

## ラン科セッコク属植物の包括的分類に基づく薬用資源の探索

高宮知子（日本大学薬学部 生体機能化学研究室）

### 【背景および目的】

ラン科セッコク属 (*Dendrobium*) 植物は 1000 種以上が知られている非常に多様なグループである。その分布域は熱帯アジアを中心に、南はオーストラリア・ニュージーランド、北は日本・韓国、西はインド・ヒマラヤ、東はサモア・タヒチなどの太平洋域までの幅広い地域であり、生育環境は低地から高地、多雨地域から乾燥地域まで様々な環境に及んでいる。セッコク属植物は、形態学的特徴と DNA 塩基配列を用いた分子系統解析によって、大きく 2 つの分岐群（アジアクレードとオーストラリアクレード）に分かれることが明らかになっている (Yukawa *et al.* 1993)。さらに詳細な形態学的特徴から 40 節以上に分類されている。

アジアクレードの種はウェーバー線の以西（温帯アジアから熱帯アジア）を中心に分布しており、その一部の種は生薬「石斛（せっこく）」の基原植物に用いられている。生薬「石斛」は中国最古の薬学書である神農本草経に収載されており、健胃、強壯を目的に使用されている。中国の中華人民共和国薬典（2010 年版）では、「石斛」の基原植物として 4 種 (*Dendrobium catenatum*, *D. nobile*, *D. chrysotoxum*, *D. fimbriatum*) が収載されている。日本においても古くから *D. moniliforme* が健胃薬として用いられてきた。また、インドでは *D. moschatum* が耳痛の治療に用いられてきたなど、アジア各地で様々な種が広い用途で使用されている。薬用種の一部に関しては詳細な成分研究が進んでおり、有用な化合物の単離が報告されている。例えば、*D. nobile* や *D. moniliforme* から単離されているフェナントレン誘導体 Denbinobin は抗炎症作用が報告されている (Lee *et al.* 1995, Lin *et al.* 2001)。

一方、オーストラリアクレードの種はウェーバー線以東のオセアニアに分布しており、熱帯、乾燥地域に適応した多様な形態を示す。アジアクレードと比較して成分研究は進んでおらず、化合物の単離・構造決定に関する報告はほとんどない。しかしながら、伝承医薬に使われてきた民族植物学的に重要な種がある。例えば、*D. speciosum* は創傷、火傷の治療に (Wood 2006)、*D. discolor* は白癬治療に用いられてきた (Lawler 1984)。つまり、オーストラリアクレードの植物種も有用な化合物を産生している可能性が期待でき、新たな薬用資源として魅力的な植物群と考えられる。

我々は、DNA 塩基配列の分子系統解析、形態学的分類、成分プロファイリングに基づく化学的多様性および系統解析、民族植物学情報、植物エキスの活性プロパティを統合し、セッコク属植物からの潜在的薬用植物、その用途、さらに生理活性物質をスクリーニングする手法の構築を行っている。今回、各植物エキスの活性を評価するため、抗菌活性、ラジカル消去活性、一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性の測定を行った。

## 【材料および方法】

植物エキスの抽出：日本大学薬学部薬用植物園の温室で栽培している植物体 (*D. amethystoglossum*, *D. chrysotoxum*, *D. coeloglossum*, *D. crumenatum*, *D. densiflorum*, *D. discolor*, *D. fimbriatum*, *D. moschatum*, *D. nobile*, *D. smillieae*, *D. uniflorum*, *D. spectabile*) から、形成2年目以降の落葉した茎を採取した。茎を細かく細断した後、凍結乾燥を行った。乾燥した茎の約15 gをさらに細かく粉砕し、80%メタノールを300 mL加え、40°Cで30分間の超音波処理を行い、この操作を2回繰り返した。次に、溶媒を留去し、乾燥エキスを得た。乾燥エキスを50 mLの精製水に懸濁し、同体積のヘキサンで抽出した。水層はヘキサンでさらに2回抽出した。次に、回収した水層を酢酸エチル50 mLで同様に抽出した。ヘキサン画分、酢酸エチル画分、水画分はそれぞれ濃縮乾固した。

ラジカル消去活性試験：ヘキサン画分および酢酸エチル画分のエタノール溶液について、DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Free Radical) 法を用いてラジカル消去活性を測定した。96穴プレートの各ウェルに、検体 40  $\mu$ L (150, 75, 25, 5, 1  $\mu$ g/ $\mu$ L)、エタノール 100  $\mu$ L、0.5 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 15  $\mu$ L、0.5 mM DPPH エタノール溶液 40  $\mu$ L を加えて攪拌し、30 分間室温で遮光して静置後、マイクロプレートリーダーで 520 nm の吸光度を測定した (対照波長 655 nm)。ポジティブコントロールには没食子酸を用いた (30  $\mu$ M)。

