Osaka University Knowledge Archive

Title	生薬の消化酵素活性におよぼす影響に関する研究
Author(s)	山崎, 勝弘
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/37558
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

生薬の消化酵素活性におよぼす影響に関する研究

山　崎　勝　弘

目　　次

頁

緒　論 …… 1

第１章　生薬の酵素活性におよぼす影響 …… 3
　第１節　健胃生薬の消化酵素活性におよぼす影響 …… 3
　第２節　Blue value法の改良法によるアミラーゼ活性測定法 …… 10
　第３節　カップ法の改良法によるプロテアーゼ活性測定法 …… 13
　第４節　小　括 …… 17

第２章　生薬中に存在する酵素作用を有する物質 …… 19
　第１節　生薬中のアミラーゼの存在とその簡便検索法 …… 19
　第２節　ニンジン中のアミラーゼの抽出と精製 …… 25
　第３節　ニンジン中のアミラーゼの諸性質とアミノ酸組成 …… 30
　第４節　小　括 …… 44

第３章　生薬の品質と生薬中の酵素阻害物質 …… 45
　第１節　ケイヒについて …… 45
　第２節　サンショウについて …… 52
　第３節　ダイオウについて …… 63
　第４節　ケイヒ中の酵素阻害物質の諸性質 …… 76
　第５節　ケイヒ中の酵素阻害物質の抽出・単離 …… 86
　第６節　小　括 …… 91

第４章　ラットの消化酵素活性におよぼす生薬の影響 …… 93
　第１節　生薬のラット消化酵素活性におよぼす影響 …… 93
　第２節　^{125}I-アルブミンの消化吸収におよぼす影響 …… 98
　第３節　小　括 …… 104

総括および結論 …… 105
第1節　総　　括 …… 105
第2節　結　　論 …… 107

謝　　辞 …… 108

引用文献 …… 109

緒　論

生薬を用いた製剤は、漢方製剤に限らず、また医療用・一般用を問わず、各種剤型の医薬品として利用されている。生薬のまま用いる薬剤としては、煎剤やエキス剤などの漢方製剤、粉末のまま製剤する総合胃腸薬、ドリンクなどの滋養強壮保健薬、家庭薬、また香辛料などの食品領域にも巾広く用いられている。

近年、我国における生薬の輸入量は、生薬製剤の需要にともなって著しく増大し、国内で消費される生薬の80%を輸入に依存している。とくに、高齢化社会への移行とともに消化器系・循環器系等の慢性疾患が増加するなかで、漢方薬などの生薬製剤が注目され、1976年に漢方エキスが医療用医薬品として許可されている。生薬の需要は今後も増加が予想され、その品質確保と安定供給が望まれる。

ところで、1989年現在、我国市場に流通している一般用医薬品のうち、いわゆる胃腸薬の数はおよそ 1,800品目にものぼる[1)]。これら胃腸薬は、①おもに生薬で構成される健胃薬、②制酸剤からなる制酸薬、③整腸薬、④消化酵素で構成される消化薬、⑤上記の４薬のうちの２薬以上を混合した製剤、⑥胃腸鎮痛鎮けい薬、に大別される。しかし、実際に胃腸薬として最も多く製造・販売されているものは、⑤の混合製剤であり、製造許可を得ている品目は約 500もある。そのほとんどは消化酵素に生薬と制酸剤が配合されたものである。この処方は我国特有のものであり、欧米では消化酵素からなる消化剤と制酸剤等とは本来区別して用いられ、また生薬を酵素剤に配合することもない。

酵素の活性は、従来から種々の要因（温度、湿度、光、ｐＨ、共存物質など）によって影響をうけやすいことが知られている[2)]。これらの要因のうち、とくに制酸剤やサリチル酸、抗生物質などの合成医薬品による消化酵素への影響については多くの報告がある[3) 4) 5)]。一方、配合生薬が消化酵素におよぼす影響についてはほとんど明らかにされていない。加えて、生薬は原植物、

産地、採取時期、用部、保存期間・方法、調製・加工方法等の違いにより差があり、これが酵素にどのような影響を与えるかについても判っていない。

さらに、これらの生薬を服用した場合、生体内でまず最初に出会う酵素は消化酵素であるが、生薬を含む散剤や粉末が胃あるいは腸に存在する生体中の消化酵素にどのような影響をおよぼしているかは一切不明である。生薬を投与した際の、消化酵素による食物の消化・吸収速度の変動等について *in vivo* による検討法を確立する必要がある。

そこで本研究では、種々の生薬を消化酵素に作用させ、その影響を公定法およびその他の方法を用いて *in vitro* で検討し、酵素活性を阻害する生薬ならびに酵素作用を有する生薬の存在を確認するとともに、生薬による生体内酵素への影響をシロネズミを用いて *in vivo* で検討を行い、いくつかの新たな知見を得たので以下に詳述する。

第１章　生薬の酵素活性におよぼす影響

胃腸薬のうち、消化酵素に生薬および制酸剤を配合したものは一般に総合胃腸薬と称される。

消化酵素剤の効力試験としては、日本薬局方収載の含糖ペプシン、ジアスターゼ、パンクレアチン等について消化力試験法が記載されているが、これらの試験法では局方品としての最低基準を満たしているか否かの判定をする程度にとどまっている。また、1980年に公定法として厚生省から「胃腸薬製造承認基準」[6]が公布され、その中の「胃腸薬の制酸力及びｐＨの試験法並びに消化酵素の消化力を測定する試験法について」[7]（統一試験法ともよばれる）の項において種々の消化酵素の活性測定法が示された。しかし、これらの試験法には操作が煩雑であったり配合生薬による測定値の妨害などの問題点もあり、他の試験法との比較検討の必要性が予想された。

そこで、これらの生薬に配合されることが多い消化酵素に対する影響を *in vitro* で検討した。また、生薬中の種々の成分による影響を受けにくい方法についても検討を行った。

第１節　健胃生薬の消化酵素活性におよぼす影響

一般の総合胃腸薬の場合、消化酵素に数種類から十数種類の生薬が配合されるのが普通であるが、それらの生薬が各種酵素の作用（でんぷん、たん白、脂肪、せんい素の各消化作用）にどのような影響をおよぼすかを総合的に検討する必要がある。また、同一酵素作用でもその起源によって受ける影響に差異があることも考えられた。さらに、同一生薬であっても、産地・品質によって活性に与える影響が異なる可能性もある。そこで、消化酵素としてジアスターゼ（植物由来）、ビオジアスターゼ（微生物由来）、パンクレアチ

ン（動物由来）の３酵素を用いて、胃腸薬に配合されることが比較的多い健胃生薬を作用させ、活性値の変動の有無を検討した。

材料および方法

1　実験材料

生薬：供試した生薬はゲンチアナ（北海道、パキスタン、四川産）、リュウタン（遼寧、貴州産）、センブリ（長野産）、ニガキ（香川産）、クジン（北朝鮮産）、オウバク（北海道、中国東北産）、オウレン（鳥取、湖北、四川産）、ケイヒ（広南、広西、ベトナム産）、サンショウ（兵庫、奈良、中国、韓国産）、ウイキョウ（長野、河北産）、ショウキョウ（雲南産）、チョウジ（マダガスカル、ブラジル、ザンジバル産）、ダイウイキョウ（広西産）、シュクシャ（タイ産）、カンゾウ（中国東北、中国西北、アフガニスタン産）、コンズランゴ（エクアドル産）、ニンジン（長野産）、ダイオウ（甘粛、四川、北海道産）の１８種類３６試料で、主として局方品に供されるものを用いたが、犬山椒（韓国産）など一般には使用されない生薬についても、局方品に対する比較検討のため用いた。また、品質、産地等による酵素活性への影響の差が比較的認められた生薬については、産地の異なる２～４種類の試料を、差がほとんど認められない生薬については１試料のみを用いた。なお、四川省のゲンチアナは蓁艽（ジンギョウ）で *Gentian macrophylla*を基原とするものである。各試料はすべて粉末にしたのち、300 μm の篩を通して粒度を均一にした。

酵素：胃腸薬に繁用されるジアスターゼ（大麦由来）、ビオジアスターゼ 2,000（*Aspergillus oryzae* 由来）、パンクレアチン（ウシ膵臓由来）を用いた。

2　酵素活性の測定

各酵素の活性測定法は、酵素製剤の力価検定法として現在一般に用いられている統一試験法（胃腸薬製造承認基準[6]中の消化力試験法[7]）を準用した。

消化力試験は、でんぷん糖化力、でんぷん糊精化力、たん白消化力、脂肪消化力、せんい素糖化力について行った。各酵素溶液の濃度は、活性値の増加が酵素濃度に比例する範囲内とした。すなわち、でんぷん糖化力測定用ジアスターゼ溶液およびせんい素糖化力測定用ビオジアスターゼ溶液は 0.1%、でんぷん糖化力測定用ビオジアスターゼ溶液は 0.005%、でんぷん糊精化力測定用ビオジアスターゼ溶液は 0.003%、たん白消化力測定用ビオジアスターゼ溶液は 0.2%、脂肪消化力測定用パンクレアチン溶液は 1.0%、その他の酵素活性測定時の溶液の濃度は0.05%に設定した。また、反応液のｐＨは各酵素の至適ｐＨ付近で行った。すなわち、ジアスターゼおよびビオジアスターゼのでんぷん消化力はpH 5.0、パンクレアチンのでんぷん消化力は pH 7.0、ビオジアスターゼのたん白消化力はpH 3.0、パンクレアチンのたん白消化力はpH 8.5、パンクレアチンの脂肪消化力はpH 8.0、ビオジアスターゼのせんい素糖化力はpH 4.5でそれぞれ行った。生薬の添加量は、パンクレアチンの脂肪消化力の場合10mg、ビオジアスターゼのせんい素糖化力の場合１mg、他は５mgに統一して行った。なお、各生薬は酵素溶液１mlに添加し５分間放置後基質液を加え酵素反応を行った。

結　果

胃腸薬に配合されることが多い18種36試料の健胃生薬を用いて、ジアスターゼ、ビオジアスターゼおよびパンクレアチンの各消化作用への影響を検討した。結果をTable １に示した。

各酵素のでんぷん糖化力を比較すると、一般にパンクレアチンはこれらの生薬による影響を受けやすいことが認められた。とくにゲンチアナ、リュウタン、ケイヒ、サンショウ（犬山椒を除く）、ショウキョウ、ダイウイキョウ、シュクシャ、ダイオウ等ではパンクレアチンのでんぷん糖化力が１～22%にまで低下した。ジアスターゼでもケイヒ、サンショウ（犬山椒を除く）、チョウジ、ダイウイキョウなどで比較的強い抑制が認められた。しかし、ビ

Table 1. Effects of Stomachic Crude Drugs

Sample		Activity tested	Starch saccharifying		
		Enzyme source	Diastase[b1)]	Biodiastase[b2)]	Pancreatin[b3)]
Name[c)]	Place of origin	pH	5.0	5.0	7.0
Control[d)]			100	100	100
Gentian	Hokkaido		70	88	5
	Pakistan		51	73	7
(蓁艽)	China, Szechwan		66	93	11
Japanese gentian	China, Liaoning		75	89	1
	China, Kweichow		63	92	11
Swertia herb	Nagano		75	99	92
Picrasma wood	Kagawa		63	102	71
Sophora root	Korea		90	99	90
Phellodendron bark	Hokkaido		94	102	79
	China, Tungpeh		96	96	68
Coptis rhizome	Tottori		115	126	100
	China, Hupeh		96	105	51
	China, Szechwan		84	105	41
Cinnamon bark	China, Kwangnan		53	94	22
	China, Kwangsi		58	102	11
	Vietnam		43	105	20
Zanthoxylum fruit	Hyogo		58	97	6
	Nara		21	102	4
(花椒)	China		66	94	6
(犬山椒)	Korea		105	105	59
Fennel	Nagano		100	103	71
	China, Hopeh		107	102	67
Ginger	China, Yunnan		89	101	15
Clove	Madagascar		50	99	25
	Brazil		44	91	23
	Zanzibar		53	101	55
Star anise	China, Kwangsi		42	106	11
Amomum seed	Thailand		79	101	12
Glycyrrhiza	China, Tungpeh		114	108	57
	China, Sipeh		122	123	62
	Afghanistan		120	128	61
Condurango	Ecuador		105	109	55
Ginseng	Nagano		149	150	56
Rhubarb	China, Kansuh		70	104	9
	China, Szechwan		67	96	7
	Hokkaido		57	100	14

a) Enzyme activities were determined by the methods in the Experimental section.
b) The concentration of each enzyme solution was as follows: b1)0.1%, b2)0.005%, b3)0.05%,
c) Five mg/ml of crude drug were added to the enzyme solution except c1)(10 mg/ml) and c2)
d) No crude drug added.

on Various Digestive Enzymes

Residual enzyme activity(%)[a]						
Starch dextrinizing			Protein peptic		Lipid peptic	Cellulose saccharifying
Diastase[b3] 5.0	Biodiastase[b4] 5.0	Pancreatin[b3] 7.0	Biodiastase[b5] 3.0	Pancreatin[b3] 8.5	Pancreatin[b6] 8.0	Biodiastase[b1,c2] 4.5
100	100	100	100	100	100	100
95	85	19	106	99	83	77
90	78	0	60	27	69	91
101	84	4	120	96	81	90
99	84	8	90	98	87	63
95	81	0	108	93	73	67
101	90	97	98	94	89	88
102	98	76	91	94	79	93
102	100	91	103	63	119	96
104	98	84	96	47	101	105
105	102	76	97	43	90	96
109	103	98	96	81	94	96
104	100	63	104	89	98	84
102	101	50	104	68	106	88
100	98	30	101	57	66	54
97	95	10	103	52	78	46
100	100	20	99	71	67	79
97	100	5	96	29	62	70
98	105	5	97	34	70	86
100	103	4	96	83	96	83
101	103	72	100	84	86	85
104	104	98	99	101	44	96
106	105	99	96	98	37	98
104	100	51	97	94	38	82
99	91	42	120	76	39	65
83	88	36	106	53	48	56
88	83	37	98	91	51	59
92	86	24	82	48	50	69
104	100	8	94	85	55	88
108	104	101	89	63	86	77
118	108	105	96	69	79	88
116	105	100	106	57	91	102
98	105	100	94	84	81	107
122	120	96	101	96	109	108
99	101	4	94	23	51	70
97	94	1	96	20	67	61
95	100	12	100	40	74	77

b4)0.003%, b5)0.2%, b6)1.0%.
(1 mg/ml).

オジアスターゼでは活性低下はほとんど認められず、パキスタン産のゲンチアナによって73%に低下したのにとどまった。

でんぷん糊精化力については、ジアスターゼおよびビオジアスターゼの場合、活性低下はほとんど認められず、ゲンチアナ、リュウタン等によってビオジアスターゼの活性が20%に低下したにすぎない。しかし、パンクレアチンの場合、でんぷん糖化力と同様、活性低下が著しく、ゲンチアナ、リュウタン、サンショウ（犬山椒を除く）、シュクシャ、ダイオウ等で活性が20%に抑制された。しかし、カンゾウはジアスターゼとビオジアスターゼのでんぷん消化力を上昇させることも認められた。

次に、ビオジアスターゼとパンクレアチンのたん白消化作用への影響を検討した。ビオジアスターゼはパキスタン産ゲンチアナを除いてほとんど活性低下は認められなかったが、パンクレアチンの場合、パキスタン産ゲンチアナ、オウバク、ケイヒ（ベトナム産は除く）、国産サンショウ、ブラジル産チョウジ、ダイオウ等によって活性が約半分以下に抑制されることが認められた。なお、パンクレアチンの0.05%溶液に対する各生薬5mgの影響を、でんぷん糖化力と糊精化力およびたん白消化力とで検討したが、生薬の存在による活性値の変動はでんぷん糖化力と糊精化力とで著しく、たん白消化力ではやや劣ることが確認された。

パンクレアチンの脂肪消化力に対する影響を検討した結果、ウイキョウ、ショウキョウ、チョウジなどで比較的強い活性低下がみられたが、これはパンクレアチンのでんぷん消化力やたん白消化力への影響と若干異なる結果となった。また、ビオジアスターゼのせんい素糖化作用については、ケイヒ、チョウジなどで活性の抑制がみられたが、顕著な阻害は認められなかった。

なお、オウレン、カンゾウおよびニンジンはジアスターゼおよびビオジアスターゼの活性を若干賦活することが確認された。

考　察

本節で検討した酵素量と個々の生薬との比は、市販の総合胃腸薬中の配合比よりも生薬の添加量が数倍以上多い。したがって、実際の胃腸薬において、個々の生薬による酵素活性の低下はTable 1に示した数値よりも少ないものと思われる。しかし、胃腸薬に配合されている生薬の数が10数種類をこえる製剤が少なくなく、またその配合量もさまざまである。これらの健胃生薬のうち各酵素の消化作用に対してまったく影響を示さなかった生薬はわずかであり、実際に健胃生薬として配合されている生薬の全量はかなり多量になることから、活性にあたえる影響は無視できないものと思われる。したがって、胃腸薬全体を考えるとき、その製剤化にあたっては消化酵素の作用が十分に発揮できるための処方設計を行う必要がある。

胃腸薬に配合される酵素には種々の起源のものが用いられている。生薬を配合した場合、でんぷん消化作用では、ほぼ同等の比活性であっても、動物由来のパンクレアチン、植物由来のジアスターゼ、微生物由来のビオジアスターゼの順に強い阻害を受けることが認められた。なお、タカジアスターゼもビオジアスターゼとほとんど同程度の影響を受けることを確認しているが、これらの酵素以外の微生物由来の酵素についても検討を行い、配合生薬による影響を受けにくい酵素を検索することも有用である。パンクレアチンのでんぷん消化力、たん白消化力および脂肪消化力に対する生薬の影響を検討したが、活性の低下はでんぷん消化作用で著しいことから、パンクレアチン中のアミラーゼがとくに強い阻害を受けることが認められた。また、ジアスターゼはそのでんぷん糖化力で阻害が強く認められたのに対して、でんぷん糊精化力にはほとんど影響がみられなかった。これは、ジアスターゼ中のα－アミラーゼよりも主としてβ－アミラーゼのほうが抑制されやすいことによると推察された。

一方、本実験に供した生薬について、同種の生薬であっても産地、品質を異にするものでは活性にあたえる影響に差が認められる場合があった。たとえば、北海道産とパキスタン産のゲンチアナでパンクレアチンのたん白消化作用に、さらに国産と外国産のサンショウとではジアスターゼとパンクレア

チンの各作用に、それぞれ阻害効果の強弱が認められた。したがって、これらの生薬を胃腸薬に配合する場合には、活性への影響が比較的少ない材料を選択し、最も有効な条件で処方するべきである。

ところで、生薬が配合された酵素の活性測定法においては種々の妨害がみられた。でんぷん糖化力およびせんい素糖化力の測定では生薬中の還元糖の影響があり、とくにせんい素糖化力試験の場合著しいブランク値の上昇がみられ、生薬の添加量に限度があった。また、たん白消化力の測定では、チョウジのように、フォリン試薬に呈色する物質が極端に多いものではやはりブランク値が高くなり、測定値の信頼性がやや劣る結果となった。また、脂肪消化力試験でも、ダイオウのように試料中の成分のためアルカリ中で赤色を呈し、酸・アルカリ滴定の妨害となり、ｐＨメーターで終点を確認する必要が生じる場合もあった。しかし、でんぷん糊精化力試験法では、生薬添加の空試験を行う必要がなく、比較的簡便で再現性も良好であった。

第２節　Ｂｌｕｅ　ｖａｌｕｅ法の改良法によるアミラーゼ活性測定法

前節で、生薬を配合した酵素活性測定の際に種々の妨害が認められた。試験方法として、厚生省の「胃腸薬製造承認基準」[6]中の「消化力試験法」[7]を適用したが、この活性測定法のうち最も生薬成分の影響を受けにくい方法としてでんぷん糊精化力試験法がある。

