

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	敖 常偉 (オー チンウェイ)
題 目	薬用植物由来の抗酸化、抗菌及び抗炎症活性物質に関する研究 [Studies on antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory active compounds from medicinal plants]
<p>研究で用いた3種類の中国産漢方薬と13種類の沖縄県産薬草については抗炎症、抗腫瘍、抗関節炎等の活性を有することが報告されている。しかし、それら薬草の活性成分や何故活性を示すかについてはまだ解明されていない。Cyclooxygenase (COX), Collagenase 3 (MMP-13) 及び Hyaluronidase の阻害活性は薬草抽出物や化合物が有する抗炎症作用及び抗癌作用の解明のためによく使用される。本研究ではそれぞれの薬草の抗酸化、抗菌及び炎症に関連する酵素の阻害活性を評価し、活性が高い試料から有効成分を精製し、同定することを目的としている。</p> <p>3種類の漢方薬について COX 阻害活性と抗酸化活性を測定した結果、<i>S. subprostrata</i> が最も高い活性を示した。<i>S. subprostrata</i> の抽出物から活性成分として Matrine と Oxymatrine をカラムクロマトグラフィーおよび HPLC で単離精製した。Matrine の <math>IC_{50}</math> は COX-1 に対して 7.8 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>、COX-2 に対して 47 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math> を示した。Oxymatrine の <math>IC_{50}</math> は COX-1 に対しては 52.5 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>、COX-2 に対しては 102.2 <math>\mu\text{g}/\text{ml}</math> を示した。本研究は Matrine と Oxymatrine が COX の阻害活性を示す最初のレポートとなり、<i>S. subprostrata</i> の民間抗炎症薬剤として利用されている事実を科学的に解明した。</p> <p>13種類の沖縄産薬草について MMP-13 阻害活性と抗酸化活性を測定した結果、秋ウコン、春ウコンおよびバジルのメタノール抽出物には強い MMP-13 阻害活性を有する成分があることが確認された。これらの薬草の抽出物中に Curcumin と Rosmarinic acid が含まれることを LC-MS で同定及び定量した。Curcumin と Rosmarinic acid は強い MMP-13 阻害活性を示し、それぞれ <math>IC_{50}</math> が 3.6 および 2.9 <math>\mu\text{M}</math> の活性を示した。また、ガジュマルの抽出物は抗酸化活性が最も高いことを明らかにした。これら粗抽出物はヘキサン、酢酸エチル、ブタノールを用いて分離し、酢酸エチル画分は他の画分よりすべて抗酸化、抗菌活性及びポリフェノール含有量が高いことがわかった。GC-MS と HPLC を用いて、酢酸エチル画分中に 12種類のフェノール物質を同定した。さらに、樹皮の抽出物は Hyaluronidase 阻害活性を示し、前に述べた方法で画分すると、酢酸エチル画分は最も強い Hyaluronidase 阻害活性を示した。Sephadex LH-20 コラムクロマトグラフィー及び分取 HPLC を用いて、酢酸エチル画分から Protocatechuic acid、Chlorogenic acid、Methyl chlorogenate、Catechin、Epicatechin、Procyanidin B1 及び Procyanidin B3 を単離精製し、ESI-MS、<math>^1\text{H-NMR}</math>、および <math>^{13}\text{C-NMR}</math> で分子構造を解析した。Protocatechuic acid と Catechin を除く他の成分は初めてガジュマル成分中に存在することが報告された。精製された化合物は全て強い抗酸化活性を示し、Methyl chlorogenate、Catechin、Epicatechin、Procyanidin B1 及び Procyanidin B3 は高い Hyaluronidase 阻害活性を示すことを明らかにした。</p> <p>これらの結果から、本研究は沖縄県産の薬草中には強い生物活性を示す植物成分があるという新たな情報を与えるものである。また、ガジュマルからの抽出物には強い抗酸化、抗炎症および抗菌物質を示す有効かつ安全な資源として機能性食品および製薬業界で将来利用可能であることを示唆している。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	CHANGWEIAO
題 目	Studies on antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory active compounds from medicinal plants [薬用植物由来の抗酸化、抗菌及び抗炎症活性物質に関する研究]