NO 産生抑制試験：各画分をそれぞれ DMSO と培地の混合液に溶解し、Raw264.7 細胞における NO 産生抑制活性を Griess 法により測定した。96 穴プレートの各ウェルに、RAW264.7 細胞 (F-12HAM 培地 1.6 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/mL) を 150  $\mu$ L ずつ分注した後、検体 40  $\mu$ L (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu$ g/ $\mu$ L) を加えて 1 時間培養した (37°C 5 %CO<sub>2</sub>)。次に、各ウェルに 2  $\mu$ L/mL Lipopolysaccharide 溶液を 10  $\mu$ L 加え、16 時間培養した。培養上清 100  $\mu$ L をとり、別のプレートに移して、そこに 0.1 %ナフチルエチレンジアミン溶液と 1%スルファニルアミド溶液を 50  $\mu$ L ずつ添加した。10 分間室温で遮光して静置後、マイクロプレートリーダーで 520 nm の吸光度を測定した (対照波長 655 nm)。ポジティブコントロールには塩酸アミノグアニジンを用いた (100  $\mu$ M)。alarBlue® (BIO RAD) を用いた細胞生存率の測定を行った。

抗菌活性試験：各画分のエタノール溶液を用いて、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白癬菌 (*Trichophyton rubrum*) に対する抗菌活性をディスク法による発育阻止円の測定により評価した。まず、*S. aureus* (NITE NBRC13276株) をミュラーヒントンE寒天培地 (シスメティック・ピオメリュー) に植菌して37°Cで24時間培養した。翌日、*S. aureus*のコロニーをかきとり、滅菌生理食塩水に混濁させ、マクファーランド標準懸濁液No.0.5と同様の濁度に調製した。次に混濁した菌液を新たなミュラーヒントンE寒天培地に滅菌綿棒を用いて植菌した。2 mgの植物エキスを浸み込ませたペーパーディスク (直径6 mm) を植菌した

プレート上に置き、37°Cで24時間培養した。翌日、ノギスを用いて阻止円の直径を測定した。ポジティブコントロールにはヒノキチオール (50 µg/disc) とエリスロマイシン (15 µg/disc) を用いた。 *T. rubrum* (NITE NBRC9185) に関しては、30°Cで7日間培養を行った。ポジティブコントロールにはヒノキチオール (50 µg/disc) とミコナゾール (0.5 µg/disc) を用いた。

### 【結果および考察】

ラジカル消去活性はほとんどの種において、ヘキサン画分よりも酢酸エチル画分の方が高い活性を示した(図1および図2)。酢酸エチル画分のラジカル消去活性を種間で比較すると、 *D. amethystoglossum*、生薬「石斛」の基原植物の *D. chrysotoxum*、 *D. uniflorum* は高い活性を示した。

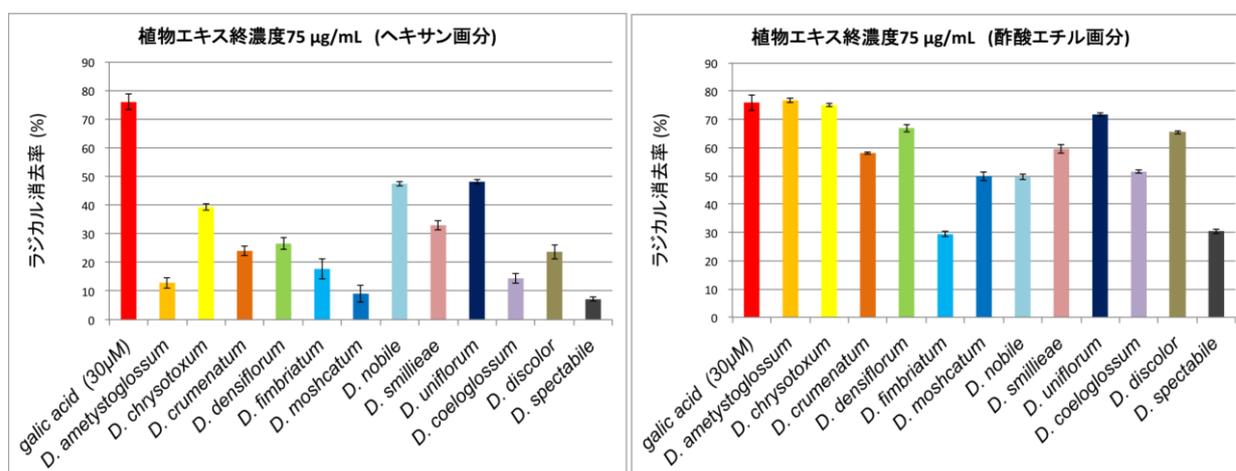


図1 ヘキサン画分のラジカル消去活性

図2 酢酸エチル画分のラジカル消去活性

NO 産生抑制活性もほとんどの種において、ヘキサン画分よりも酢酸エチル画分の方が高い活性を示した。酢酸エチル画分の NO 産生抑制活性を種間で比較すると、 *D. discolor*、 *D. amethystoglossum*、 *D. coeloglossum* が高い活性を示した。