また、健胃生薬による活性低下の著しい酵素作用がパンクレアチンのでんぷん消化力であったことから、でんぷん糊精化力試験法の原型といえるBlue value 法[8]を改良した方法で、極めて簡便に生薬によるでんぷん消化力に対する影響を検討した。

材料および方法

1　実験材料

生薬：第１節で用いた18種類36試料の健胃生薬を用いた。

酵素：パンクレアチン（ウシ膵臓由来）を用いた。

2　Blue value改良法によるでんぷん糊精化力測定法

原著[8]の方法を以下のように改良し、簡便に行った。また、基質はアミロースではなく溶性でんぷんを用いた。

生薬５mgを0.05％パンクレアチン溶液１ml中に加え40℃で５分間放置後、１％溶性でんぷん液（0.1N 酢酸緩衝液、pH 7.0）１ml 中に加えて振り混ぜ40℃で10分間反応後、その 0.2mlをとり、10mMヨード液（60mM　ヨウ化カリウムおよび0.01N 塩酸を含む）４mlに加えて振り混ぜ、10mMヨード液を対照として660nm での吸光度（A_T）を測定した。別に、空試験として水１mlに溶性でんぷん液１mlを加えたものについても同様の操作を行い、吸光度（A_B）を測定した。生薬を添加しないときの吸光度（A_S）から、生薬によるでんぷん糊精化力への影響を検討した。生薬による残存活性の算出は、統一試験法中のでんぷん糊精化力試験法と同様の方法で行った。

結　果

種々の健胃生薬によるパンクレアチンのでんぷん糊精化力への影響をBlue value 法を改良した方法を用いて検討した。結果をTable ２に示した。

本法を用いて酵素活性を測定したところ、ゲンチアナ（四川産を除く）、リュウタン、ベトナム産ケイヒ、奈良産サンショウ、ダイオウによって活性が10％以下に低下した。産地等の違いによって、やはり活性値に差異がみられるものもあったが、そのうちとくにオウレンでは、湖北、四川産のものが活性を抑制しているのに対して、鳥取産のオウレンでは逆に活性を上昇させた。

ニガキ、韓国産サンショウ、マダガスカル産チョウジ、カンゾウ、ニンジン等は、でんぷん糊精化力をコントロールに比べて 110％以上に上昇させた。

Table 2. Effects of Stomachic Crude Drugs on Starch Dextrinizing Activity of Pancreatin

Sample[a]	Place of origin	Residual enzyme activity(%)[b]
Control[c]		100
Gentian	Hokkaido	8
	Pakistan	3
(秦艽)	China, Szechwan	39
Japanese gentian	China, Liaoning	8
	China, Kweichow	6
Swertia herb	Nagano	100
Picrasma wood	Kagawa	114
Sophora root	Korea	98
Phellodendron bark	Hokkaido	98
	China, Tungpeh	61
Coptis rhizome	Tottori	107
	China, Hupeh	24
	China, Szechwan	37
Cinnamon bark	China, Kwangnan	15
	China, Kwangsi	16
	Vietnam	5
Zanthoxylum fruit	Hyogo	19
	Nara	9
(花椒)	China	20
(犬山椒)	Korea	110
Fennel	Nagano	105
	China, Hopeh	105
Ginger	China, Yunnan	14
Clove	Madagascar	121
	Brazil	109
	Zanzibar	91
Star anise	China, Kwangsi	21
Amomum seed	Thailand	37
Glycyrrhiza	China, Tungpeh	137
	China, Sipeh	164
	Afghanistan	170
Condurango	Ecuador	100
Ginseng	Nagano	127
Rhubarb	China, Kansuh	9
	China, Szechwan	1
	Hokkaido	0

a) Five mg/ml of crude drug were added to the enzyme solution.
b) Enzyme activities were determined by the modified Blue value method.
c) No crude drug added.

考　察

Blue value法を改良してでんぷん糊精化力試験を行ったが、原法との違いは主に基質にアミロースではなく、安価で調製しやすい溶性でんぷんを用いたことである。また、統一試験法中のでんぷん糊精化力試験法と比べても、基質が溶性でんぷんであることから面倒な調製が不必要で、また基質液や試験管の量もわずかで、迅速な操作が可能になった。さらに生薬中に含まれるでんぷんも、溶性でんぷんの濃度と比べて無視できる程度であることから、極めて簡便で実験精度の高い方法である。なお、この実験操作での吸光度A_Bの値は 1.5付近になるようにし、2.0 を超えないよう溶性でんぷん液の濃度を調製する必要があるが、市販の溶性でんぷんではおよそ１％濃度が最適であった。本法で検討した結果、でんぷん消化力におよぼす影響は第１節で検討した結果とほぼ同様の傾向が得られた。しかし、カンゾウやニンジンなどでは活性値をみかけ上、上昇させているように思われた。この原因の詳細については第２章第１節に記した。

第３節　カップ法の改良法によるプロテアーゼ活性測定法

日本薬局方パンクレアチンおよびペプシンのたん白消化力試験法と統一試験法中のたん白消化力試験では、基質をカゼインとし、プロテアーゼによって加水分解され生成したチロシン様物質をフォリン試薬で比色定量し、吸光度によって活性を算出している。いわゆるカゼイン－フォリン法である。この方法では、フォリン試薬に呈色するものすべてが妨害物質となる可能性がある。とくに生薬中にはタンニンやフェノール物質などが多く含まれ、フォリン反応陽性物質となる可能性もある。第１節においてもチョウジではとくに本試験の吸光度（A_T）が1.2～1.5 、空試験の吸光度（A_B）が 0.9～1.2にもなり、測定値の信頼性が劣る結果となった。

そこで、これら妨害物質の影響をまったく受けないカップ法を用いて、生薬によるパンクレアチンのたん白消化力に対する影響を検討した。

材料および方法

1　実験材料

生薬：第１節で用いた18種類36試料の健胃生薬を用いた。

酵素：パンクレアチン（ウシ膵臓由来）を用いた。

2　カップ法によるたん白消化力測定法

岡崎らの方法[9]を以下のように改良して行った。

Hammerstein Casein 1.8ｇを、0.05M リン酸一水素ナトリウム試液　240 mlに加温して溶かしｐＨ 8.5に調整し水を加えて300 mlとし、さらに寒天６ｇを加えて溶解した。このカゼイン寒天溶液10mlをペトリ皿に流して凝固させ、ペニシリン検定用のカップ（直径８mm）３個を等間隔に立て、再びカゼイン寒天溶液10mlを重層した。カップ内に、生薬５mgと0.25%パンクレアチン溶液0.2 mlを注入し、37℃で４時間静置したのちカップを除去し酢酸３mlを流した。未消化のカゼインは白濁し、無色の消化円を発現することから、この径を測定し、生薬無添加（コントロール）の消化円の径と比較した。コントロール群としてパンクレアチンの０，0.05，0.1，0.15，0.20,0.25%の各濃度の酵素溶液について同様の操作を行い、消化円の径と活性値との関係から、生薬添加の影響を算出した。

なお、生薬によりカゼイン培地上に菌の繁殖がみられる場合は、あらかじめ培地作成時に終濃度 0.1%になるようアジ化ナトリウムを加えた。

結　　果

種々の健胃生薬のたん白消化力におよぼす影響をカップ法を用いて検討した。その結果を Fig. 1 および Table 3 に示した。

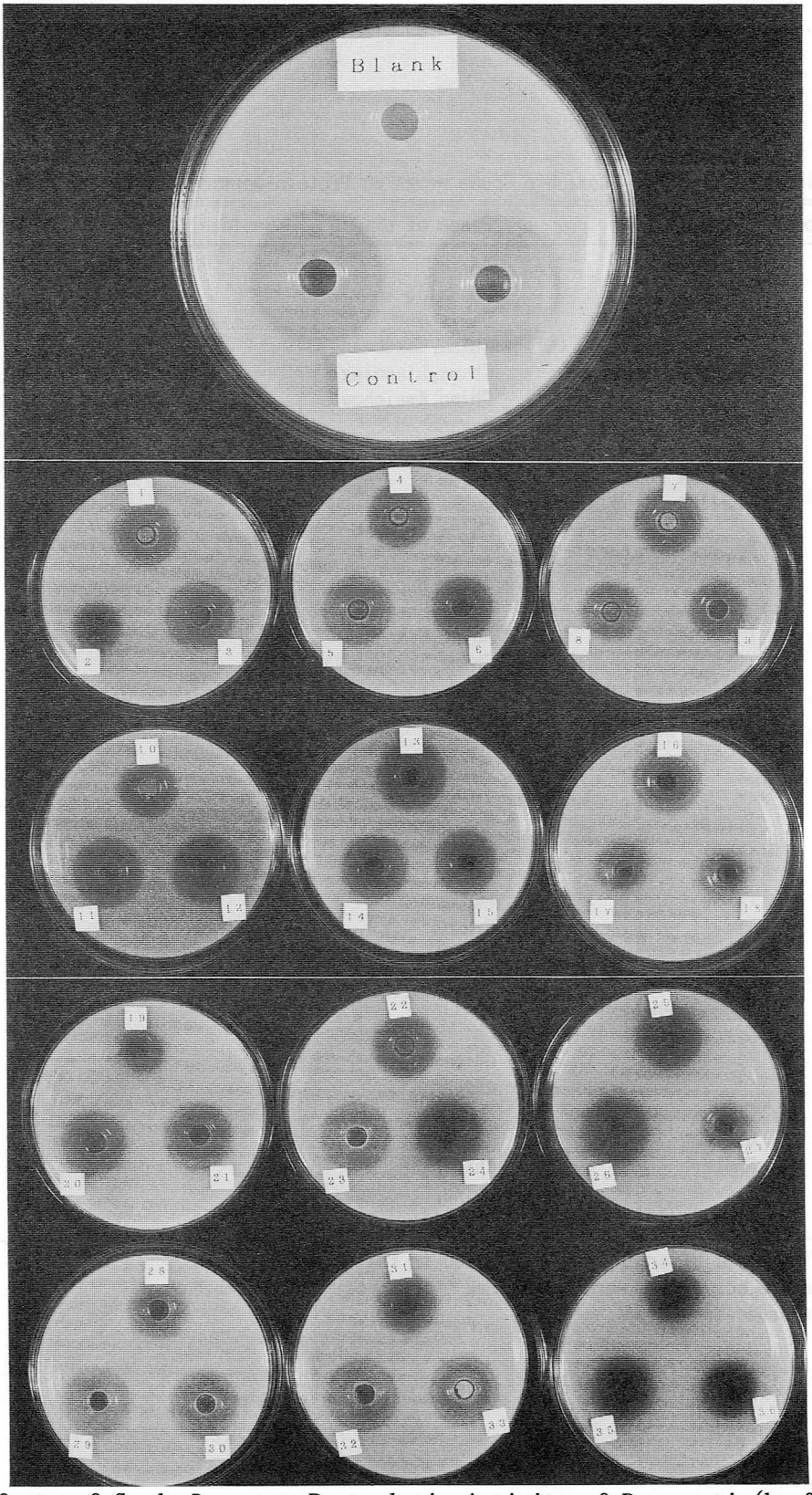

Fig. 1. Effects of Crude Drugs on Proteolytic Activity of Pancreatin(by Cup method)
Enzyme activity was determined by the method described in Experimental section.

Table 3. Effects of Stomachic Crude Drugs on Protein-peptic Activity of Pancreatin

Number	Sample[a]	Place of origin	Residual enzyme activity(%)[b]
	Control[c]		100
1	Gentian	Hokkaido	89
2		Pakistan	24
3	(秦艽)	China, Szechwan	95
4	Japanese gentian	China, Liaoning	87
5		China, Kweichow	95
6	Swertia herb	Nagano	82
7	Picrasma wood	Kagawa	95
8	Sophora root	Korea	76
9	Phellodendron bark	Hokkaido	66
10		China, Tungpeh	74
11	Coptis rhizome	Tottori	92
12		China, Hupeh	89
13		China, Szechwan	95
14	Cinnamon bark	China, Kwangnan	68
15		China, Kwangsi	63
16		Vietnam	66
17	Zanthoxylum fruit	Hyogo	42
18		Nara	47
19	(花椒)	China	63
20	(犬山椒)	Korea	84
21	Fennel	Nagano	92
22		China, Hopeh	89
23	Ginger	China, Yunnan	97
24	Clove	Madagascar	82
25		Brazil	76
26		Zanzibar	79
27	Star anise	China, Kwangsi	50
28	Amomum seed	Thailand	74
29	Glycyrrhiza	China, Tungpeh	89
30		China, Sipeh	68
31		Afghanistan	82
32	Condurango	Ecuador	97
33	Ginseng	Nagano	95
34	Rhubarb	China, Kansuh	32
35		China, Szechwan	42
36		Hokkaido	39

a) Five mg/ml of crude drug were added to the enzyme solution.
b) Enzyme activities were determined by the modified Cup method.
c) No crude drug added.

パキスタン産ゲンチアナ、日本産サンショウ、ダイオウで活性が50%以下に低下した。またリュウタン、ニガキ、オウレン、ウイキョウ、ショウキョウ、コンズランゴ、ニンジンでは活性低下はほとんど認められなかった。

考　察

健胃生薬によるたん白消化力への影響をカップ法を用いて検討した結果、第1節のカゼイン－フォリン法の場合とほぼ同様の傾向がみられることが判明した。

本実験では、酵素と生薬添加量の比（カップあたりパンクレアチン 0.5mgに対して生薬5mg）をカゼイン－フォリン法での検討と同一にし、また培地のｐＨも 8.5に調整した。

カップ法とカゼイン－フォリン法とでは、カップ法の方が操作が簡便で、得られた活性値の再現性も良好であった。カップ法の欠点としては、感度がやや低いことと酵素反応の時間がカゼイン－フォリン法の10分に対して24時間と長いことである。しかし、試料中にフォリン試薬に反応するフェノール性水酸基を多くもつ化合物の存在が予測される生薬等を含む酵素剤のプロテアーゼ活性を測定する場合、カップ法は有効な手段であると思われる。なお、このカップ法は、カゼイン寒天培地をでんぷん寒天培地に変え、ｐＨを調整することによりアミラーゼの活性試験にも用いることができる。

第４節　小　括

種々の健胃生薬の消化酵素におよぼす影響を、公定法とBlue value法およびカップ法を改良した方法を用いて検討した結果、以下のことが判明した。

(1) 繁用される消化酵素のうち、膵臓性酵素であるパンクレアチンのアミラーゼおよびプロテアーゼ活性が生薬の配合によって顕著に抑制された。

(2) ゲンチアナ、リュウタン、シュクシャ等はパンクレアチンのでんぷん消

化力を、ケイヒ、サンショウ、ダイオウ、オウバク、カンゾウ等はパンクレアチンのプロテアーゼ活性を、ウイキョウ、ショウキョウはリパーゼをそれぞれ顕著に抑制した。

(3) 同種の生薬であっても、産地等の違いによって活性にあたえる影響に差がみられる場合があった。

(4) 生薬を配合した場合の酵素活性測定法として、Blue value法およびカップ法を改良し、生薬中の妨害物質の影響を受けず、しかも簡便な方法を確立した。

第２章　生薬中に存在する酵素作用を有する物質

前章で、生薬の消化酵素活性におよぼす影響について検討したが、種々の酵素の活性が生薬によって差はあるものの、抑制を受けることが認められた。しかし、一部の生薬では見かけ上酵素活性を上昇させたことから、これらの生薬中に酵素が存在することが予測された。

植物中には、穀類・根菜類のα－アミラーゼやβ－アミラーゼ[10]、果樹のブロメライン[11]やパパイン[12]等のプロテアーゼなど、現在まで多くの酵素が分布していることが報告されているが、乾燥・加工された生薬中の酵素についての研究はなされていない。そこで、種々の生薬中のアミラーゼを検索し、そのうち高い濃度のβ－アミラーゼを含有していることを確認したニンジンについて、本酵素の抽出・精製を行い、その酵素化学的・たん白化学的諸性質について検討した。

第１節　生薬中のアミラーゼの存在とその簡便検索法

アミラーゼは、動物、植物、微生物界に広く分布している。とくに、β－アミラーゼ（1,4-α-D-glucan maltohydrolase）は多くの高等植物に含まれていることが古くから知られていたが、微生物によっても産生される[13]。大豆[14]、大麦[15]、大根[16]、甘藷[17]などに存在するβ－アミラーゼについてはすでに分離・精製がなされているが、薬用として乾燥・加熱等の加工・調製を経たのち供される生薬については、アミラーゼに関する報告は未だない。

ところで、前章で種々の健胃生薬の消化酵素活性におよぼす影響を検討し、オウレン、カンゾウ、ニンジンなどがジアスターゼの活性を若干上昇させることを認めた。これらの生薬中にアミラーゼが存在する可能性が考えられる

ことから、前章で用いた健胃生薬を中心に、まずBlue value法[8]を改良した方法を用いて、アミラーゼ活性を有する生薬のスクリーニングを行った。すなわち、生薬を基質（でんぷん）に作用させ、ヨウ素反応の色調（青色）の減少を比色で求めることによってアミラーゼ（主としてα－アミラーゼ）の有無を検討した。つぎにでんぷんからの還元糖の生成量を測定するSomogyi-Nelson法[18]を用いて、各生薬中のアミラーゼ（主としてβ－アミラーゼ）活性の値を測定し、生薬中のアミラーゼの分布を調べた。

材料および方法

1　実験材料

生薬：前報で検討した18種36試料の健胃生薬と、比較的繁用される以下の38試料を加えて用いた。イカリソウ、インチンコウ、オウギ、オウゴン、カシ、カシュウ、キキョウ、キジツ、キンギンカ、クコシ、ケイガイ、ゴバイシ、ゴミシ、サイコ、サイシン、サンシシ、サンシュユ、サンヤク、ジオウ、シコン、シソヨウ、ソウジュツ、タイソウ、タンジン、テンモンドウ、トウキ、トウジン、トチュウ、バクモンドウ、ビャクゴウ、ビャクジュツ、ブクリョウ、ボウイ、ボウフウ、ボタンピ、マオウ、モクテンリョウ、レンギョウ。

各試料生薬は、すべて粉末としたのち、300μm の篩を通して粒度を一定にした。

2　アミラーゼ活性の測定

Blue value法の変法によるアミラーゼのスクリーニング法：原著[8]の方法を以下のように改良し、簡便に、しかも微量のアミラーゼにも反応するように行った。また、基質はアミロースではなく溶性でんぷんを用いた。

生薬20mgを 0.1%溶性でんぷん液（0.1N 酢酸緩衝液、pH 5.0）10 ml中に加えて振り混ぜ40℃で１時間放置後、その１mlをとり、10 mM ヨード液（60 mMヨウ化カリウムおよび0.01N 塩酸を含む）10mlに加えて振り混ぜ、10 mM ヨード液を対照として660nm での吸光度（A_T）を測定した。別に、空試験と

して生薬を溶性でんぷん液に加えた直後の液１mlについても同様の操作を行い、吸光度（A_B）を測定した。

アミラーゼの糖化力の測定：生薬の試料溶液１mlを１％溶性でんぷん液（0.1N酢酸緩衝液，pH 5.0）１mlに加え、40℃で１時間放置後、生成還元糖の量をSomogyi-Nelson法で測定した。なお、活性単位は、１分間に１μmole のマルトースを生成する量を１unitとした。