Three Chinese and thirteen Okinawa traditional medicinal plants were selected in this study for their commonly using on anticancer, anti-arthritis, and anti-inflammatory purposes. However, the mechanisms of diseases treatment and active components of most these plants have not been clearly elucidated yet. Inhibitory activities against cyclooxygenase (COX), collagenase 3 (MMP-13) and hyaluronidase are often used to evaluate anti-tumor and anti-inflammatory abilities of some plant extracts or compounds. The anti-oxidative activity has been confirmed contributing kinds of cancer and inflammatory preventions for its multiple functional roles. The objectives of this study were to evaluate the inflammatory related enzymes inhibitory and antioxidant activities of the selected herbs and some active compounds were identified or purified by activity-guide methods.

*S. subprostrata* showed the highest COX inhibitory and antioxidant activities among three Chinese herbs, therefore it was selected for further isolating bioactive compounds. Two alkaloids matrine and oxymatrine were isolated and identified from aerial portion of *S. subprostrata*. The  $IC_{50}$  of matrine against COX-1 and COX-2 were 7.8 and 47  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, while oxymatrine exhibited 52.5 and 102.2  $\mu\text{g/ml}$  values. This was the first report on COX inhibitory activity of matrine and oxymatrine *in vitro*, and it may provides certain scientific supports for the medicinal use of these two compounds from *S. subprostrata* for inflammatory disorders.

As results of screening MMP-13 inhibitory and antioxidant activities in Okinawa herbs, *Curcuma longa*, *Ocimum basilicum* and *Curcuma aromatica* extracts showed high inhibitory effect on MMP-13, with  $IC_{50}$  values of 27.8, 81.7 and 85.8  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The chemical compositions of these three plant extracts were analyzed by LC-MS. Curcumin and rosmarinic acid were identified and quantified in extracts of *C. longa*, *C. aromatica*, and *O. basilicum*. Both Curcumin and rosmarinic acid exhibited high MMP-13 inhibitory activity with  $IC_{50}$  of 3.6 and 2.9  $\mu\text{M}$ , respectively. On the other hand, *Ficus microcarpa* exerted the strongest antioxidant activity in the thirteen plants, so it was selected for further separation. The high antioxidant and antibacterial activities were found in ethyl acetate fraction of *F. microcarpa* bark and aerial root extracts. Twelve phenolic compounds were identified in this fraction through GC-MS and HPLC analyses. Methanol extract of *F. microcarpa* bark also showed potential inhibitory activity against hyaluronidase. Activity-guided further purification was performed by repeated Sephadex LH-20 column and preparative HPLC. Seven compounds were isolated and identified as protocatechuic acid, chlorogenic acid, methyl chlorogenate, catechin, epicatechin, procyanidin B1 and procyanidin B3 by analysis of ESI/MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR. Except protocatechuic acid and catechin, other five compounds were reported for the first time in *F. microcarpa*. All isolated compounds showed strong antioxidant activity when tested by three different methods. Catechin, epicatechin, procyanidin B1 and procyanidin B3 exhibited excellent inhibitory activity against hyaluronidase.