抗菌活性試験の結果を種間で比較すると、阻止円の直径は種間、および同一種の各画分の間で異なっていた(図3)。また、同一画分においても、それぞれの微生物の感受性は異なっていた。オーストラリアで白癬治療に用いられていた *D. discolor* の酢酸エチル画分を 2 mg 添加したペーパーディスクの周りには阻止円が観察された。その他にも、石斛の基原植物である *D. densiflorum* (図3) および *D. chrysotoxum* の酢酸エチル画分を用いた場合にも阻止円が観察された。 *D. densiflorum* および *D. chrysotoxum* は同じ節 (section *Densiflora*) に属する近縁種であり、酢酸エチル画分の HPLC プロファイルと比較したところ、共通の HPLC ピークが3つ検出された。 *D. discolor*、 *D. densiflorum* および *D. chrysotoxum* の酢酸

エチル画分は *S. aureus* に対しては抗菌作用を示さなかった。

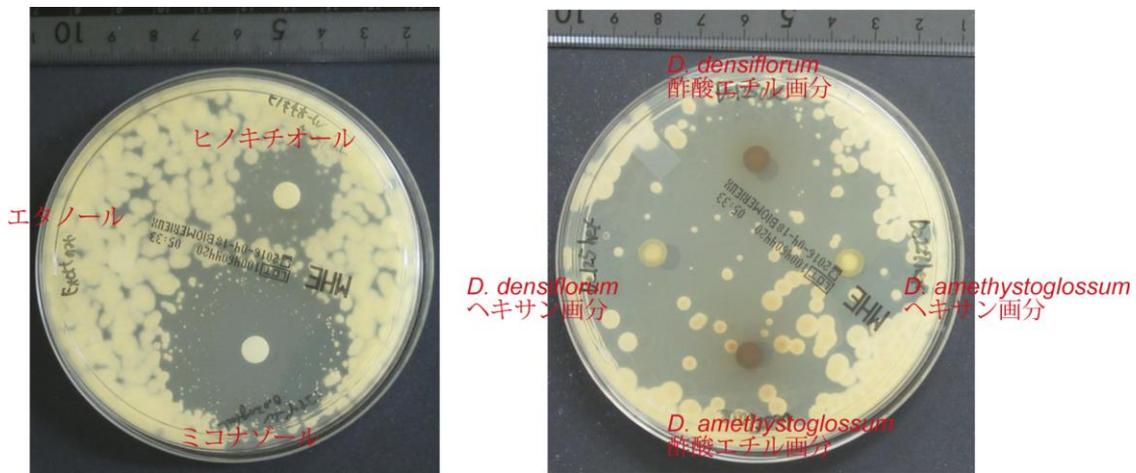


図3 *T. rubrum* に対する抗菌活性の測定 (ディスク法)

高いラジカル消去活性およびNO産生抑制活性を示した *D. amethystoglossum* の薬用利用に関する情報はない。このような潜在的薬用資源と期待される植物種はその近縁種も含めて、植物資源としての可能性を調査していく。また、12種24画分のHPLCプロファイルを活用し、高い活性値を示したグループに共通の成分ピークを特定し、化合物の単離・構造決定、さらに活性測定を行う予定である。

本研究の一部は、平成27年度萌芽探究型研究助成金の支援により行われた。

本研究の成果は下記の学会で発表を行った。

1. ラン科セッコク属植物エキスの抗炎症活性評価. 高宮知子<sup>1</sup>, 清水玲子<sup>1</sup>, 菊地泰平<sup>1</sup>, 吉野桂一<sup>1</sup>, 町田智美<sup>1</sup>, 曾根麻友美<sup>1</sup>, 藤原有紀子<sup>1</sup>, 松本亮平<sup>1</sup>, 蔣文君<sup>1</sup>, 北中進<sup>1</sup>, 遊川知久<sup>2</sup>, 飯島洋<sup>1</sup> <sup>1</sup>日本大・薬, <sup>2</sup>国立科学博物館筑波実験植物園  
日本薬学会第136年会, 横浜, 2016年3月28日
2. ラン科セッコク属植物エキスの微生物に対する影響の評価. 菊地泰平<sup>1</sup>, 清水玲子<sup>1</sup>, 吉野桂一<sup>1</sup>, 宮本智弘<sup>1</sup>, 横山史歩<sup>1</sup>, 蔣文君<sup>1</sup>, 北中進<sup>1</sup>, 鈴木和浩<sup>2</sup>, 遊川知久<sup>2</sup>, 飯島洋<sup>1</sup>, 高宮知子<sup>1</sup> <sup>1</sup>日本大・薬, <sup>2</sup>国立科学博物館筑波実験植物園  
日本植物園協会第51回大会, 長野県白馬五竜, 2016年6月17日

【引用文献】

Lawler L., 'Ethonobotany of the Orchidaceae', In 'Orchid Biology: Reviews and Perspectives, III', Eds. J. Arditti, Cornell University Press, Ithaca, 1984, 27-149.

Lee Y. H. *et al.*, In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med.*, 1995, 61, 178-180.

Lin T. H. *et al.*, Two phenanthraquinone from *Dendrobium moniliforme*. *J. Nat. Prod.*, 2001, 64, 1084-1086.

Wood P. H., 'The Dendrobium', A.R.G. Gantner Verlag Ruggell, Liechtenstein, 2006.

Yukawa T. *et al.*, Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae). *Lindleyana*, 1993, 8, 211-221.