結　果

胃腸薬に配合されることが多い18種類36試料の健胃生薬を用いて、アミラーゼの存在の有無とその力価を検討した。結果をTable ４に示した。

Blue valueの低下は、北海道産のゲンチアナ、鳥取産のオウレン、ベトナム産のケイヒ、韓国産のサンショウ、その他ウイキョウ、チョウジ、ダイウイキョウ、カンゾウに顕著にみられ、とくに、中国東北および西北産のカンゾウではA_Bに対するA_Tの比が10％前後となり、強いα－アミラーゼ作用をもつことが推察された。そこで、これらの試料中に含まれるアミラーゼの力価を測定するため、各試料 500mgをとり、0.1N酢酸緩衝液（pH 5.0）10mlに溶かし振り混ぜ、遠心分離して上澄液をとった。残渣に 0.1N 酢酸緩衝液（pH 5.0）５ml を加えて振り混ぜ、遠心分離して上澄液をとる操作を２度繰り返し、上澄液を集めて透析膜に入れ、５mMメルカプトエタノールを含む 0.1N 酢酸緩衝液（pH 5.0）に対して４℃で３日間透析した。得られた試料溶液１mlを１％溶性でんぷん液 （0.1N 酢酸緩衝液、pH 5.0）に加えて、生成還元糖の量を Somogyi-Nelson法で測定した。その結果、多くの試料中にβ－アミラーゼの存在が確認されたが、鳥取産のオウレンにアミラーゼ作用が強いのに比べ、中国産のオウレンでは活性が少なく、また、中国東北産のカンゾウにはほとんど認められないのに対して西北産およびアフガニスタン産のカンゾウに強い活性があるなど、同種の生薬でもβ－アミラーゼの含量に差が認められた。

Table 4. Blue Values and Starch Saccharifying Activities of Samples of Some Stomachic Crude Drugs

Sample Name	Place of origin	Blue value (A_T/A_B)[a]	Starch saccharifying activity(units/g)[b]
Control[c]		1.00	0.0
Gentian	Hokkaido	0.51	0.9
	Pakistan	0.99	N.D
	China, Szechwan	0.91	N.D
Japanese Gentian	China, Liaoning	0.99	N.D
	China, Kweichow	0.97	N.D
Swertia herb	Nagano	0.89	N.D
Picrasma wood	Kagawa	0.65	1.3
Sophora root	Korea	0.75	1.4
Phellodendron bark	Hokkaido	0.92	N.D
	China, Tungpeh	0.81	N.D
Coptis rhizome	Tottori	0.48	11.4
	China, Hupeh	0.87	0.9
	China, Szechwan	1.00	0.6
Cinnamon bark	China, Kwangnan	1.00	N.D
	China, Kwangsi	0.91	N.D
	Vietnam	0.42	0.7
Zanthoxylum fruit	Hyogo	0.96	N.D
	Nara	0.98	N.D
	China	1.00	N.D
	Korea	0.43	1.2
Fennel	Nagano	0.56	1.1
	China, Hopeh	0.46	1.2
Ginger	China, Yunnan	0.92	N.D
Clove	Madagascar	0.51	0.5
	Brazil	0.32	0.6
	Zanzibar	0.21	1.2
Star anise	China, Kwangsi	0.38	1.6
Amomum seed	Thailand	0.53	0.8
Glycyrrhiza	China, Tungpeh	0.11	0.3
	China, Sipeh	0.07	13.6
	Afganistan	0.24	9.9
Condurango	Ecuador	0.77	1.9
Ginseng	Nagano	0.44	167
Rhubarb	China, Kansuh	0.99	N.D
	China, Szechwan	0.99	N.D
	Hokkaido	0.99	N.D

a) Blue value was determined by the method described in the Experimental section.

b) Enzyme activity was determined by the method described in the Experimental section.

N.D. represents not detected(<0.1 unit/g).

c) No crude drug added.

Table 5. Blue Values and Starch Saccharifying Activities of Some Crude Drugs

Sample Name	Blue value (A_T/A_B) [a]	Starch saccharifying activity(units/g) [b]
Control [c]	1.00	0.0
Astragalus root	0.65	3.7
Immature orange	0.65	1.5
Lycium fruit	0.62	3.7
Jujube	0.71	1.5
Root of Salvia miltiorrhiza	0.79	3.5
Root of Asparagus cochinchinensis	0.80	2.5
Japanese angelica root	0.65	2.0
Ophiopogon tuber	0.56	1.5
Sinomenium stem	0.56	2.6
Ephedra herb	0.80	3.8

a) Blue value was determined by the method described in the Experimental section.
b) Enzyme activity was determined by the method described in the Experimental section.
N.D. represents not detected(<0.1 unit/g).
c) No crude drug added.

また、Table 4で検討した試料以外の生薬についても、アミラーゼの存在有無のスクリーニングを行った。38試料のうちBlue valueが 0.8以下になった生薬について、さらにアミラーゼの力価を測定した。結果をTable 5に示した。

Blue valueが 0.8以下となった生薬は、38試料中10試料で、そのうちオウギ、クコシ、タンジン、マオウ等で 3 units/g以上のβ－アミラーゼを含有することが確認された。

考　察

アミラーゼの活性測定法としては数種類の方法があるが、スクリーニング法に Blue value 法を改良した方法を用いた。高等植物中のアミラーゼはβ－アミラーゼであることが多く、これはでんぷんに対する糖化力（還元力）を測定することによって力価が測定できるが、アミラーゼの糖化力を測定す

る方法では、生薬中の還元糖の影響でブランク値がきわめて高くなり、測定値の信頼性が低くなる。これに対して、生薬中にはBlue valueに影響するようなでんぷんの量はごくわずかで、活性測定の妨害にはならず、再現性も良好であった。Blue value法の原法では、基質にアミロースを用いているが、アミロース溶液は低濃度で不安定で調製後老化しやすいことから[19]、調製しやすく比較的安定な溶性でんぷんを用いて、0.1% の希薄濃度に調製した。また、植物アミラーゼの至適ｐＨは、ほとんどが4.8～5.5の範囲にあることから、基質液のｐＨを5.0 に設定した。アミラーゼのスクリーニングののち、Somogyi-Nelson法で生薬中のアミラーゼの糖化力を測定したが、生薬自体が乾燥品であり低分子の糖類などの測定妨害物質を多く含んでいるため、これらを透析によって除去し、ブランク値を十分下げてから行った結果、良好な成績が得られた。

従来、高等植物中のアミラーゼは、大豆等の穀類の種子や、大根、甘藷、里芋等の根菜類の根茎に多く確認されていたが、今回の検討で、より広い範囲に分布していることが判明した。また、生薬は、収穫後、加工・調製され、長期にわたって保存されているにもかかわらず、高いアミラーゼ活性を有するものがあることが認められた。さらに、生薬は産地、保存方法、調製・加工方法などによって品質に差があることが知られている。今回検討した試料についても、同種生薬であっても産地・品質を異にするためにアミラーゼの含有量がまったく違うものが認められた。日本産と中国産のオウレンとでは調製方法が異なり[20]、アミラーゼ含量に極端な差が認められた。これは、単に調製方法の違いによるものか、それとも品質的に異なるためかは検討の余地がある。また、カンゾウについても、今回用いた３試料ともBlue valueの顕著な低下が認められたが、中国東北産のものではSomogyi-Nelson法による活性がほとんど認められなかった。

なお、これらのアミラーゼを含む健胃生薬数種を配合した総合胃腸薬では、ジアスターゼや微生物由来のアミラーゼなどの酵素の活性を相加的に数％上昇させていることが推察された。

第２節　ニンジン中のアミラーゼの抽出と精製

薬用人参（以下ニンジンと記す。）Ginseng は、漢方医学では虚症に対する補養剤として、多くの方剤に配合されている[21]。また、民間薬としても、古来より強壮、強精、さらには不老不死の高貴薬として珍重されてきた。しかし、ニンジンの薬物としての科学的研究は、その数千年にわたる伝統的評価にかかわらず甚だ遅れていたが、近年、柴田らにより、その有効成分の一部と考えられる種々のサポニン、Ginsenoside が分離、構造決定がなされた[22)23)24)]。しかし、サポニン以外の水あるいはアルコールエキス等に、多くの薬理作用があるという報告があり[25]、ニンジン中には、未だ究明されていない有効成分が多数存在するものと考えられる。

前節で、生薬のうちニンジン中に比較的高い濃度のβ－アミラーゼが存在することを確認した。そこで、日本薬局方ニンジン末を用いて、本酵素の抽出・精製を行った。

材料および方法

１　ニンジン粗抽出液の透析

日本薬局方ニンジン末20ｇを、20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）200mlでおだやかに攪拌しながら１時間抽出した。この粗抽出液を４℃で 3,000rpm、30分間遠心分離して上澄液をとり、20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）に対して、４℃で４日間透析した。

２　酵素活性の測定

でんぷん糖化力の測定：１％溶性でんぷんを含む 0.1N 酢酸緩衝液（pH 5.0）に酵素液１mlを加え、40℃で10分間反応後、生成還元糖量をSomogyi－Nelson法[18]で測定した。なお、活性単位は、１分間に１μmolのマルトースを生成する量を１単位とした。

でんぷん糊精化力の測定：１％溶性でんぷんを含む 0.1N酢酸緩衝液（pH 5.0）に酵素液１mlを加え、40℃で10分間反応後、ヨード液（10mM ヨード、60mM ヨウ化カリウムおよび0.01N塩酸を含む）４mlを加えて、水を対照とし、660nmにおける吸光度を測定し、Blue valueをもとめた。

その他の酵素力価の測定は、すべて胃腸薬製造承認基準[6]中の消化力の試験法[7]に基づいて行った。

3　ディスクゲル電気泳動

Davis らの方法[26]によって、7.5% ポリアクリルアミドゲルについて、pH 9.4の緩衝液で行った。酵素たん白は、ゲル１本当り約10μgを用い、室温で５mAの電流で１時間電気泳動を行った。

結　果

市販の局方ニンジン末を20mM酢酸緩衝液（pH 5.0）で抽出し、さらに、同じ緩衝液を用いて４℃で４日間透析した内液のアミラーゼ活性を測定したところ、高い活性が認められた。そこで、β－アミラーゼが多く含まれていることが知られている大豆、大根、里芋、甘藷を用いて、ニンジンの場合と同様に透析して、β－アミラーゼ活性を測定し比較した。その結果、Table 6 に示したように、ニンジン末中に、比較的高いアミラーゼ活性の存在が認められた。

Table 6. Comparison of Plant β-Amylase Activities

Plant	β-Amylase (units/g dry wt.)
Ginseng	170
Soybean	430
Japanese radish	2.7
Taro	350
Sweet potato	290

Amylase activity was determined by the method described in the Experimental section.

そこで、ニンジン20ｇから得た透析液を 20mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム（2.8×24 cm）に負荷し、同じ緩衝液で十分に洗浄後、塩化ナトリウムの直線濃度勾配法によって溶出した。その溶出パターンを Fig. 2 に示した。 No.35-41 の画分を集めて、再び DEAE-Sephadex A-50 で分画した。この酵素溶液を 10mM リン酸緩衝液（pH 6.0）に対して、４℃で２日間透析後半透膜に入れたまま、吸水剤としてポリエチレングリコール 20,000 を用いて５mlにまで濃縮した。これを 0.1M 塩化ナトリウムと１mMメルカプトエタノールを含む 10mM リン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化した Sephadex G-100 カラムに負荷し、同じ緩衝液で展開、溶出を行った。結果をFig. 3に示した。活性画分No.41-46を集めて水に対して４℃で一夜透析後、１mMメルカプトエタノールを含む ５mM リン酸ナトリウム緩衝液で平衡にした Hydroxyapatite カラムに負荷し、同じ緩衝液で十分に洗浄した。酵素たん白は１mMのメルカプトエタノールを含む５mMから0.2Mのリン酸緩衝液（pH 6.5）の直線濃度勾配法によって溶出した。その溶出パターンをFig. 4に示した。活性画分 No.31-48 を集めて水で透析して130 units/O.D. at 280nm の比活性を有する酵素標品が得られた。 精製過程の要約をTable 7に示した。

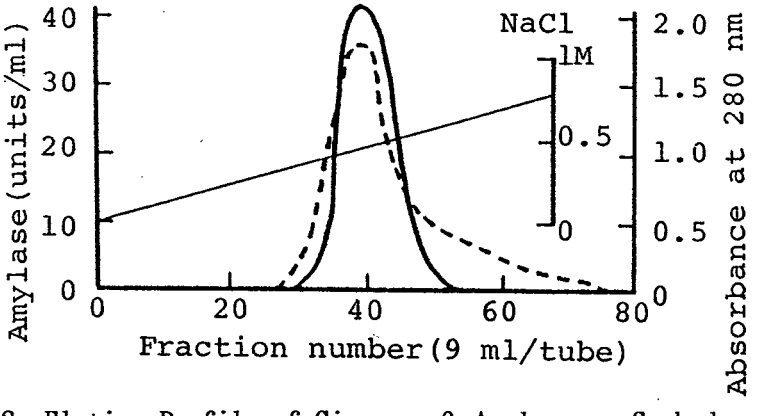

Fig. 2. Elution Profile of Ginseng β-Amylase on Sephadex A-50 Column Chromatography
—, amylase activity; ---, absorbance at 280 nm.

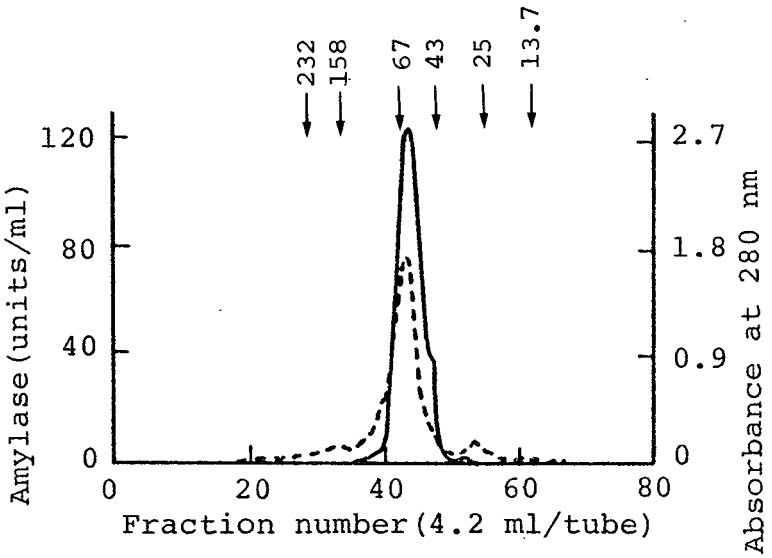

Fig. 3. Elution Profile of Ginseng β-Amylase on Sephadex G-100 Column Chromatography

—, amylase activity; ---, absorbance at 280 nm. Catalase(MW: 232 kDa), aldolase(158 kDa), BSA(67 kDa), ovalbumin(43 kDa), chymotrypsinogen A(25 kDa) and ribonuclease A(13.7 kDa) were used as molecular weight standards.

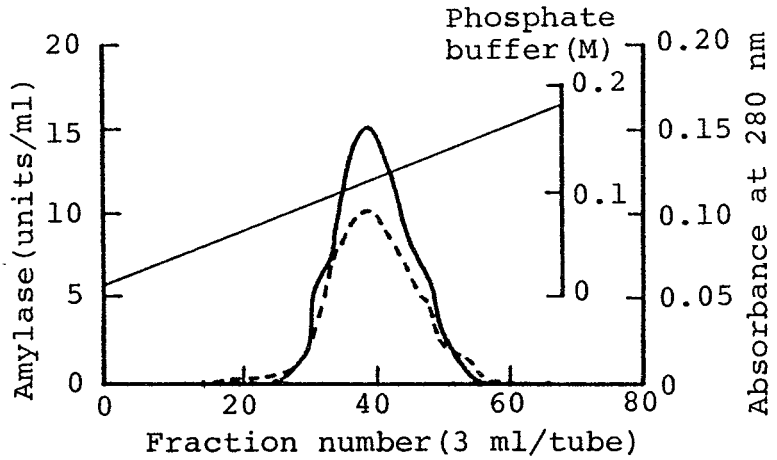

Fig. 4. Elution Profile of Ginseng β-Amylase on Hydroxyapatite Column Chromatography

—, amylase activity; ---, absorbance at 280 nm.

Table 7. Purification Procedure for Ginseng β-Amylase

Procedure	Volume (ml)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	400	5230	10.8	100
DEAE-Sephadex A-50	65	2326	22.8	44.5
DEAE-Sephadex A-50 (rechromatography)	50	1758	34.6	33.6
Sephadex G-100	25	1707	81.5	32.6
Hydroxyapatite	51	527	130	10.1

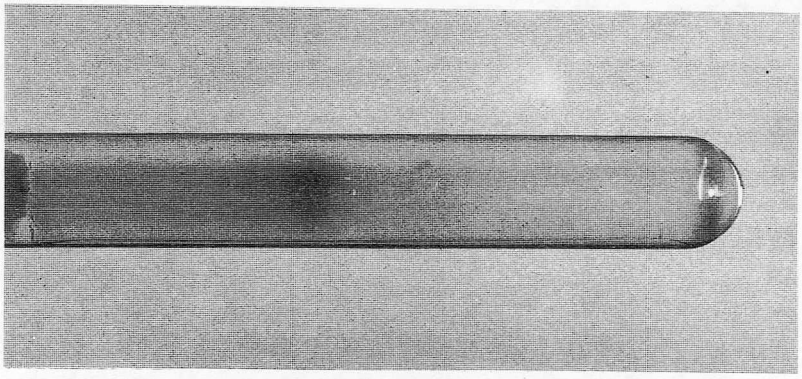

Fig. 5. Polyacrylamide Gel Electrophoresis Pattern of Ginseng β-Amylase
The purified enzyme solution (30 μl) containing 10 μg of protein was subjected to electrophoresis on a column at pH 9.4.