In summary, the results provided certainly pharmacological explanation of using *C. longa*, *C. aromatica*, *O. basilicum* and *F. microcarpa* in the folk medicine of Ryukyu Islands. The findings suggested that the extract of *F. microcarpa* might be utilized as potential source of natural antioxidant, antibacterial and hyaluronidase inhibitor in functional food industry.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	CHANGWEI AO
審査委員	主査 琉球 大学 多和田 真吉
	副査 琉球 大学 田幸 正邦
	副査 鹿児島 大学 菅沼 俊彦
	副査 琉球 大学 安田 正昭
	副査 佐賀 大学 神田 康三
審査協力者	
題 目	<p>Studies on antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory active compounds from medicinal plants (薬用植物由来の抗酸化、抗菌及び抗炎症活性物質に関する研究)</p>
<p>ある種の中国産薬草と沖縄産薬草については抗炎症、抗腫瘍、抗関節炎等の活性を有することが報告されているが、それら薬草の活性成分や何故活性を示すかについてはまだ解明されていない。Cyclooxygenase (COX), Collagenase 3 (MMP-13) 及び Hyaluronidase 等の酵素阻害活性は薬草抽出物や化合物が有する抗炎症作用及び抗がん作用の解明のために良く使用される。それぞれの薬草の抗酸化、抗菌及び炎症に関連する酵素の阻害活性を評価し、活性が高い試料から有効成分を精製し、同定することによって新たな知見が得られると思われる。</p> <p>本研究では3種類の漢方薬についてCOX阻害活性と抗酸化活性を測定した結果、<i>Sophora subprostrata</i> が最も高い活性を示した。<i>S. subprostrata</i> の抽出物から活性成分として Matrine と Oxymatrine をカラムクロマトグラフィーおよび HPLC で単離精製した。Matrine の IC<sub>50</sub> は COX-1 に対して 7.8 µg/ml、COX-2 に対して 47 µg/ml を示した。Oxymatrine の IC<sub>50</sub> は COX-1 に対しては 52.5 µg/ml、COX-2 に対しては 102.2 µg/ml を示した。本研究は Matrine</p>	

と Oxymatrine が COX の阻害活性を示す最初のレポートとなり、*S. subprostrata* の民間抗炎症薬剤として利用されている事実を科学的に解明した。

また、13 種類の沖縄産薬草について MMP-13 阻害活性と抗酸化活性を測定した結果、秋ウコン、春ウコンおよびバジルのメタノール抽出物には強い MMP-13 阻害活性を有する成分があることが確認された。これらの薬草の抽出物中に Curcumin と Rosmarinic acid が含まれることを LC-MS で同定及び定量した。Curcumin と Rosmarinic acid は強い MMP-13 阻害活性を示し、それぞれ IC<sub>50</sub> が 3.6 および 2.9  $\mu$ M の活性を示した。さらに、ガジュマルの抽出物は抗酸化活性が最も高いことを明らかにした。GC-MS と HPLC を用いて、酢酸エチル画分中に 12 種類のフェノール物質を同定した。樹皮の抽出物は強い Hyaluronidase 阻害活性を示したので、Sephadex LH-20 コラムクロマトグラフィー及び分取 HPLC を用いて分析した。Protocatechuic acid、Chlorogenic acid、Methyl chlorogenate、Catechin、Epicatechin、Procyanidin B1 及び Procyanidin B3 を単離精製し、ESI-MS、<sup>1</sup>H-NMR、および <sup>13</sup>C-NMR で分子構造を解析した。精製された化合物は全て強い抗酸化活性を示し、Catechin、Epicatechin、Procyanidin B1 及び Procyanidin B3 は高い Hyaluronidase 阻害活性を示すことを明らかにした。

以上のように、本論文は沖縄県産の薬草中には強い生物活性を示す植物成分があるという新たな情報を与えるものである。これらの成果はガジュマルからの抽出物には強い抗酸化、抗菌及び抗炎症活性を示す有効かつ安全な資源として機能性食品および製薬業界で将来利用可能であることを示唆しており、従って、学位論文として十分な価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	CHANGWEI 'AO
審査委員	主査 琉球 大学 多和田 真吉
	副査 琉球 大学 田幸 正邦
	副査 鹿児島 大学 菅沼 俊彦
	副査 琉球 大学 安田 正昭
	副査 佐賀 大学 神田 康三
審査協力者	
実施年月日	平成21年1月22日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成21年1月22日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	CHANGWEI AO
-------------	-------------

