. Soc. Hosp. Pharm.*, **26**, 1532–1533 (1990).
- 8) “Kinsei Kanpo Igakusho Shusei, Vol. 30, Hanaoka Seishu, 2,” eds. by Otsuka K., Yakazu D., Meicho Shuppan, Tokyo, 1980, p. 345.
- 9) “Kinsei Kanpo Igakusho Shusei, Vol. 95, Asada Sohaku, 1,” eds. by Otsuka K., Yakazu D., Meicho Shuppan, Tokyo, 1982, p. 181.
- 10) Koyama S., “Medicinal Herbal Extracts of East Asia: A Materia Medica Based on the Classics,” Medical Yukon, Kyoto, 2003, pp. 294–299.
- 11) Takeda S., “Ippanyo Kanpo Shoho no Tebiki,” Jiho, Inc., Tokyo, 2009, pp. 116–117.
- 12) Takemura T., *J. New Rem. & Clin.*, **58**, 151–159 (2009).
- 13) Kataoka M., Takagaki H., *Natural Med.*, **50**, 344–348 (1996).
- 14) Mekata H., Misaki H., *Fragrance J.*, **34**(8), 42–47 (2006).
- 15) Haczynski J., Tarkowski R., Jaezabek K., Wolczynski S., Magoffin A. D., Czarnocki K. J., Ziegert M., Jakowicki J., Jakimiuk A. J., *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 903–908 (2004).
- 16) Kim B.-G., Jung B.-R., Lee Y., Lim Y., Ahn J.-H., Hur H.-G., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 823–828 (2006).
- 17) Yoshioka A., Etoh H., Yagi A., Sakata K., Ina K., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3355–3356 (1990).
- 18) Washida K., Nomoto K., Yamagaki T., Iwashita T., Abstracts of Papers, the 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy, Kyoto, 2009, p. 89.
- 19) Hirose T., Morito K., Aomori T., Masamune Y., Kinjo J., Hasegawa J., Ogawa J., Muramatsu M., “Forum 2000: Pharmaceutical Health Science, Environmental Toxicology,” 2000, p. 104.
- 20) Masui K., Oshikata M., Kunimoto J., *Shoyakugaku Zasshi*, **36**, 173–175 (1982).
- 21) Banno N., *Fragrance J.*, **35**(5), 36–41 (2007).
- 22) Aizawa H., *Fragrance J.*, **27**(8), 28–36 (1999).
- 23) Inoue S., *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, **51**, 682–

- 692 (1999).
- 24) Svenstrup B., Brunner N., Domebernowsky P., Nohr I., Micic S., Bennet P., Spang-Thomsen M., *J. Steroid Biochem.*, **35**, 679–687 (1990).
- 25) Ashcroft G. S., Dodsworth J., Ferguson M. W. J., Van Boxtel E., Horan M. A., Tarnutzer R. W., Schultz G. S., *Nat. Med.*, **3**, 1209–1215 (1997).
- 26) Kim D. S., Schaefer-Korting M., Korting H. C., *Pharmazie*, **53**, 51–57 (1998).