最終酵素標品をデイスクゲル電気泳動法で検討したところFig. 5に示したように単一バンドが得られ、この結果から、単一たん白質にまで精製されたことが確認された。以後の実験は、主としてこの精製酵素標品を用いて行った。

考　察

ニンジン中のアミラーゼの抽出および精製を行ったが、本酵素の精製過程において、硫安分画は行わず、酢酸緩衝液(pH 5.0)で抽出後すぐ透析を行った。これは、ニンジン末から酵素が同緩衝液によって 100%近く容易に抽出され、しかも、透析によってほぼ無色透明の酵素液が得られたためである。また、カラムクロマトは、DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-100、Hydroxy-apatiteの順で行ったが、著者らは DEAE-Sephadex A-50クロマトグラフィーのあと、酵素の精製に、最近よく用いられているアフィニテイクロマトグラフィーを試みた。とくに、Vretbladは、Cyclohexaamylose（α-CD） が高等植物β－アミラーゼの拮抗阻害剤となることを利用して、これをリガンドとするEpoxy-activated Sepharose 6Bカラムを用いて、容易に精製酵素を得ている[27]。 そこで、同様に、アフィニテイクロマトグラフィーを行ったが、酵素の95%以上はカラムに吸着せず、素通りした。本酵素がリガンドに吸着しなかった原因として、α-CD と酵素との親和性などが考えられるが，詳細は不明である。著者は、ゲルろ過とHydroxyapatiteを用いた吸着クロマトグラフィーを用いた結果、精製酵素を得ることができた。

第３節　ニンジン中のアミラーゼの諸性質とアミノ酸組成

第２節で得られた、ニンジン中のβ－アミラーゼの酵素化学的・たん白化学的諸性質について検討し、従来から報告されている他の高等植物のβ－アミラーゼと比較検討した。

材料および方法

１　ペーパークロマトグラフィー

ろ紙は、東洋 No.50（40×40cm）を用い、展開溶媒として n-Butanol ：Pyridine：水＝６：４：３を用いて上昇法で展開し、アルカリ性硝酸銀試薬

で糖を検出するDip法[28] を行った。

2　反応生成糖の変旋光

不破、二国の方法[29] にしたがい、５％溶性でんぷん溶液を用いて酵素と40℃で反応を行った。経時的に試料液を採取し、炭酸ナトリウムで酵素反応を停止させ、直後の旋光度および40℃で１時間放置後の旋光度を　Horiba SEPA-200を用いて測定し、その差から変旋光を求めた。

3　等電点の測定

松尾らの方法[30] にしたがい、LKB社 Electrofocusing カラム8100（110 ml容量）を用い、グリセリンで密度勾配をつくり、pH 3.5～10 の carrier Ampholitesを使用して、４℃において400V、40時間泳動を行った。１画分２mlづつ分取し、ｐＨおよび酵素活性を測定した。

4　分子量の測定

ゲルろ過　：あらかじめ、水で膨潤したSephadex G-100 を0.1M塩化ナトリウムおよび１mMメルカプトエタノールを含む 10mM リン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化後、内径２cm、高さ120cm のカラムに充塡した。つぎに、分子量既知の標準たん白 Catalase(MW:232,000)、Aldolase(158,000)、Bovine serum albumin(67,000)、 Ovalbumin(43,000)、　Chymotrypsinogen A(25,000)、Ribonuclease A(13,700)各２mg、および本酵素の混合液１mlを上記カラムに負荷し、平衡化に使用したと同組成の液で下降法によって展開、溶出を行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）：Laemmliの方法[31] で行った。なお、分離ゲルのポリアクリルアミドの濃度は10%、ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）の濃度は 0.1%になるよう調製した。また試料溶液は、0.01M トリス一塩酸緩衝液（pH 6.8）、３％ＳＤＳ、５％グリセリン、８％　２－メルカプトエタノール、　0.01% ＢＰＢ（Bromophenol Blue）を含む液とし、酵素たん白を加えたのち 100℃で５分間加熱処理し、電気泳動をおこなった。分子量の標準マーカーとして Rabbit muscle phosphorylase b(MW:97,400)、　Bovine serum albumin(66,200)、 Hen egg white albumin

(42,700)、 Bovine carbonic anhydrase(31,000)、 Soy-bean trypsin inhibitor(21,500) の各 3 μgを含む混液 5 μlをゲルに負荷し、電気泳動を行った。泳動条件は、試料が Stackingゲル中では 15mA、分離ゲル中に入ったのちは30mAの定電流で約3時間泳動を行った。たん白質の染色液は、50%メタノールおよび10%酢酸を含む 0.25% CBB (Coomassie brilliant Blue R-25) 溶液を用いたが、糖類の染色には Schiff 試薬を用いた。

5 アミノ酸分析

凍結乾燥した酵素試料各80μgを試験管にいれ、6N塩酸を加えて脱気後、減圧下で封管し110℃で 24、48、72時間加水分解を行い、生成したアミノ酸を島津 LC-3A自動アミノ酸分析計を用いて蛍光光度法で測定した。 CystineとCysteineはMoorの方法[32] にしたがい、過ギ酸酸化してCysteic acidとしたのち定量した。また、Tyrosineと Tryptophan は Goodwinと Morton の方法[33]によって、紫外部吸収測定法で行った。

6 酵素たん白中の糖の分析

中性糖：凍結乾燥した酵素試料を試験管にいれ、2N TFA (Trifluoro acetic acid) を加えて、減圧下で封管し、100°で6時間加水分解した。水解した糖はSawardeker らの方法[34] にしたがって Alditol acetates に変換し、ガスクロマトグラフィー(1% Silar 10C カラム)を行った。

アミノ糖：凍結乾燥した酵素試料を試験管にいれ、2N TFA を加えて減圧下で封管し、100℃で6時間加水分解した。生成したアミノ糖を Dowex 50W×8 のカラムに吸着させたのち、2N塩酸で溶出した。糖のN－アセチル化は、炭酸水素ナトリウムと無水酢酸を用いて行い、Sawardekerらの方法[34] にしたがって、Alditol acetatesに変換し、ガスクロマトグラフィーを行った。

結　果

1 でんぷんに対する作用

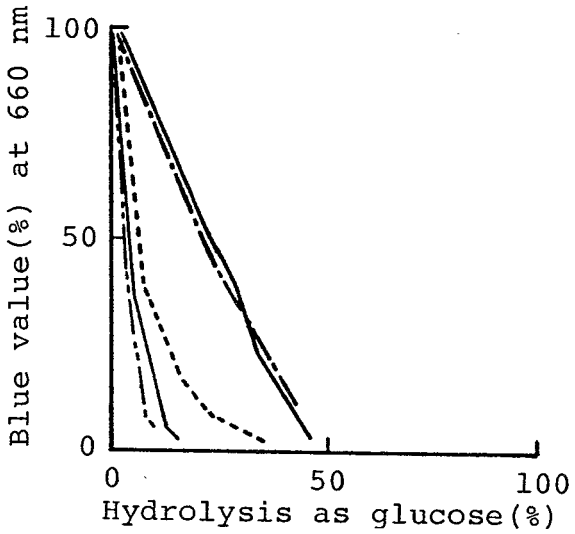

Fig. 6. Hydrolysis of Starch by Amylase from Ginseng and Other Plants
——, ginseng β-amylase; - - -, sweet potato β-amylase; ·····, taka-diastase from *Aspergillus oryzae*; ——, diastase from barley; - - - -, α-amylase from *Bacillus subtilis*.

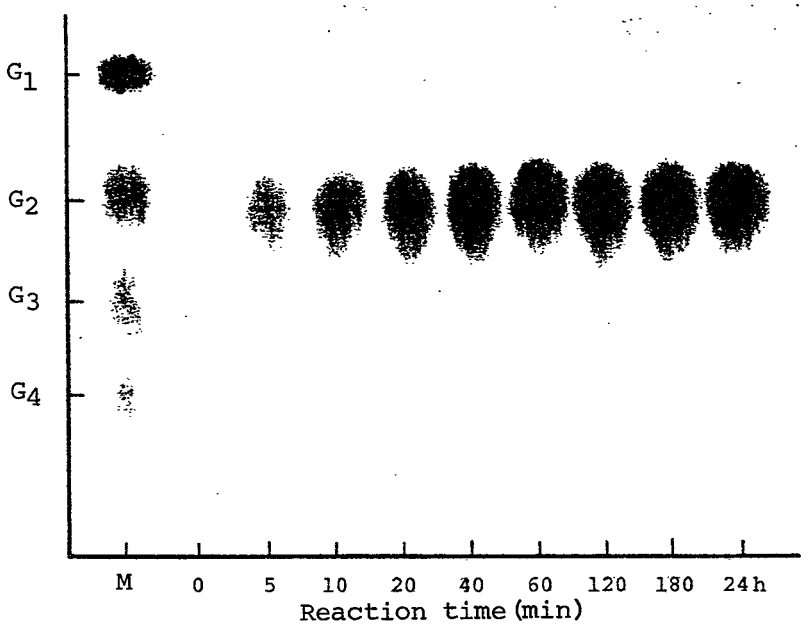

Fig. 7. Paper Chromatogram of Hydrolysis Product of Soluble Starch by Ginseng β-Amylase

50 μl of enzyme solution was added to 200 μl of 2% soluble starch containing 0.1M acetate buffer(pH 5.0), and the mixture was incubated at 40℃. At the indicated time, 10 μl of the mixture were spotted. M, Standard oligosaccharides; G_1, Glucose; G_2, Maltose; G_3, Maltotriose; G_4, Maltotetraose.

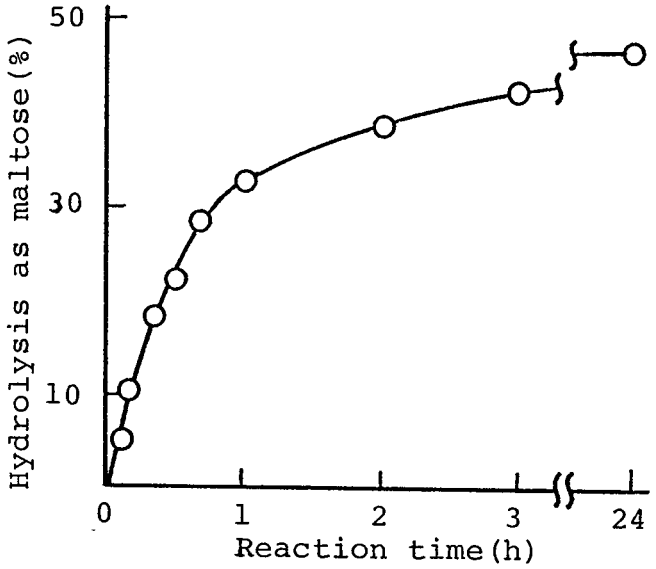

Fig. 8. Time Courses of Maltose Formation from Soluble Starch by Ginseng β-Amylase

An amount of produced sugars, shown in Fig. 7, was expressed in terms of maltose.

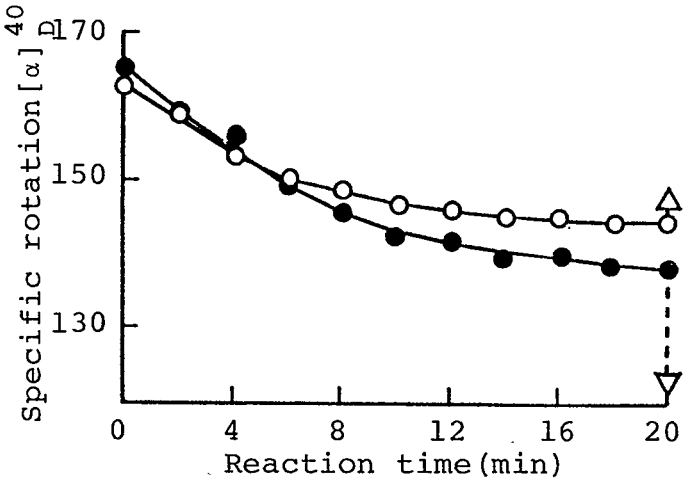

Fig. 9. Changes in Specific Rotation During Enzymatic Hydrolysis or Soluble Starch

The experimental conditions are described in Experimental section. ○, ginseng β-Amylase ; ●, taka-α-amylase; △, change and dimension in the optical rotation.

でんぷんの分解作用：本酵素および数種のでんぷん消化酵素を 0.2%溶性でんぷん溶液に作用させ、経時的に分解率とヨウ素呈色による660 nmにおける吸光度の変化を測定した結果、Fig. 6のようになった。本酵素は、分解率と吸光度の間に直線関係が得られ、甘藷β－アミラーゼと同一の結果となった。

でんぷんに対する反応生成物：２％でんぷん溶液 200μlに酵素溶液 50μl（1 unit）を加え、40℃において作用させた。その反応生成物を経時的に10μlづつサンプリングして、ペーパークロマトグラフィーで生成糖を検討した。結果をFig. 7に示したが、反応初期から生成するオリゴ糖はマルトースのみであり、24時間後においても反応液のヨード呈色は赤紫色を呈していた。また、各反応時間におけるマルトースの生成率を調べ、Fig. 8に示したが、24時間後で約47%であった。

２　反応生成糖のアノマー型

基質に５％溶性でんぷん溶液を用い、不破、二国の方法[29] にしたがい、生成糖の変旋光を検討した。結果をFig. 9に示した。酵素反応の停止は炭酸ナトリウムを添加することによって行ったが、矢印はそのときの変旋光の方向と大きさを示した。本酵素による生成糖の変旋光がTaka-α-アミラーゼの場合と異なり、正であることから、生成糖のアノマー型はβタイプであることが判明した。

３　ｐＨ、熱による影響

本酵素の至適ｐＨとｐＨ安定性をFig.10に示した。40℃における至適ｐＨは 5.0付近であり、pH ５～７ で40℃、10分処理後も 100%活性を保持していた。また、至適温度と温度安定性をFig.11に示した。至適温度はpH 5.0、10分間の反応において50℃付近であり、50℃までは91%以上活性が残存しているが、65℃において100%失活した。

４　酵素の等電点

DEAE-Sephadex A-50カラムクロマトグラフィー分画後の酵素溶液10単位を負荷して密度勾配等電点電気泳動[30] を行い、等電点を検討した。その泳動

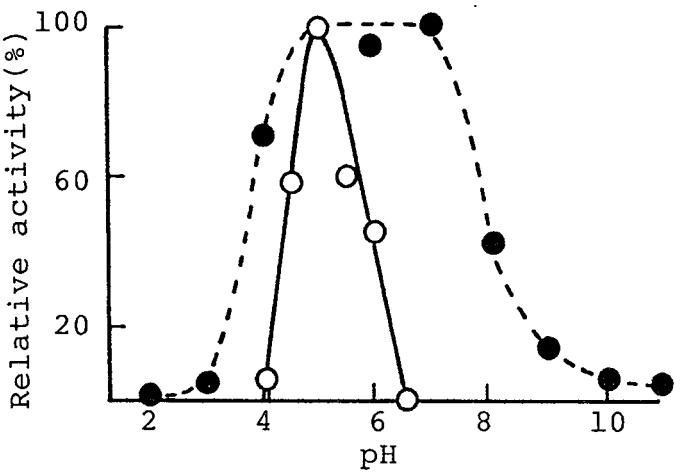

Fig. 10. Optimum pH and pH-Stability of Ginseng β-Amylase
Optimum pH(○): The reaction mixtures, consisting of 500 μl of the enzyme solution, 1 ml of 1% soluble starch and 500 μl of 0.2 M acetate buffer of various pHs, were incubated at 40℃ for 10 min. pH-Stability (●): The enzyme solution(250 μl) was mixed with 250 μl of 20 mM acetate buffer of various pHs and incubated at 40℃ for 1 h. Then 500 μl of 0.2 M acetate buffer and 1 ml of 1% soluble starch were added and the activity was measured.

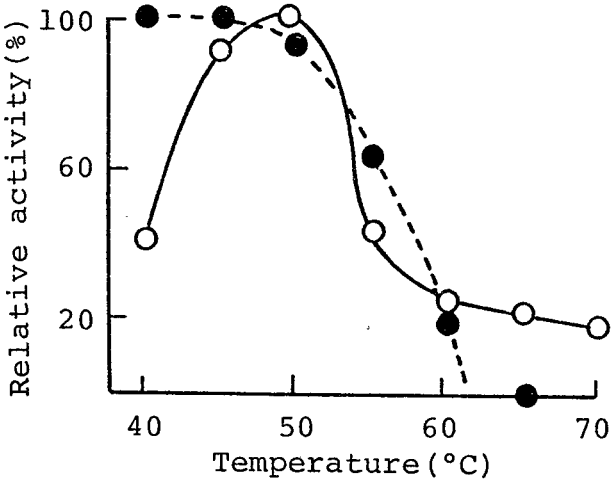

Fig. 11. Optimum Temperature and Thermostability of Ginseng β-Amylase
Optimum temperature(○): The activity was assayed in the usual manner except for the incubation temperature. Thermo-stability(●): The activity was measured in the usual way at 40℃ after incubation of the enzyme solution at various temperature for 10 min.

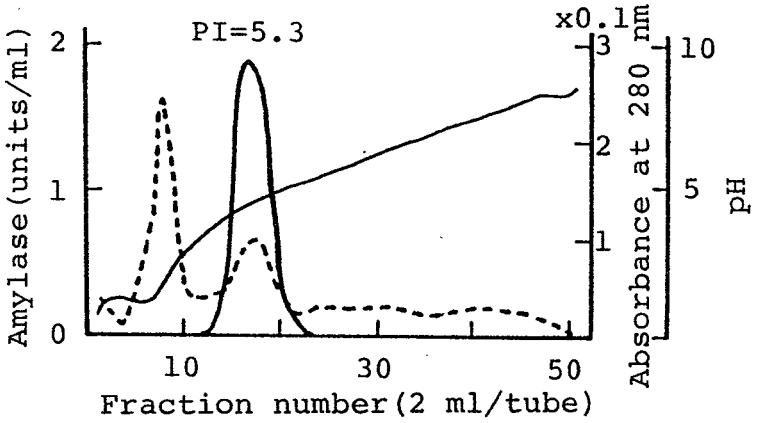

Fig. 12. Electrofocusing Column Chromatogram of Ginseng β-Amylase
The experimental conditions are described in the Experimental section. ━, amylase; ---, absorbance at 280 nm; ──, pH.

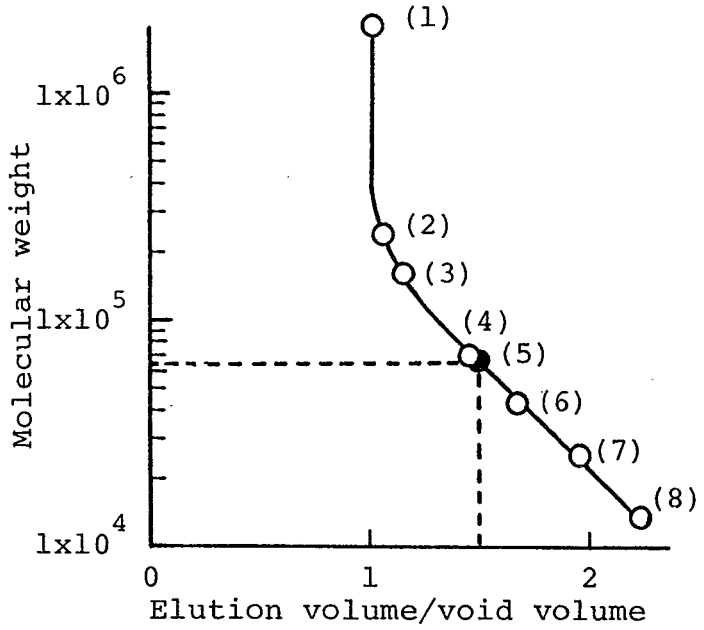

Fig. 13. Determination of Molecular Weight of Ginseng β-Amylase by Gel Filtration on Sephadex G-100
(1)blue dextran; (2)catalase; (3)aldolase; (4)bovine serum albumin; (5)ginseng β-Amylase; (6)ovalbumin; (7)chymotrypsinogen; (8)ribonuclease A.

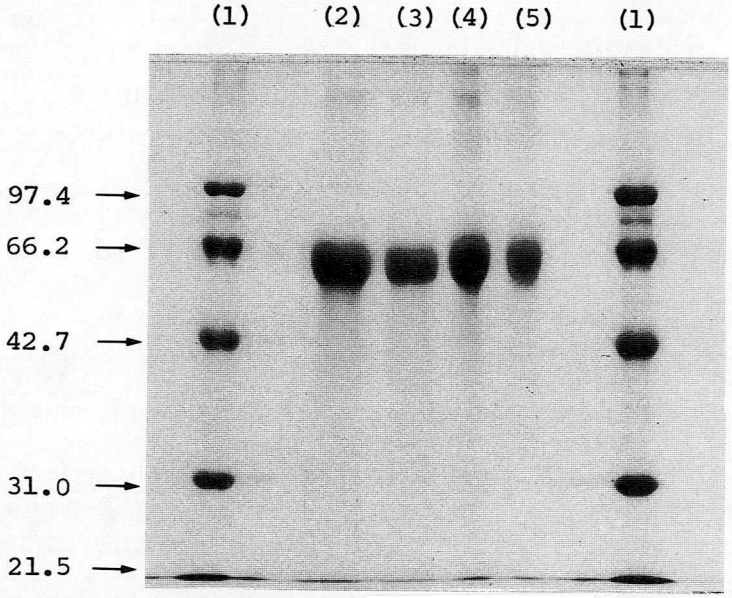

Fig. 14. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoretic Pattern of Ginseng β-Amylase

(1)Molecular weight standard; (2)7.5 μg of the enzyme without SDS and mercaptoethanol treatment; (3)15 μg of the enzyme treated in the same way as (2); (4)7.5 μl of the enzyme with SDS and mercaptoethanol treatment; (5)15 μg of the enzyme treated in the same way as (4). Rabbit muscle phosphorylase b(MW: 97.4 kDa), bovine serum albumin(66.2 kDa), hen egg white ovalbumin(42.7 kDa), bovine carbonic anhydrase(31 kDa), soybean trypsin inhibitor(21.5 kDa) were used as molecular weight standards.