[質問 1] ガジュマルを食品産業で利用する際、目的物の収量や採取法を考慮すると、どの部位が効率的で有用であると考えていますか。

[回答 1] ガジュマルの樹皮と気根の抽出物は抗酸化及び抗菌活性が高く、それらの活性物質である catechin, epicatechin, procyanidin の含有量も多いため、樹皮及び気根等の部位が産業化には有用であると考えております。また、ガジュマルの分布面積は広範にわたり、世界中で生育しているため、今後、その食品産業への有効利用が期待されます。

[質問 2] 中国にガジュマルを原料とした食品はありますか。

[回答 2] 私の知る限りでは、これまで、中国において、ガジュマルが食品原料として使用された報告は無いと考えておりますが、しかし、琉球大学農学部の仲間先生の研究報告によると、沖縄県では、沖縄そばのニガリとしてガジュマルの木炭が使用されております。哺乳類ではございませんが、ガジュマルの果実は鳥類や昆虫などの節足動物の餌となっています。

[質問 3] ガジュマルが薬草として用いられる場合にはお湯で煎じて飲用されます。今回のメタノールで抽出した有効成分とどの程度一致すると考えていますか。また、ガジュマルの薬草としての有効成分は何ですか。

[回答 3] ガジュマルのメタノール抽出物とお湯の抽出物を HPLC で定性・定量したところ、両方の主な有効成分である catechin, epicatechin, chlorogenic acid などの含有量は、ほとんど同程度です。しかし、熱湯抽出物は、不純物や糖質も多く含まれ、有効成分の精製は困難だと思われまます。また、ガジュマル中の catechin, epicatechin, chlorogenic acid の抗酸化活性や抗菌活性は強く、これらの化合物が有効成分であろうと考えています。

[質問 4] 植物のメタノール抽出物を動物実験に用いた場合、有効成分が含まれていたとしても、体内に吸収されず、効果がない場合がありますが、今回精製したヒアルロニダーゼ阻害剤は体内に吸収されますか。

[回答 4] 私は、動物実験をするには至っておりませんので、ヒアルロニダーゼ阻害剤の生体内でのその動態に関するデータは得られておりません。

[質問 5] また、ヒアルロニダーゼ阻害剤が投与された動物実験に関する報告はありますか。

[回答 5] 現在、私の主な研究目的は化合物の精製であるため、ヒアルロニダーゼ阻害剤が投与された動物実験に関する資料はまだ集めておりませんが、抗アレルギー薬の開発に関する研究では動物実験が不可欠であり、その報告も多数存在しております。

[質問 6] 応用する業種を絞らないと、後々、研究開発が行き詰まる場合が多いのですが、あなたの研究目的は何ですか。どんな業種に応用する事を目的とした研究ですか。

[回答 6] 本研究の目的は、基礎研究であり、主に薬用植物の活性成分を調査し、活性成分の精製・同定とその薬効を解明することです。また、植物由来の抗酸化、抗菌剤を開発し、その研究結果を用いて、食品、化粧品などの業種に応用したいです。

[質問 7] 新規化合物を発見しましたか。

[回答 7] 私が、同定した化合物には新規化合物はありませんでした。研究期間も短く、新規化合物を発見するには、分析条件の検討などを含めて、より長い時間が必要だと思われまます。今後、もっと頑張ります。

[質問 8] ガジュマルと月桃では、ヒトにとって、どちらの生物機能性が高いと考えておりますか。

[回答 8] 本研究で用いた 13 種類の薬草中には、月桃も含まれますが、両方の抽出物の抗酸化力を比較すると、ガジュマルの方が高いです。私が在籍する研究室では、数年間月桃の成分に関する研究がなされ、月桃抽出物は、多様な生物機能性を有し、その生理活

性成分も多く解析されています。ガジュマルの生理活性に関する研究は私が初めての報告となり、今後も進めていきたいと考えております。もっとアトラクティブな活性成分を発見したいと思っています。