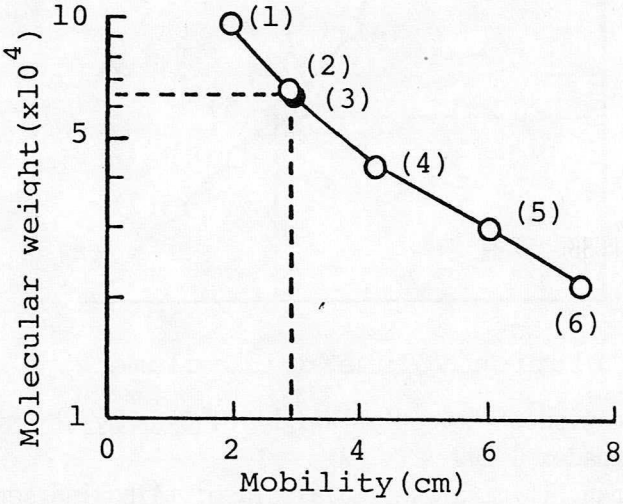

Fig. 15. Determination of Molecular Weight of Ginseng β-Amylase by 10% SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

(1)rabbit muscle phosphorylase b; (2)bovine serum albumin; (3) ginseng β-Amylase; (4)hen egg white ovalbumin; (5)bovine carbonic anhydrase; (6)soybean trypsin inhibitor.

パターンをFig.12に示した。本酵素の等電点は 5.3であり、本操作により多くの共存たん白が除去された。

5　分子量の測定

Sephadex-G 100によるゲルろ過法：Sephadex G-100を用いたゲルろ過により、本酵素の分子量を推定した。結果をFig.13に示した。溶出位置に対する各標準たん白の分子量の対数値から、図に示したような直線関係を得た。これに、本酵素の溶出量をプロットすると、分子量は約63,000であることが認められた。

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）による方法：本酵素のサブユニット構造を調べるため、SDS-PAGEを行った結果をFig.14に示した。ＳＤＳおよびメルカプトエタノール処理前後の酵素に泳動距離の差はみられず、しかもいづれも単一バンドを示した。このことから、本酵素はサブユニットをもつ酵素ではないことが確認された。分子量の対数値と泳動距離から、Fig.15に示したような関係が得られ、これに本酵素の泳動距離をプロットすると、分子量63,000～64,000となり、ゲルろ過の場合と同様の結果となった。

6　金属イオンと化学試薬による影響

金属イオンおよび阻害剤による影響を検討した結果をTable 8に示した。基質に試薬を加え、40℃で５分間前処理したのち、酵素反応を行い、残存活性（%）をもとめた。この結果 $FeCl_2$、$HgCl_2$、$PbCl_2$、$CuCl_2$、$SnCl_2$、PCMB等で強い活性低下がみられた。なお、本酵素はＳＨ阻害剤であるPCMBの処理で著しい活性低下がみられたが、Cysteineまたはメルカプトエタノール等の還元剤の添加によって再び活性の回復がみられた。

7　Michaelis 定数（Km）と阻害物質定数（Ki）

本酵素の基質および阻害剤に対する親和性を検討した[35]。結果をFig.16に示した。基質に溶性でんぷんを、阻害剤として Cyclohexaamylose（α-CD）と Cycloheptaamylose（β-CD）を用いて行った。それぞれ、加水分解速度を測定し、両逆数プロットを行った。　この図から、本酵素の Km 値は

Table 8. Effects of Metal Ions and Chemical Reagents on Ginseng β-Amylase

Metal or chemical reagent	Concentration (mM)	Residual activity (%)
None	—	100
NaCl	10	94
$CaCl_2$	10	96
$BaCl_2$	10	83
$MgCl_2$	10	81
$MnCl_2$	10	106
$CoCl_2$	1	79
$NiCl_2$	1	68
$ZnCl_2$	1	70
$FeCl_2$	1	32
$HgCl_2$	1	13
$PbCl_2$	1	16
$CuCl_2$	1	17
$SnCl_2$	1	31
Iodoacetic acid	1	66
Dithiothreitol	1	95
PCMB	0.1	23
EDTA	1	80
N-Ethylmaleimide	1	74

The reaction mixtures, consisting of 1 ml of 1% soluble starch and 0.2 ml of reagent at 10 times the concentration shown in the table, were incubated at 40℃ for 10 min. Then, 0.8 ml of the enzyme solution was added and the activity was measured in the usual way. PCMB, *p*-chloromercuribenzoate; EDTA, ethylenediaminetetraacetate.

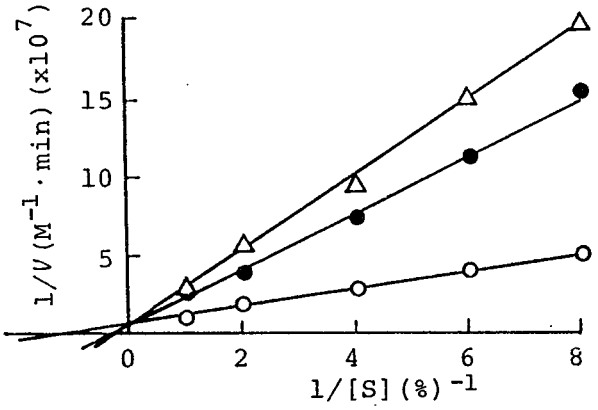

Fig. 16. Lineweaver-Burk Plots of Ginseng β-Amylase in the Presense of Cyclodextrins.

○, control; ●, 0.2 mM cyclohexaamylose; △, 5 mM cycloheptaamylose.

0.61%、 V_{max} は 1.1×10^{-7} (M/min) であり、また両阻害剤は拮抗型であり、Ki 値は α-CDに対して 0.08 mM、β-CD に対して 1.6 mM であた。

Table 9. Amino Acid Composition of Ginseng β-Amylase

Amino acid	Moles amino acid per 63,000 g protein[a]	Nearest integer
Aspartic acid	59.5	60
Threonine	19.3[b]	19
Serine	33.4[b]	33
Glutamic acid	61.6	62
Proline	31.4	31
Glycine	37.1	37
Alanine	32.2	32
Cysteine	1.5[c]	2
Valine	33.5	34
Methionine	12.3	12
Isoleucine	20.9	21
Leucine	57.7	58
Tyrosine	27.0[d]	27
Phenylalanine	23.9	24
Histidine	9.4	9
Lysine	27.0	27
Arginine	15.7	16
Tryptophan	7.7[d]	8
Total		512

a) Values of about 8.5% sugar per 63,000 g of enzyme were determined by phenol-sulfuric method.
b) Extrapolated to zero time from 24, 48 and 72 h hydrolyzates.
c) For 18 h hydrolyzates after performic acid oxidation.
d) Method of Goodwin and Morton[33].

8 精製酵素のアミノ酸組成と糖含量

本酵素のアミノ酸組成について検討した結果をTable 9に示した。常法により酸加水分解後アミノ酸分析計を用いて行った。加水分解時間は24、48、72時間の3点をとり、各々平均値で示した。但し、Threonine と Serine は24、48、72時間加水分解時における値から0時間での値を外挿して測定した。

Cysteineは過ぎ酸酸化後に18時間加水分解した。またTyrosineとTryptophanについては、紫外部吸収測定法[33] で行った。

なお、本酵素標品中の糖含量をフェノール硫酸法で測定したところ、グルコースに換算して約 8.5%の糖を含有することが確認された。本酵素は、先の SDS-PAGE において、たん白質確認のためＣＢＢ試薬で染色を行ったが、泳動後、ＣＢＢ試薬のかわりに Schiff 試薬で糖を染色したところ、たん白質と同部位に糖が検出された。さらに、この糖の分析を行うため加水分解しSawardekerらの方法[34] で Alditol acetates に変換し、ガスクロマトグラフィーを行ったところ、グルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノース等に由来する糖アルコールが検出された。しかし、アミノ糖は検出されなかった。以上の結果から、本酵素の分子量と糖含量を考慮して、本酵素のアミノ酸数は 512程度であることが認められた。

考　察

本酵素のでんぷんに対する作用機作を検討したが（Fig. 6～8）、でんぷんに対する分解作用および反応生成物を調べたペーパークロマトグラフィーの結果から、あきらかに非還元性末端からマルトース単位で exowiseに加水分解していた。さらに反応生成糖の変旋光からもβ－マルトースを生成していることを確認したが、著者は、ニンジン粗抽出液を用いた実験でも同様の結果を得ており、ニンジン中のアミラーゼはβ－アミラーゼのみであることが判明した。

一方、本酵素は、PCMB等のＳＨ阻害剤で失活し（Table 8）、 Cysteineなどのチオール化合物によって活性が回復することから、他の高等植物起源のβ－アミラーゼと同様、その分子構造中にＳＨ基を有していることが推察された。今回精製したニンジンのβ－アミラーゼと、現在までに検討されている高等植物のβ－アミラーゼの性質とを比較し、Table 10に示した。本酵素は、他のβ－アミラーゼと大きな相違はないが、甘藷のβ－アミラーゼの

Table 10. Comparison of Properties of Plant β-Amylase

Properties	Origins			
	Ginseng	Soybean[14]	Japanese radish[16]	Sweet potato[17]
Optimum pH (Substrate:starch)	5.0	5−6	6.0−6.5	4−5(30℃)
pH-stability	5−7	5−7	5.7−6.5	4−9
Molecular weight (KDa)	63	57−61.7	58−62	206(tetramer) 50−57.2(monomer)
E^{1cm}_{280nm}	16.7	17.3		17.1−17.7
Isoelectric point	5.3	5.2−5.9	4.9	4.7−4.8
Inhibitor	PCMB Fe, Hg, Pb, Cu, Sn		PCMB	Glucose, maltose PCMB Ag
K_m	0.61%starch	1.8 mM/maltotriose 0.42 mM/maltotetraose 2.5 mM/ml/amylopectin	1.1 mg/ml/amylopectin	0.073 mM/amylose 0.021%/starch
K_i Cyclohexaamylose	0.08 mM	0.35 mM		0.17 mM
Cycloheptaamylose	1.6 mM	0.98 mM		
			PCMB; 2.58×10^{-7}M	

ようなサブユニットをもつ多量体ではなくモノマーであることが確認された（Fig.13）。また、今回のどのカラムクロマトグラフィーにおいても活性ピークが１本であることから、Table 10中の他の高等植物のように、分子量や若干性質の異なるβ－アミラーゼが共存している可能性はほとんどない。さらに、本酵素中の糖含量は約 8.5%であり、これほど多くの糖を含むβ－アミラーゼの存在は他の高等植物ではまだ報告されていない。また、アミノ酸分析の結果から、本酵素の分子量を 63,000 とすると、１分子中 2 mol の Cysteineが含まれるが、この値は他の高等植物由来のβ－アミラーゼ、例えば大豆由来のもの（Cysteine 5 mol）[14) 36)]と比較して少ない。

ところで、朱らは、稲や野菜などの種子をニンジン液につけておくと発芽に必要なアミラーゼを賦活してでんぷんの糖化を促進し、生長を早めると述べているが[37)]、この発芽の促進にニンジン中のβ－アミラーゼが関与している可能性が十分考えられる。

第４節　小　括

前章で、数種の生薬がアミラーゼの作用を賦活することを示したが、その原因を検討し、以下の結果を得た。

(1) オウレン、カンゾウ、ニンジンなどの健胃生薬にアミラーゼの存在を確認した。

(2) アミラーゼを含む生薬を検索する方法として、でんぷん糊精化力を測定する場合に用いるBlue Value法を改良した方法を用いて、スクリーニングを行い、つぎにSomogyi-Nelson法でアミラーゼ活性を測定した結果、種々の生薬中のアミラーゼを簡便に測定することができた。

(3) オウレンやカンゾウでは、産地・品質等の違いによってアミラーゼ作用に差が認められた。

また、薬用ニンジン中のアミラーゼの精製と、その酵素化学的・たん白化学的性質および作用機作について検討した結果、以下のことが判明した。

(4) DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-100および Hydroxy-apatiteの各クロマトグラフィーを行い、本酵素を単一にまで精製した。

(5) 本酵素は、でんぷんに対する作用機作からβ－アミラーゼ、すなわち1,4-α-D-glucan maltohydrolase (EC.3.2.1.2) である。

(6) 本酵素の主な性質はTable 10に示したとおりである。

(7) 本酵素の分子量を63,000として、アミノ酸分析値および糖含量の測定から、 Cysteine は１分子中に ２molと、他のβ－アミラーゼに比べて少なく、また中性糖はグルコースに換算して 8.5%であり、これまで報告された他の高等植物のβ－アミラーゼに比べて非常に多い。

第３章　生薬の品質と酵素阻害物質

現在、日本薬局方に収載されている生薬は、油脂、エキス、エキス製剤を含めると約 200品目にものぼっている。生薬の品質を左右する要因として、原植物の品種はもとより、生産方法（産地、栽培・野生の別、採取時期・方法）、調製・加工技術の優劣、保存期間・方法等の違いがあげられる[38]。生薬の品質確保は、生薬を原料とする漢方製剤などへの利用の面からも、極めて重要な問題である。しかし、生薬の品質の検討は、従来からおもに形態学的あるいは成分分析等の理化学的手段を中心になされてきた。

第１章で、同種の生薬であるにもかかわらず産地などの違いによって、種々の消化酵素活性に与える影響に差がみられた。そこで、本章ではケイヒ、サンショウ、ダイオウなどの生薬について、産地、品質、性状等の異なる多くの試料を収集して活性にあたえる影響を詳細に検討し、生薬の生化学的な品質評価を試みた。

また、酵素活性を抑制する物質の本態、およびその性質についても検討を行った。

第１節　ケイヒについて

ケイヒ Cinnamon barkは、一般用医薬品の胃腸薬のうちの、実に約45％の製剤に配合されており、１日の服用量が約20～200 mgと比較的多い生薬である。また、漢方製剤の原料としてあるいは独特の芳香から食品原料への利用頻度も高い。その産地は、中国を中心に広く東南アジアから日本にまで広がっており、また、品種も豊富である。　そこで、産地、部位等の異なる15種類のケイヒを収集して、おもにパンクレアチンなどの酵素のたん白消化作用におよぼす影響について検討し、活性抑制作用と品質との関係を検討した。

材料および方法

1　実験材料

ケイヒ：試料は局方品11と、桂枝片、桂枝尖、桂葉柄、桂衣砕といわれるもの各１、合計15種類を用いた。各試料の乾燥減量、灰分、精油含量は日局生薬試験法により試験した。なお、試料はすべて粉末にしたのち、300μm の篩を通し、粒度を均一にした。

酵素：パンクレアチン（ウシ膵臓由来）およびトリプシン（Merck社製、20,000 E/g)、 α－キモトリプシン（Merck社製、45 mU/mg）を用いた。

2　酵素活性の測定

カゼイン－フォリン法によるプロテアーゼ活性の測定：パンクレアチンのたん白消化力の測定は、第１章のとおり行った。パンクレアチン以外の酵素についてそのプロテアーゼ活性を測定する場合は、パンクレアチン溶液の代わりにトリプシン（0.01%）、α－キモトリプシン（0.02%）をそれぞれ試料溶液とした。

カップ法によるプロテアーゼ活性の測定：第１章第３節の方法で行った。

3　フォリン反応陽性物質の測定

生薬５mgをとり、水11mlを加えて10分間振とうしたのち濾過する。濾液２mlをとり、無水炭酸ナトリウム溶液（３→50）5.0ml およびうすめたフォリン試液（１→３）1.0ml を加え、40℃で20分間放置したのち、この液につき波長 660nmにおける吸光度を測定した。

結　果

1　各種ケイヒ試料のパンクレアチンのたん白消化作用におよぼす影響

15種類のケイヒ試料（Table 11）を用いて、パンクレアチンのたん白消化力に対する影響をカゼイン－フォリン法で検討した。結果をTable 12に示した。

各種ケイヒの添加により、パンクレアチンのたん白消化力は29～95%と、かなりの変動を示した。今回実験に供したケイヒ試料について、プロテアー

Table 11. Properties of Cinnamon Barks

Sample	Part of plant	Place of origin	Loss on drying(%)	Acid-insoluble ash(%)	Volatile oil content (ml/30g)
I	Bark	Kuangnan	9.9	3.4	1.79
II	Bark	Vietnam	10.0	3.2	1.31
III	Bark		9.9	2.2	0.06
IV	Bark		8.9	3.5	N.D.
V	Bark		10.3	2.3	N.D.
VI	Bark	Vietnam	9.9	4.5	1.00
VII	Bark	Kuangnan	9.0	3.5	2.13
VIII	Bark	Kuangnan	8.7	1.1	0.60
IX	Bark	Kuangnan	11.0	2.2	0.87
X	Bark	Kuangnan	10.7	2.4	0.83
XI	Bark	Kuangnan	10.6	1.9	1.46
XII	Branch	Vietnam	8.8	1.1	0.02
XIII	Twig	Vietnam	8.3	2.0	N.D.
XIV	Petiole	Vietnam	10.2	5.8	N.D.
XV	Bark from small branch	Vietnam	9.8	1.8	1.05

Table 12. Effects of Cinnamon Barks on Proteolytic Activity of Pancreatin and Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Samples

Sample[a)]	Activity(%)[b)]		Folin-Ciocalteau Reagent-positive substances (O.D.at 660 nm)
	by Casein-Folin method	by Cup method	
Control[c)]	100[d)]	100[d)]	
I	69	69	0.215
II	60	53	0.276
III	94	88	0.100
IV	69	72	0.222
V	45	52	0.317
VI	80	71	0.079
VII	71	65	0.216
VIII	85	66	0.087
IX	47	38	0.357
X	59	58	0.200
XI	54	55	0.291
XII	95	72	0.089
XIII	61	66	0.212
XIV	52	50	0.301
XV	29	44	0.466

a) Five mg of a cinnamon bark were added per tube or cup.
b) Each value represents the remaining activity(%).
c) No crude drug added.
d) Each value represents the average of 6 samples.

ゼ活性への影響と精油含量との間の相関性、さらに、灰分量、乾燥減量等との間の相関性も認められなかった。なお、各ケイヒ試料の添加による反応液中のｐＨの変動もみられなかった。

ケイヒ添加による、酵素活性の測定法として用いたカゼインーフォリン法では、第１章第３節に示したように、試料によってはＡ$_2$ 値（ブランク値）が比較的大きくなる場合があり、ケイヒ中にフォリン試薬に反応する物質が存在する可能性が考えられた。そこで、試料II、III、XV について、ケイヒ量とパンクレアチンのたん白消化力活性（吸光度）との相関関係を調べた。結果をFig.17に示した。活性阻害が中程度の試料IIでは、Ａ$_1$ 値（主検値）は５mg添加のとき最低で、５mgより多くても少なくても大となった。しかし、Ａ$_2$ 値は試料の量に比例して大きくなった。活性低下の小さい試料III では、Ａ$_2$ 値は試料IIと同様に添加量に比例して大きくなるが、Ａ$_1$ 値は試料の量にあまり影響されなかった。強い活性阻害を認めた試料XVでは、Ａ$_1$ 値は試料IIと類似した曲線を示したが、Ａ$_2$ 値は試料II、III と比較して急勾配の直線が得られた。３試料ともＡ$_2$ 値は試料の量に比例して増大する点で共通していた。

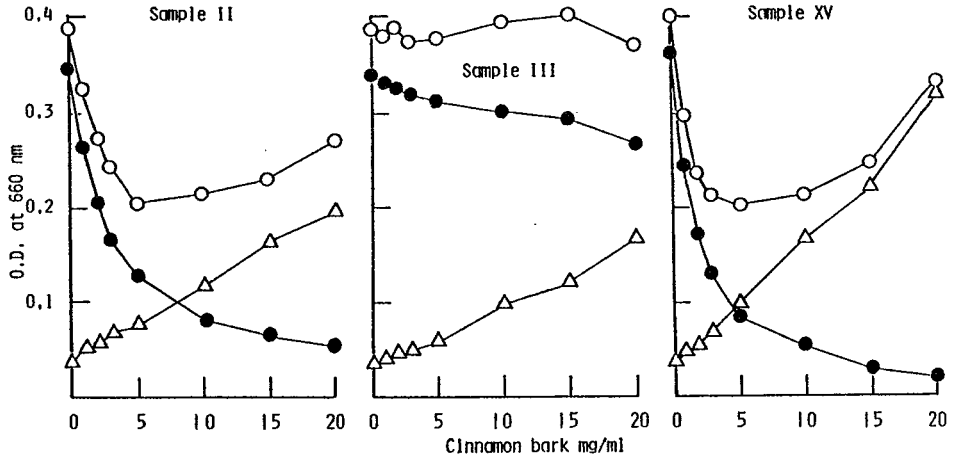

Fig. 17. Effects of Cinnamon Barks on Proteolytic Activity of Pancreatin
○, Ａ$_1$(with pancreatin); △, Ａ$_2$(without pancreatin); ●, Ａ$_1$-Ａ$_2$.

2　ケイヒ中のフォリン反応陽性物質についての検討

Fig.17に示したように、ケイヒ中にフォリン反応陽性物質の存在が示唆されたことから、供試したケイヒ中のフォリン反応陽性物質を定量した(Table 12)。その結果、とくに試料V、IX、XVのように活性低下の著しいケイヒには、水溶性のフォリン反応陽性物質が多く存在していることが認められた。

3　カップ法による検討

ケイヒによるパンクレアチンのたん白消化作用への影響について、カゼイン－フォリン法以外に、ケイヒ試料中のフォリン反応陽性物質による影響を除くために、第1章第3節に示したカップ法を用いて検討した（Table 12）。その結果、カゼイン－フォリン法での測定結果とほぼ同様の成績が得られた。しかし、この両法で得られた活性値はカゼイン－フォリン法で50%～70%程度の活性を示した試料については、カップ法でもほぼ同等の値を示したが、全般的にカップ法で得られた活性値の方が、カゼイン－フォリン法の場合よりも再現性の点で優れていた。

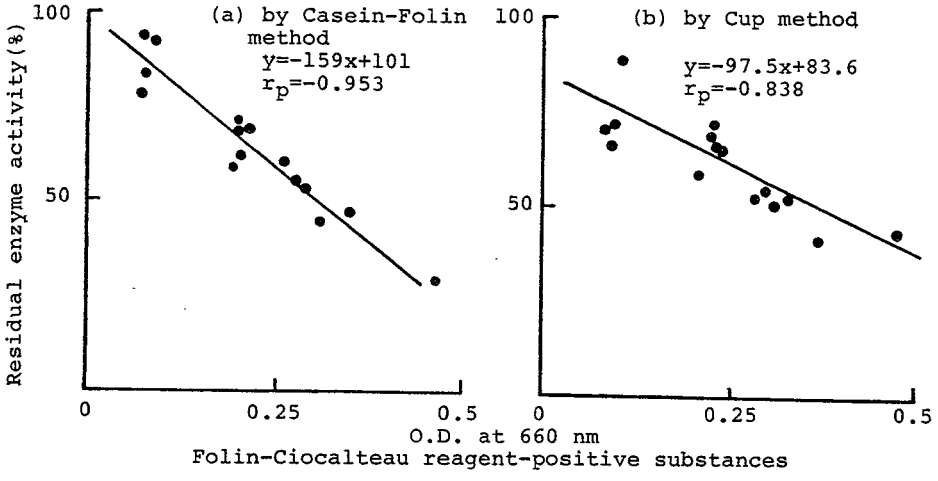

Fig. 18. Relationship between Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Cinnamon Barks and Proteolytic Activity of Pancreatin

Enzyme activity was determined by (a)Casein-Folin method and (b)Cup method. r_P: correlation coefficient.

Table 13. Effects of Cinnamon Barks on the Trypsin and Chymotrypsin Activities

Sample[a)]	Trypsin[b)]	Chymotrypsin[b)]
Control[c)]	100.0[d)]	100.0[d)]
I	39.4	67.0
II	29.9	38.2
III	76.2	92.7
IV	54.5	63.9
V	29.2	17.8
VI	70.3	86.1
VII	65.2	66.1
VIII	56.9	68.5
IX	13.7	21.3
X	9.4	33.6
XI	24.7	37.5
XII	84.1	83.0
XIII	26.5	36.4
XIV	21.1	37.3
XV	3.4	10.5

a) Five mg of a cinnamon bark were added per tube.
b) Enzyme activity was determined by the Casein-Folin method.
Each value represents the remaining activity(%).
c) No crude drug added.
d) Each value represents the average of 3 samples.

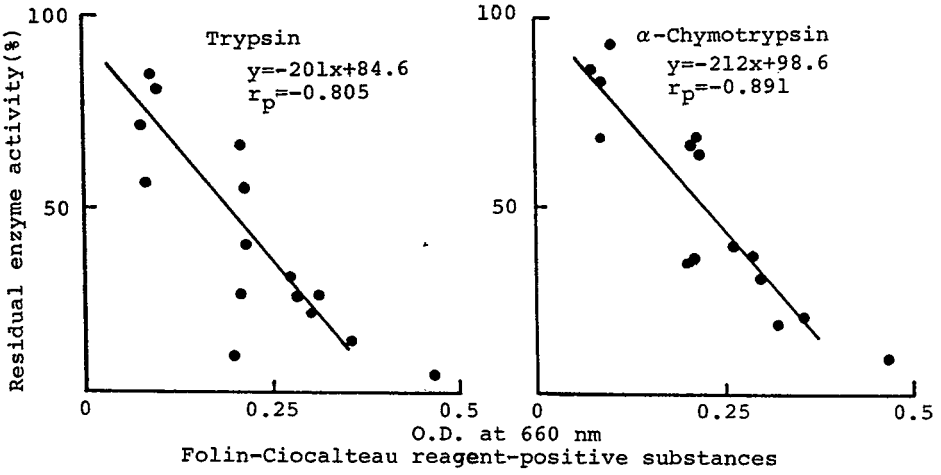

Fig. 19. Relationship between Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Cinnamon Barks and Proteolytic Activity of Trypsin and Chymotrypsin
r_p: correlation coefficient.

4　酵素活性とフォリン反応陽性物質の相関性について

15種類のケイヒ試料について、パンクレアチンのたん白消化力の残存活性と、試料中のフォリン反応陽性物質の量との相関性をカゼイン－フォリン法およびカップ法で検討した。結果をFig.18に示した。

活性を強く抑制した試料ほどフォリン反応陽性物質が多く存在し、酵素活性とフォリン反応陽性物質との間に明らかに直線的な相関関係がみられた。その相関係数を求めたところ、カゼイン－フォリン法で －0.953、カップ法で －0.838となり、その相関はカゼイン－フォリン法の方で顕著に認められた。

さらに、トリプシン、α－キモトリプシンを用いてもパンクレアチンの場合と同様な相関関係（相関係数は、トリプシン －0.805、α－キモトリプシン －0.891）が認められた（Table 13、Fig.19）。

考　察

産地、性状等を異にする各種ケイヒのたん白消化作用に与える影響を検討し、異なった酵素活性阻害を示すことを見い出した。パンクレアチンのたん白消化活性をカゼイン－フォリン法で検討する際、ケイヒ中のフォリン反応陽性物質（タンニン、低分子フェノールなどのフェノール性水酸基をもつ物質など）の存在により、真の活性値が求め難い。したがって、フォリン反応陽性物質の影響を受けないカップ法についてもあわせて検討した。

フォリン反応陽性物質の少ないケイヒほど一般に酵素活性への影響も少なく、またフォリン反応陽性物質が多いものでは酵素活性への影響も大きく、活性は低下した。各種ケイヒ中に存在するフォリン反応陽性物質とたん白消化活性との間に明らかな相関関係が認められた。また、パンクレアチン以外に、トリプシン、α－キモトリプシン等のプロテアーゼを用いても同様の傾向が得られた。

第２節　サンショウについて

サンショウ Zanthoxylum fruitは、ケイヒと同様、芳香性健胃薬として粉末で胃腸薬に配合され、また、香辛料として食用に供される。

サンショウは、日本薬局方には「*Zanthoxylum piperitume* De CANDOLLEまたはその他同属植物（Rutaceae）の成熟した果皮で、果皮から分離した種子をできるだけ除いたもの」と規定されている[39]。したがって、原植物にはサンショウ以外にアサクラザンショウ、フユザンショウ等も薬用として広く生産、使用される一方[40]、近年中国産山椒（一般に花椒と称される）も市場に出まわり需要の増大とともに輸入量も年々伸びつつある[41]。花椒は *Z.simulance* HANCE を基原とし、薬用あるいは食用として日本産サンショウ（ここでは便宜上、各種和山椒、花椒などを総称してサンショウと記した。また、局方品を示す場合は山椒または日本薬局方サンショウと表記した。）とほぼ同等に取り扱われることが多い。また、山椒とは異なる独特な芳香と辛味を有するため、山椒よりも良品として扱われる傾向さえある。しかし、その薬効、成分についてはまだ十分解明されていない。

本節では、芳香性健胃生薬として繁用されるサンショウについて、ケイヒと同様の検討を行った。山椒、花椒、さらに犬山椒（*Z.schinifolium* sieb. et Zucc.）等の各種の試料を収集し、パンクレアチンなどの酵素のたん白消化作用におよぼす影響を調べ、活性値と試料中に存在するフォリン反応陽性物質および精油含量との間に相関関係の有無を検討した。さらに、山椒と花椒とでこの相関関係に差があるかどうかについても検討した。

材料および方法

実験材料

サンショウ：供試した試料を、Table 14に示した。試料XXを除いて、すべて局方品として市販されているものを用いた。各試料の乾燥減量、灰分、酸

Table 14. Properties of Zanthoxylum Fruit

Sample	Place of origin	Purity[a]		Total ash (%)	Acid-insoluble ash (%)	Volatile oil content (ml/30g)
		Seeds (%)	Peduncles and twigs(%)			
I	China	0.6	0.5	5.6	0.2	1.63
II	China	2.5	2.4	6.3	0.7	2.51
III	China	0.4	1.6	6.0	0.5	1.17
IV	China	31.7	2.4	5.6	0.1	0.66
V	Wakayama	4.8	0.7	7.0	0.7	1.54
VI	Wakayama	8.0	0.9	4.8	0.3	1.26
VII	Wakayama	20.0	7.6	5.8	0.2	1.32
VIII	Tottori	1.9	9.8	5.3	0.7	1.88
IX	Tottori	9.2	0.6	6.2	0.3	2.34
X	Tottori	9.6	34.3	5.9	0.4	1.80
XI	Tottori	36.8	5.7	4.7	0.6	1.54
XII	Nara	20.5	12.1	6.1	0.4	1.35
XIII	Hyogo	22.0	3.1	6.9	0.5	1.00
XIV	Hyogo	63.3	8.7	6.7	0.4	1.14
XV		15.2	11.9	5.1	0.2	1.80
XVI		21.5	8.7	5.7	0.4	1.01
XVII		56.5	4.4	6.5	0.5	0.82
XVIII		1.7	1.4	4.6	0.2	1.26
XIX		48.1	2.2	5.3	0.2	0.69
XX	Korea	7.2	10.1	6.4	0.5	0.30

a) Foreign matters in each sample were less than 0.1%.

不溶性灰分、精油含量などは日局生薬試験法により測定した。なお、試料はすべて粉末としたのち、300μm の篩を通し、粒度を均一にした。収穫年度は試料 XVIIIが1978年、VI、VII、VIII が1979年、Ⅰ、III、IX、IX、XV、XXが1981年、II、Ⅴ、X、XI、XII、XIII、XIV、XVII、が1982年のもの、IV、XIX が1970年以前の古いものである。

性状：Ⅰ～IVは中国産花椒で、果皮の多くは開裂し、表面に小さな突起が多くみられ、内果皮は薄い。種子はIV以外はほとんどなく、あっても極めて少ない。果皮も細く短い。その粉末はⅠ、IIは赤褐色であるが、III は暗褐色、IVは暗紫褐色。また、山椒とは明らかに異なる特異な芳香と辛味を有する。なおⅤは和歌山産山椒であるが、Ⅰの花椒に形状、芳香等が酷似してい

るため花椒に加えた。XXは韓国産犬山椒で、果皮は灰緑色に近く、内果皮は薄く、芳香は特異で不快臭を有する。また、その粉末は灰白色である。他の試料VI～XIX は日局サンショウで多少果皮の大きいもの（VI）、小さいもの（X、XI）、果皮の色がやや緑色を帯ているもの（IX、X）、開裂の少ないもの（VII、XV、XVI）、外面突起の多いものなどがある。また、種子の含量比が50%を越えるもの（XIV、XVII） もある。その粉末の色も赤褐色、暗赤褐色など多様であった。さらに、芳香、辛味なども産地、ロット等により差がみられた（Table 14）。

酵素：消化酵素のパンクレアチン（ウシ膵臓由来）およびプロテアーゼであるトリプシン（Sigma社製、２回再結晶、ウシ膵臓、12,000 BAEE units/mg)、 α－キモトリプシン（Sigma社製、３回再結晶、46 units/mg）を用いた。

２　酵素活性の測定

カゼイン－フォリン法によるプロテアーゼ活性の測定：パンクレアチンのたん白消化力の測定は、前節のとおり行った。パンクレアチン以外の酵素活性を測定する場合は、パンクレアチン溶液の代わりにトリプシン、α－キモトリプシンの各 0.002%溶液を用い、pH 7.5で酵素反応を行った。

カップ法によるプロテアーゼ活性の測定：第１章第３節の方法で行った。

３　フォリン反応陽性物質の測定

前節のとおり行った。

４　精油成分の抽出とガスクロマトグラフィー

精油成分の抽出は、試料粉末５ｇをｎ－ヘキサン25mlで24時間冷浸後濾過し、試料液とした。

ガスクロマトグラフィーの条件は、以下のとおり行った。使用機器：島津ＧＣ－６Ａ（Ｆ.Ｉ.Ｄ）、カラム：２%、ＰＥＧ－20M on Chromosorb W (AW-DMCS) 100～120 メッシュ、３mm×３m、カラム温度： 50℃～200℃（５℃/分　昇温）、検出器温度：230℃、レンジ：2.56Ｖ、感度：10^3 ＭΩ、試料液注入量：３μl。

なお、各成分の確認は、試料液と標品について同一条件下でのガスクロマトグラフィーの保持時間（t_R）を比較することにより行った。

結　果

1　サンショウのパンクレアチンたん白消化活性におよぼす影響

各種サンショウによるパンクレアチンのたん白消化作用への影響は Table 15のとおりであった。各試料の添加により、パンクレアチンのたん白消化力

Table 15.　Effects of Zanthoxylum fruit on Proteolytic Activity of Pancreatin and Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Samples

Sample[a]	Activity(%)[b]		Folin-Ciocalteau Reagent-positive substances (O.D.at 660 nm)
	by Casein-Folin method	by Cup method	
Control[c]	100.0[d]	100.0[d]	
I	28.8	52.6	0.551
II	22.5	52.5	0.641
III	36.3	50.7	0.418
IV	51.8	71.4	0.475
V	33.0	46.0	0.487
VI	12.3	55.4	0.487
VII	26.2	43.2	0.349
VIII	7.9	38.5	0.573
IX	6.9	31.9	0.608
X	19.7	54.0	0.446
XI	25.0	54.0	0.359
XII	22.5	38.2	0.432
XIII	52.5	60.4	0.243
XIV	29.3	42.2	0.374
XV	10.7	32.9	0.548
XVI	48.8	54.9	0.248
XVII	34.1	54.5	0.302
XVIII	11.5	43.7	0.536
XIX	44.8	57.7	0.264
XX	79.4	72.8	0.163

a) Five mg of a cinnamon bark were added per tube or cup.
b) Each value represents the remaining activity(%).
c) No crude drug added.
d) Each value represents the average of 6 samples.

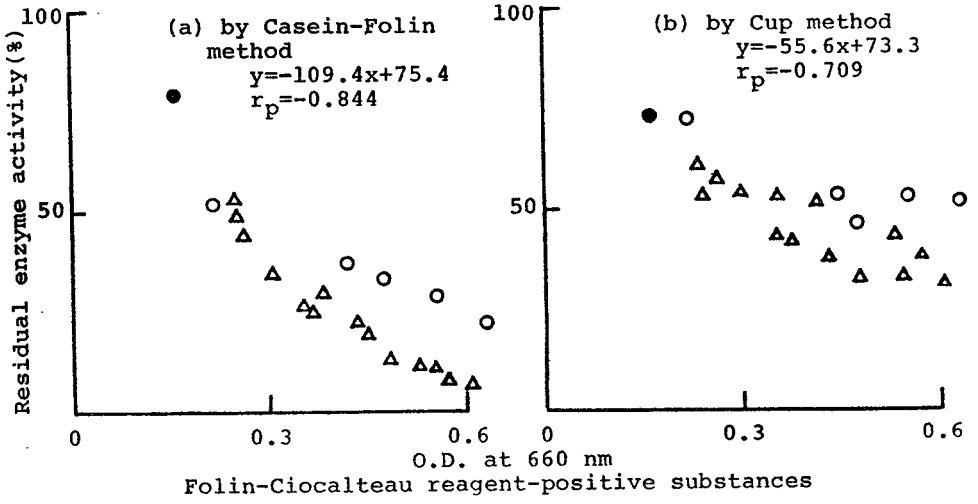

Fig. 20. Relationship between Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Zanthoxylum Fruit and Proteolytic Activity of Pancreatin

Enzyme activity was determined by (a)Casein-Folin method and (b)Cup method. r_p: correlation coefficient. ○, *Z. simulance* HANCE; △, *Z. piperitum* DC; ●, *Z. schinifolium* sieb. et Zucc.

はカゼイン－フォリン法で測定した場合、対照の21～95%に低下した。カップ法ではカゼイン－フォリン法より若干高い残存活性値を示したが、ほぼ同傾向の活性低下が確認された。

2　パンクレアチンのたん白消化作用への影響とフォリン反応陽性物質の相関性

試料中にはフォリン反応陽性物質の存在が認められたため、本物質の含量と上記酵素活性値の相関性を検討した（Fig.20）。その結果、(a) カゼイン－フォリン法で測定した場合、水溶性のフォリン反応陽性物質は酵素活性低下作用の大きい試料　（VIII、IX、XVなど）で多く、活性への影響が比較的小さい試料（IV、XX）で少ないことが確認された。(b) カップ法でも同じ傾向が認められ、それぞれの相関係数を求めたところ、カゼイン－フォリン法で－0.844 、カップ法で－0.709 となり、負の比較的高い相関係数が得られた。したがって、以下の酵素活性測定は主としてカゼイン－フォリン法によることとした。

また、各試料を花椒（Ⅰ～Ⅴ）と山椒（VI～XIX） とに分け、それぞれについて残存活性値とフォリン反応陽性物質含量との相関性（回帰直線および相関係数）を検討した。フォリン反応陽性物質含量を示す660 nmでの吸光度をｘ軸、残存活性をｙ軸とすると、カゼイン－フォリン法では花椒が$y=-69.3x+66.5$、$r_P=-0.997$、山椒が$y=-117.3x+73.5$、$r_P=-0.962$であった。

3　その他のプロテアーゼ活性への影響

サンショウ添加により、パンクレアチンのたん白消化活性の低下が認められたことから、その他のプロテアーゼとしてトリプシンとα－キモトリプシンとを用いて検討した（Fig.21）。トリプシンでは、試料IV、XIX （古い試料）とXX（犬山椒）が図の左上部、Ⅰ、II、III、Ⅴ （花椒）が右上部、他（山椒）が下部に集合した。また、α－キモトリプシンでは試料IV、XXが左上部、Ⅰ、II、III、Ⅴ がやはり右上部、他が下部にほぼ一本の線上に集合した。花椒（Ⅰ～Ⅴ）では、フォリン反応陽性物質が多い試料でも活性を50％以下に低下させることはなかった。山椒（VI～XIX） について、プロテアーゼ活性と試料中のフォリン反応陽性物質との間の相関性（回帰直線、相関係数）はトリプシンで　$y=-101.2x+66.1$、$r_P=-0.681$、　α－キモトリプシンで$y=-92.1x+55.2$、$r_P=-0.901$であった。

4　サンショウの各部位によるパンクレアチンのたん白消化作用への影響

サンショウは、一般に果皮、種子、果柄などから構成されているが、日本薬局方では「果皮から種子をできるだけ除いたもの」と規定されている。そこで、サンショウについても比較的強い活性低下を認めた試料XVを用いて、果皮、種子、果柄および枝の各部位に分別し、各々パンクレアチンのたん白消化作用への影響を調べた（Table 16）。その結果、果皮で活性低下が最も顕著で、フォリン反応陽性物質も多く、種子では活性をまったく低下させず、フォリン反応陽性物質の量も少ないことが認められた。

5　サンショウ中の精油量と酵素活性の相関性

サンショウ中の精油と、パンクレアチンのたん白消化作用への影響および

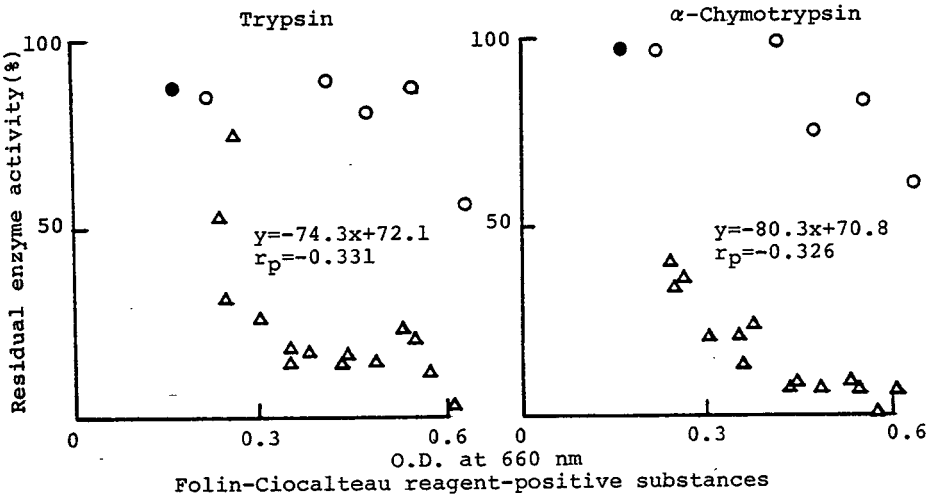

Fig. 21. Relationship between Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Zanthoxylum Fruit and Proteolytic Activity of Trypsin and Chymotrypsin
r_p: correlation coefficient. ○, *Z. simulance* HANCE; △, *Z. piperitum* DC; ●, *Z. schinifolium* sieb. et Zucc.

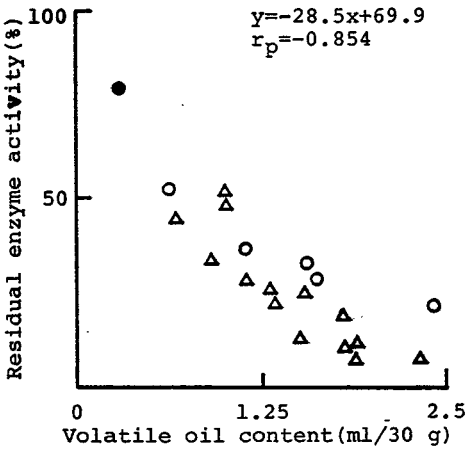

Fig. 22

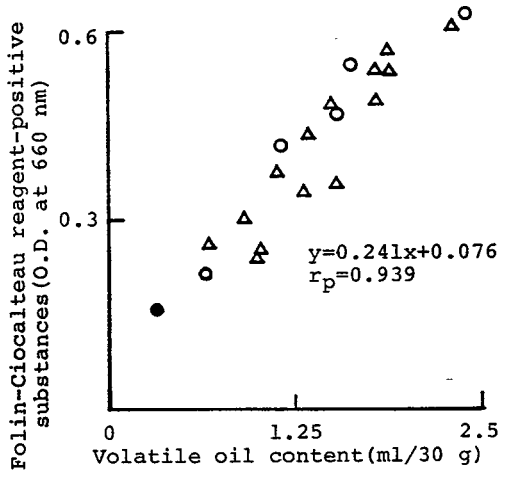

Fig. 23

Fig. 22. Relationship between Volatile Oil Content of Zanthoxylum Fruit and Proteolytic Activity of Pancreatin
Enzyme activity was determined by Casein-Folin method. r_p: correlation coefficient. ○, *Z. simulance* HANCE; △, *Z. piperitum* DC; ●, *Z. schinifolium* sieb. et Zucc.

Fig. 23. Relationship between Volatile Oil Content of Zanthoxylum Fruit and Proteolytic Activity of Pancreatin .
Enzyme activity was determined by Casein-Folin method. r_p: correlation coefficient. ○, *Z. simulance* HANCE; △, *Z. piperitum* DC; ●, *Z. schinifolium* sieb. et Zucc.

Table 16. Effects of Parts of Zanthoxylum Fruit (Sample XV) on Proteolytic Activity of Pancreatin, and Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Each Part

Part of plant[a)]	Activity[b)]	Folin-Ciocalteau reagent-positive substances (O.D. at 660 nm)
Control[c)]	100.0[d)]	
Pericarps	25.1	0.606
Seeds	100.3	0.133
Peduncles and twigs	27.9	0.503

a) Five mg of a sample were added per tube.
b) Determined by Casein-Folin method.
Each value represents the relative remaining activity.
c) No crude drug added.
d) Each value represents the average of 3 samples.

試料中のフォリン反応陽性物質の量との間に相関性が認められるかどうかを検討した（Fig.22、Fig.23）。Fig.22に示すように、精油含量の多い試料では酵素活性を強く低下させ、精油の少ない試料では活性に与える影響も小さく（相関係数 −0.854）、また、Fig.23に示すように、精油の多い試料では水溶性のフォリン反応陽性物質も多く存在していた（相関係数 0.939）。さらに、種子の混入が著しい試料 （IV、XVII、XIX） では本物質の量も少なく、精油含量もわずかで、したがって活性に与える影響もわずかであった。

6 精油成分のガスクロマトグラフィー

Table 16で、精油成分の最も多い果皮で活性の低下が強く、また、Fig.22に示すように、試料中の精油含量と残存酵素活性値との間に相関性が認められたことから、サンショウ中の精油のたん白消化作用におよぼす影響について検討した。各試料から抽出した精油をパンクレアチンに添加したが、たん白消化力の低下はほとんど認められなかった。したがって、精油自体が活性を阻害する物質ではないが、精油含量と活性低下作用との間に何らかの関連性があることが考えられた。また、山椒と花椒とを比較すると、同じ精油含量であっても花椒の方が若干活性低下作用が低い（Fig.22）。

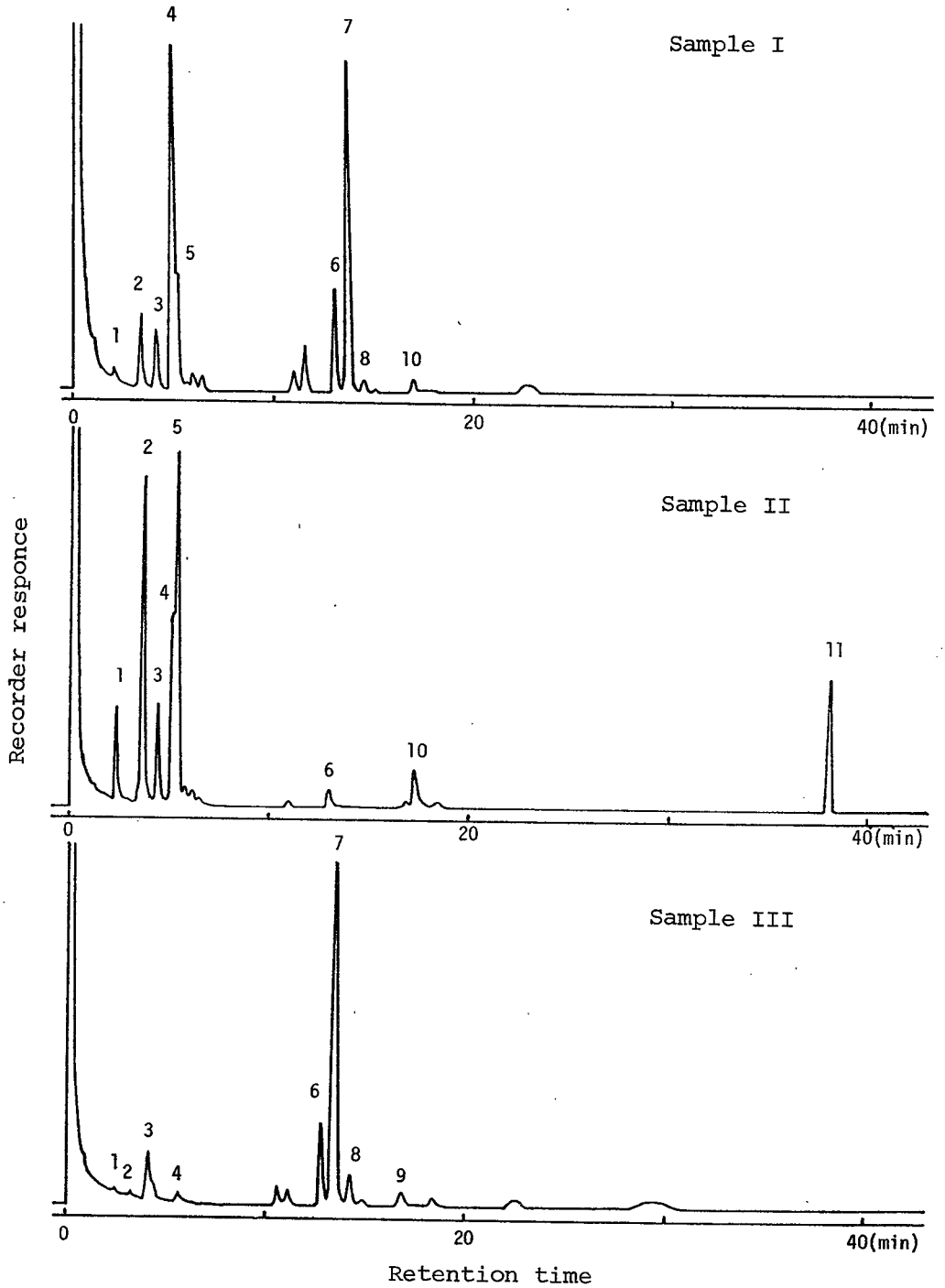

Fig. 24. Gas Chromatograms of Volatile Oil from *Zanthoxylum Simulance* HANCE

Column, 2% PEG-20M on Chromosorb W(AW-DMCS) 100~120 mesh, 3 mm×3 m; column temp., temperature isothermal at 50℃ for 10 min then programmed at 5℃ per minute to 200℃ and run isothermal there after; detector oven temp., 230℃; injection port temp., 230℃; range, 512×0.01 V; sensitivity, 10^3MΩ; sample size, 3μl.

Table 17. Chemical Constituents of Volatile Oil from *Zanthoxylum simulance* HANCE

Peak No. in Fig. 24	Compounds
1	α-pinene
2	sabinene
3	myrcene
4	limonene, 1,8-cineol
5	β-phallandrene
6	linalool
7	isopulegol
8	terpinene-4-ol
9	α-terpineol
10	piperitone

従来、山椒の精油成分については Sakaiら[42] をはじめ、多くの研究報告があるが、花椒は我国での需要が新しいため、その精油成分についての研究は安田らの報告[43] があるのみである。そこで、今回収集したサンショウ試料のうち、花椒について品質評価の一環として、ガスクロマトグラフィーによる精油成分の検索を安田らの方法を用いて行った（試料Ⅰ～III のガスクロマトグラムをFig. 24に示した。）。その結果、外観、性状等がほぼ同一の花椒であっても、含有成分量にかなりの差があることが明らかになった。すなわちⅠは limonene、isopulegol を、IIはsabinene、β-phellandreneを、またIII はisopulegolをそれぞれ主成分としていた。その他に、α-pinene, myrcene, linaloolなどが各試料中に含まれたいた。いずれも日本産山椒とは異なるパターンを示したが、試料Ⅰは安田らが述べている「花椒１級品」と、試料IIは「花椒２級品」と類似の精油成分を含有していた。試料Ⅰと試料IIは採取年度が異なるが、入手経路、品質等が同等として取り扱われていたものである。試料III のガスクロマトグラムはⅠ、IIと異なるパターンを示した。

考　察

サンショウは品種が豊富で、従来の国内生産品に加えて輸入品も多く市場に流通するようになった。また、サンショウは消化酵素剤に配合されることが多く、酵素活性におよぼす影響も考慮する必要があるため、酵素活性への影響と各種サンショウの品質について検討した。

Fig.20、Fig.21で、パンクレアチンおよびトリプシン、α－キモトリプシンを用いて、各種サンショウ中のフォリン反応陽性物質の量と残存プロテアーゼ活性値との相関性を調べたところ、山椒と花椒に分別した場合顕著な相関が認められた。

サンショウの構成成分のうち、たん白消化酵素を最も強く阻害したのは果皮であった（Table 16）、果皮には精油成分が多い。精油自体が阻害の原因物質ではないが、Fig.22、Fig.23でサンショウ中の精油含量とたん白消化酵素の残存活性およびフォリン反応陽性物質含量との間に比較的高い相関関係が得られたことから、精油とこれら２者の間には何らかの関連性があることが推察された。さらに、フォリン反応陽性物質の測定法と酵素活性阻害の測定法などを多角的に組み合わせて、将来、サンショウの品種の分類、新鮮度などの判定の目安として応用できるものと考えられる。

各種サンショウ試料中の精油成分のガスクロマトグラフィーによる検討（Fig.24）から、花椒と山椒とではその成分に顕著な差が認められたことから、両種の生薬は品質的に異なるものであると思われた。安田らは、花椒の種類がガスクロマトグラムのパターンから２種類に分類されたと報告しているが[43]、本節での検討ではさらに多種に分類されることが推察された。また、日本産の山椒中にも中国産山椒と同様の形状、成分を示すものが認められたことから、今後、花椒の取り扱いはもとより、客観的な品質評価法も早急に確立される必要がある。

第３節　ダイオウについて

ダイオウRhubarb は、主として緩下を目的に、漢方方剤に、また瀉下剤原料として用いられる。さらに、便秘症の緩下効果を兼ねて、他の生薬とともに胃腸薬に配合されることもある。

ダイオウは、多くを中国からの輸入に依存しているが、中国産の薬用ダイオウはその産地、性状から、一般に錦紋系と雅黄系の２系統に大別される。前節までに、ケイヒおよびサンショウの酵素活性におよぼす影響を調べ、それらの品質によってプロテアーゼ活性に与える影響に差異が認められた。そこで、今回、ダイオウの市場品であり、また品質を異にする錦紋系、雅黄系、さらに日本国内で栽培されている北海大黄（北海道で栽培・生産されるダイオウ[44]。）の各試料を用いて、酵素のたん白消化作用だけでなく、でんぷん消化作用、脂肪消化作用、せんい素消化作用におよぼす影響と、試料中に存在するフォリン反応陽性物質との間の相関関係の有無についても詳細に検討した。

材料および方法

実験材料

ダイオウ：供試した試料は錦紋大黄11、雅黄10、北海大黄13の計34試料で、その品質、産地、部位等はTable 18に示したとおりである。各試料はすべて粉末にしたのち、300μm の篩を通して粒度を均一にした。

酵素：胃腸薬に繁用されるジアスターゼ（大麦由来）、ビオジアスターゼ2,000（*Aspergillus oryzae* 由来）、パンクレアチン（ウシ膵臓由来）、およびα－アミラーゼ（Sigma社製、*Bacillus* 属由来）、α－アミラーゼ（Sigma社製、ブタ膵臓由来）、β－アミラーゼ（Sigma社製、大麦由来）、トリプシン（Sigma社製、ウシ膵臓由来）、α－キモトリプシン（Sigma社製、ウシ膵臓由来）を用いた。

Table 18. Effects of Rubarbs on

Sample		Place of origin	Activity tested / Enzyme source / pH	Starch saccharifying: Diastase[b1)] 5.0	Starch saccharifying: Pancreatin[b2)c1)] 7.0	Starch: Diastase[b2)] 5.0
Control[d)]				100	100	100
錦紋系						
I	糖　黄	甘粛または青海産		67.7	51.2	100.0
II	六成中吉			70.0	21.7	98.5
III	六成　片			67.7	32.5	99.9
IV	七成　片			66.8	44.1	100.0
V	八成中吉			61.4	34.6	99.9
VI	八成小吉			65.2	33.8	98.9
VII	九成中吉			81.0	51.6	100.0
VIII	九成小吉			68.7	29.8	100.0
IX	小　小吉			76.3	5.2	95.0
X	統　貨			69.6	48.3	100.0
XI	水　根			72.2	28.8	100.0
雅黄系						
XII	一　等	四川産		45.6	26.8	100.0
XIII				60.9	30.6	96.4
XIV	二　等			55.7	4.8	95.2
XV				65.1	30.5	99.4
XVI				51.6	23.0	92.8
XVII	三　等	広東産		66.9	18.7	97.0
XVIII				59.9	20.3	98.2
XIX				44.6	24.8	98.0
XX				63.5	27.5	96.4
XXI	軽　身			56.3	16.4	98.9
北海大黄						
XXII	根茎部	北海道産		85.1	50.1	100.0
XXIII				62.3	40.7	97.5
XXIV				57.6	46.2	91.8
XXV	根　部			57.1	35.3	94.9
XXVI				57.3	28.2	93.7
XXVII				63.0	32.5	97.5
XXVIII				60.8	25.1	93.7
XXIX	根茎部			61.0	48.5	96.2
XXX	根　部			52.9	25.4	94.3
XXXI				60.3	28.9	93.7
XXXII				58.6	37.5	97.5
XXXIII		岐阜県産		70.0	32.1	99.9
XXXIV	根茎部			73.1	45.6	98.0

a) Enzyme activities were determined by the methods described in the Experimental section.
b) The concentration of each enzyme solutin was as follows : b1)0.1%, b2)0.05%, b3)0.2%, b4)
c) Five mg/ml of crude drug were added to the enzyme solution except c1)(1 mg/ml) and c2)
d) No crude drug added.

on Various Digestive Enzymes

Residual enzyme activity(%)[a]				
dextrinizing	Protein peptic		Lipid peptic	Cellulose saccharifying
Pancreatin[b2)c1)] 7.0	Biodiastase[b3)] 3.0	Pancreatin[b2)] 8.5	Pancreatin[b4)c2)] 8.0	Biodiastase[b1)c1)] 4.5
100	100	100	100	100
32.4	89.7	37.1	82.0	73.6
9.8	93.7	22.9	51.3	70.0
12.2	92.5	21.7	57.8	70.9
35.8	94.9	38.3	84.6	84.5
16.2	90.9	32.8	82.1	68.2
18.3	94.9	32.9	73.2	73.9
42.1	92.1	43.8	82.1	67.9
20.4	94.9	25.4	77.8	53.9
3.6	89.7	15.9	42.6	66.7
60.0	100.0	45.8	100.0	81.2
32.8	94.5	31.3	87.8	74.2
10.7	99.6	21.7	84.2	50.0
11.3	89.3	25.8	75.0	68.2
1.0	88.1	13.8	65.6	64.2
16.3	90.3	30.4	88.0	77.9
3.9	100.0	20.8	74.5	52.4
2.2	95.6	20.0	66.8	60.9
5.4	89.3	24.0	78.1	79.7
11.2	87.4	18.3	71.7	52.1
27.0	100.0	30.8	70.5	89.7
19.4	87.7	24.8	66.4	44.5
62.5	94.6	52.1	100.0	100.0
36.8	93.1	36.5	93.3	74.6
39.2	95.5	41.6	90.5	76.5
29.6	100.0	39.7	74.4	77.3
13.7	100.0	30.2	81.3	76.0
18.8	99.1	38.6	79.4	77.8
17.3	94.6	38.9	84.4	72.6
44.9	100.0	43.5	87.5	83.3
19.1	100.0	37.0	74.7	77.3
15.9	92.2	37.2	78.0	71.2
23.5	100.0	33.2	100.0	72.3
30.1	92.1	36.3	95.1	61.2
45.4	93.3	53.8	100.0	78.7

1.0%.
(10 mg/ml).

2　酵素活性の測定

各酵素の活性測定法は、酵素製剤の力価検定法として現在一般に用いられている統一試験法（胃腸薬製造承認基準[6]中の消化力試験法[7]）を準用した。消化力試験は、でんぷん糖化力、でんぷん糊精化力、たん白消化力、脂肪消化力、せんい素糖化力について行った。各酵素溶液の濃度は、活性値の増加が酵素濃度に比例する範囲内とした。ダイオウ試料は、水で一定濃度に溶かし、酵素溶液に作用させた。なお、反応液のｐＨは各酵素の至適ｐＨ付近で行った。すなわち、ジアスターゼ、ビオジアスターゼ、タカジアスターゼ、β－アミラーゼのでんぷん消化力はｐＨ 5.0、パンクレアチン、α－アミラーゼのでんぷん消化力はｐＨ7.0、 ビオジアスターゼ、タカジアスターゼのたん白消化力はｐＨ 3.0、パンクレアチンのたん白消化力はｐＨ 8.5、トリプシン、α－キモトリプシンのたん白消化力はｐＨ 7.5、パンクレアチンの脂肪消化力はｐＨ 8.0、ビオジアスターゼのせんい素糖化力はｐＨ 4.5でそれぞれ検討した。

結　　果

1　ダイオウの各種消化酵素におよぼす影響

各種ダイオウの消化酵素によるでんぷん消化力（糖化力と糊精化力）、たん白消化力、脂肪消化力、せんい素糖化力におよぼす影響を検討した。結果をTable 18に示した。酵素は、胃腸薬に配合されることが多いジアスターゼ、ビオジアスターゼおよびパンクレアチンを用いた。でんぷん糖化力は、ジアスターゼ、パンクレアチンとも活性低下が認められたが、その低下はパンクレアチンの方が顕著で、コントロールに比べて５～52％に低下した。でんぷん糊精化力は、ジアスターゼの場合ほとんど影響を受けないが、パンクレアチンではでんぷん糖化力と同様、１～63％に低下した。また、たん白消化力は、ビオジアスターゼの場合ほとんど影響を受けないが、パンクレアチンでは活性低下が著しく、14～54％に低下した。また、パンクレアチンの脂肪消

Table 19. Effects of Rhubarbs on α-Amylase and Proteases

Activity tested	Residual enzyme activity(%)[a]			
	Starch dextrinizing		Protein peptic	
Sample[b]	α-Amylase[c] [d1]		Trypsin[d2]	α-Chymotrypsin[d2]
	5.0	7.0	7.5	7.5
Control[e]	100	100	100	100
I	19.7	34.7	59.1	86.4
II	5.7	15.8	29.0	47.5
III	11.1	23.3	49.2	60.4
IV	23.7	50.0	92.8	95.4
V	20.8	40.7	58.7	72.8
VI	15.1	31.2	68.4	66.2
VII	37.6	63.9	77.2	92.5
VIII	16.1	36.1	68.3	60.0
IX	0.0	2.2	33.6	15.4
X	37.7	54.2	82.5	88.8
XI	17.2	29.7	75.4	72.7
XII	5.4	18.8	64.5	40.7
XIII	5.7	19.3	72.0	54.5
XIV	3.8	10.4	54.2	34.6
XV	12.2	35.6	68.4	53.8
XVI	2.9	7.4	41.2	32.7
XVII	0.7	13.4	60.7	45.3
XVIII	8.8	16.9	58.6	39.6
XIX	2.2	11.4	74.1	48.3
XX	24.4	31.6	70.0	68.3
XXI	5.7	23.8	61.3	51.4
XXII	44.1	70.4	94.8	90.8
XXIII	15.7	25.6	74.1	88.7
XXIV	22.5	39.6	89.1	85.4
XXV	12.8	25.6	82.2	77.0
XXVI	11.8	24.4	70.5	67.0
XXVII	14.1	23.6	81.5	72.6
XXVIII	16.0	25.2	88.1	75.3
XXIX	33.5	50.0	92.2	87.2
XXX	12.8	22.8	84.8	75.1
XXXI	9.6	20.4	89.5	74.7
XXXII	14.7	27.2	79.0	71.0
XXXIII	15.4	35.1	92.4	79.9
XXXIV	22.2	64.3	94.1	91.5

a) Enzyme activities were determined by the methods described in the Experimental section.
b) Five mg/ml of crude drug were added to the enzyme solution.
c) from *Bacillus* species.
d) The concentration of each enzyme solutin was as follows: d1)0.01%, d2)0.002%.
e) No crude drug added.

化力、ビオジアスターゼのせんい素糖化力もそれぞれ若干の活性低下が認められた。なお、パンクレアチンの各作用におよぼすダイオウの影響を検討した結果、同一条件ではでんぷん糖化力が最も強く阻害された。

2　アミラーゼおよびプロテアーゼへの影響

各種消化酵素活性が、ダイオウの存在により減弱することから、単一酵素としてアミラーゼおよびプロテアーゼを選び、ダイオウの影響について検討した。結果をTable 19に示した。反応ｐＨは、各酵素の至適ｐＨ付近として行ったが、*Bacillus*属由来のα－アミラーゼは、同濃度においてpH 5.0とpH 7.0 での活性がほぼ等しいことから、両ｐＨにおけるアミラーゼ活性への影響を検討した。α－アミラーゼの活性は、反応液のｐＨが7.0よりも5.0の方が強い阻害を受け、pH 5.0では活性が０～44%に低下した。またpH 5.0で著しい活性低下を示した試料ほど、pH 7.0においても強い活性低下が認められた。一方、プロテアーゼに対してはα－アミラーゼほど顕著な活性低下は認められなかったが、トリプシンで29～95%、α－キモトリプシンで15～95%に低下した。

各酵素に対して、中程度の阻害活性を示したダイオウ試料IIを用いて、詳細な検討を行った（Fig.25～27）。なお、各酵素溶液の濃度は、でんぷん糖化力はジアスターゼ0.15%、でんぷん糊精化力はジアスターゼ 0.1%、たん白消化力はパンクレアチン0.05%を基準として、ほぼ同程度の比活性となるように各酵素溶液を調製した。Fig.25で、でんぷん糖化力におよぼす影響を検討した結果、微生物由来のビオジアスターゼ、タカジアスターゼ等は、ダイオウ 10mg/mlによってもほとんど活性低下はみられなかった。しかし、精製アミラーゼではいずれも強い活性阻害が認められ、とくにブタ膵臓由来のα－アミラーゼで最も顕著であった。Fig.26で、でんぷん糊精化力におよぼす影響を検討した結果、ジアスターゼ、ビオジアスターゼ、タカジアスターゼは影響を受けにくいが、パンクレアチンおよびα－アミラーゼで活性低下が著しく、ブタ膵臓由来のα－アミラーゼでは、ダイオウ 1mg/mlによって完全に失活した。さらに、Fig.27で、たん白消化力におよぼす影響を検討し

た結果、タカジアスターゼは活性低下がわずかであるのに比べて、やはり、パンクレアチンでは阻害効果が大きく、ダイオウ 10mg/mlによって約20%に低下した。精製プロテアーゼもパンクレアチンと同様の傾向を示したが、活性低下はα－キモトリプシンよりもトリプシンでやや大となった。

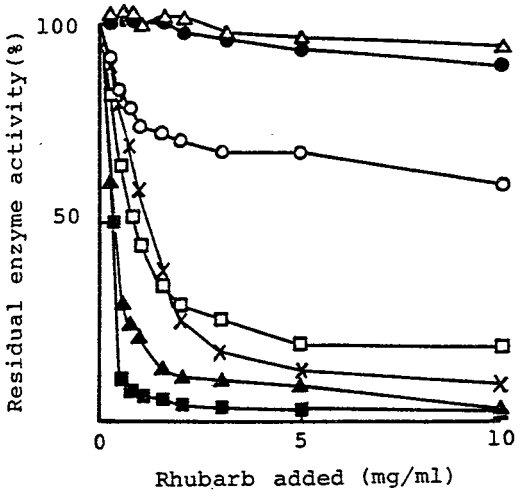

Fig. 25

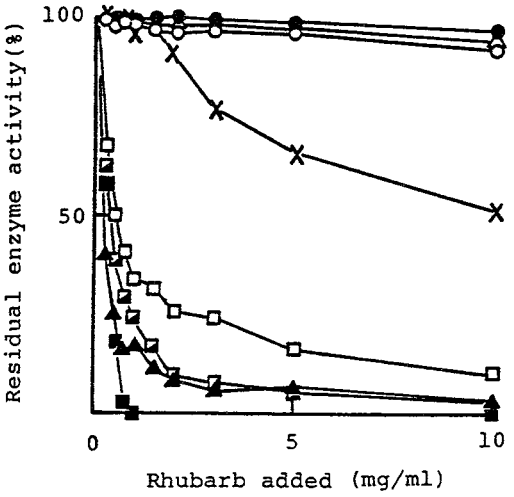

Fig. 26

Fig. 25. Effects of Rhubarb on Saccharification by Various Enzymes
Starch saccharifying activities of crude digestive enzymes and amylases were assayed in the presence of varying concentration of rhubarb(sample II) solution according to the method described in the Experimental section. ○, diastase; ●, biodiastase; △, takadiastase; ▲, pancreatin; □, α-amylase from *Bacillus* species; ■, α-amylase from porcine pancreas; ×, β-amylase from barley.

Fig. 26. Effects of Rhubarb on Dextrinization by Various Enzymes
Starch dextrinizing activities of crude digestive enzymes and amylases were assayed in the presence of varying concentration of rhubarb(sample II) solution according to the method described in the Experimental section. ○, diastase; ●, biodiastase; △, takadiastase; ▲, pancreatin; □, α-amylase from *Bacillus* species; ■, α-amylase from porcine pancreas; ×, β-amylase from barley.

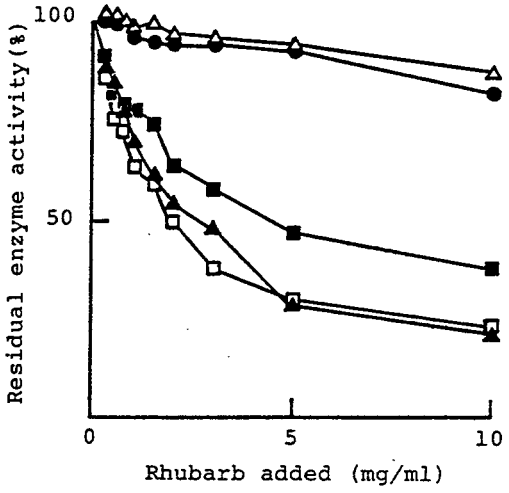

Fig. 27. Effects of Rhubarb on Proteolysis by Various Enzymes
Proteolytic activities of crude digestive enzymes and proteases were assayed in the presence of varying concentration of rhubarb (sample II) solution according to the method described in the Experimental section. 0.05M Lactate buffer, pH 3.0(for biodiastase and takadiastase), 0.05M phosphate buffer, pH 8.5 (for pancreatin) and 0.05M phosphate buffer, pH 7.5(for trypsin and α-chymotrypsin) were used. ●, biodiastase; △, taka-diastase; ▲, pancreatin; □, trypsin; ■, α-chymotrypsin.

3　酵素活性への影響とフォリン反応陽性物質との相関性の検討

ダイオウ試料中には多量のフォリン反応陽性物質が認められ、本物質の含量により各酵素の活性値が変動することが考えられた。そこで、各試料中のフォリン反応陽性物質の量を測定し（Table 20）、各酵素の残存活性値　（Table 18、19）との間の相関性を検討した（Fig.28～30）。その結果、全体にフォリン反応陽性物質が多い試料ほど、活性を強く低下させることが認められた。また、一般に本物質は錦紋系ダイオウで比較的少なく、雅黄系ダイオウで多いことが確認された（660 nmでの吸光度の平均値は、錦紋大黄が 0.309、雅黄が 0.655。）。 そこで、試料を錦紋系と雅黄系、さらに北海大黄とに分別し、各々についてフォリン反応陽性物質含量と活性値との相関性について検討した。

Table 20. Absorbance at 660 nm of Various Rhubarb Samples by the Folin-Ciocalteau Reagent

Sample[a)]	A_{660}[b)]	Sample[a)]	A_{660}[b)]
I	0.285	XVIII	0.654
II	0.332	XIX	0.709
III	0.308	XX	0.434
IV	0.382	XXI	0.724
V	0.444		
VI	0.303	XXII	0.225
VII	0.222	XXIII	0.435
VIII	0.318	XXIV	0.311
IX	0.327	XXV	0.450
X	0.201	XXVI	0.560
XI	0.281	XXVII	0.387
		XXVIII	0.481
XII	0.567	XXIX	0.255
XIII	0.629	XXX	0.489
XIV	0.930	XXXI	0.489
XV	0.485	XXXII	0.450
XVI	0.672	XXXIII	0.517
XVII	0.744	XXXIV	0.210

a) Three mg of crude drug were added to 22 ml of water, shaken well for 10 min, and filtered. The filtrate was used for the color reaction with Folin-Ciocalteau reagent.
b) Absorbance at 660 nm was determined by the method described in the Experimental section.

Fig.28で、消化酵素の各作用について検討した。そのうち、たとえばパンクレアチンのたん白消化作用では、両者の間の相関係数は、①全試料については −0.670であるが、 ②錦紋大黄（Ⅰ～XI）では −0.412（フォリン反応陽性物質含量を示す660 nmでの吸光度をｘ軸、残存活性をｙ軸とすると、回帰直線ｙ＝−57.7ｘ＋49.5）、 ③雅黄（XII～XXI）では−0.886（ｙ＝−33.2ｘ＋44.8）、 ④北海大黄（XXII～XXXIV） では、−0.889（ｙ＝−51.7ｘ＋60.8）となった。 錦紋系についての相関は低いが、 ⑤IVおよびＶを除いた場合の係数は−0.911（ｙ＝−202ｘ＋88.7）となり、高い負の相関が得られた。 なお、⑥これら２試料を雅黄系に加えた場合 −0.921（ｙ＝

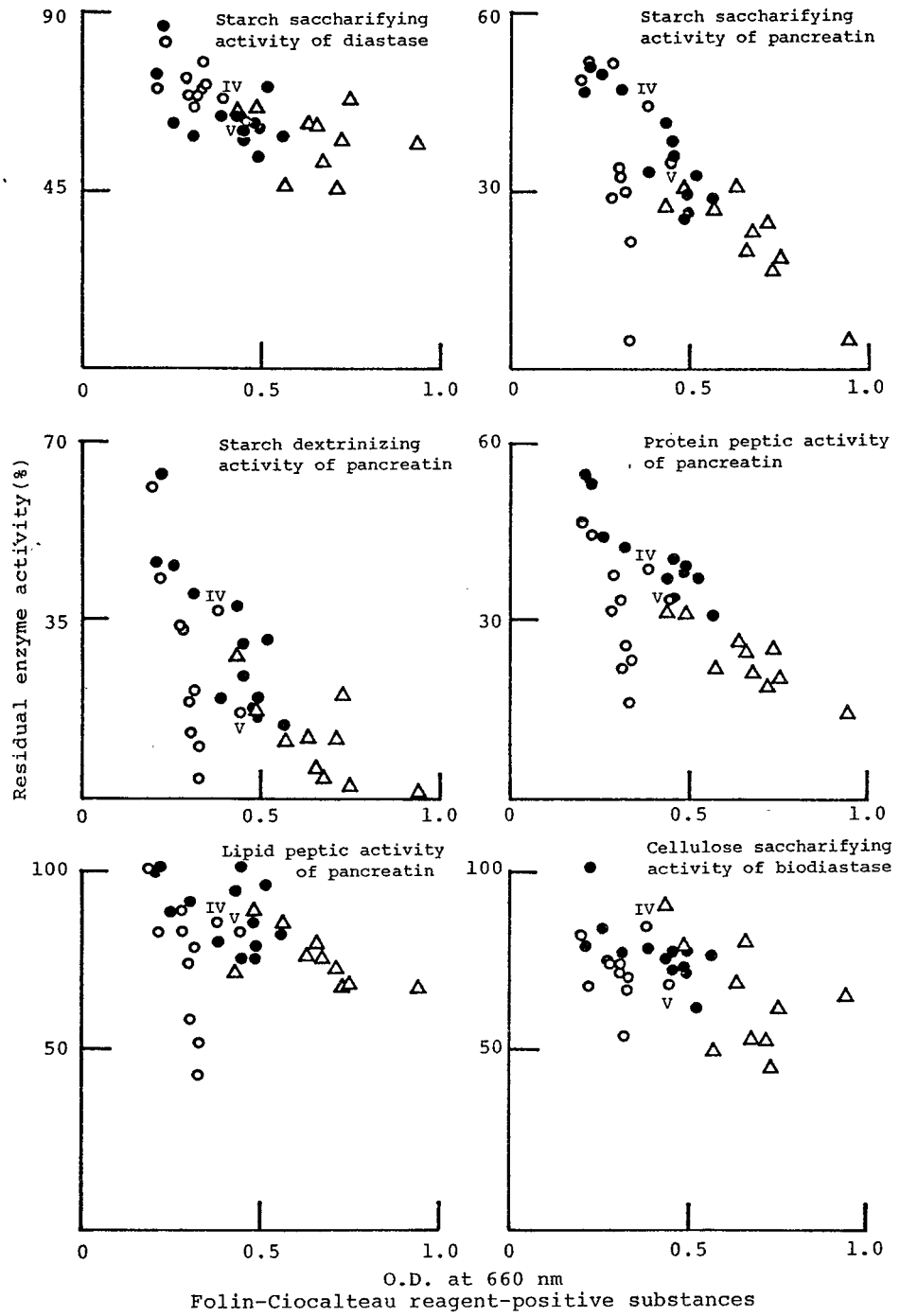

Fig. 28. Relationship between Various Didestive Enzyme Activities and Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Rhubarb

Enzyme activity was determined by the methods described in Experimental section. ○, Kinmon daiwo; △, Gawo; ●, Hokkai daiwo.

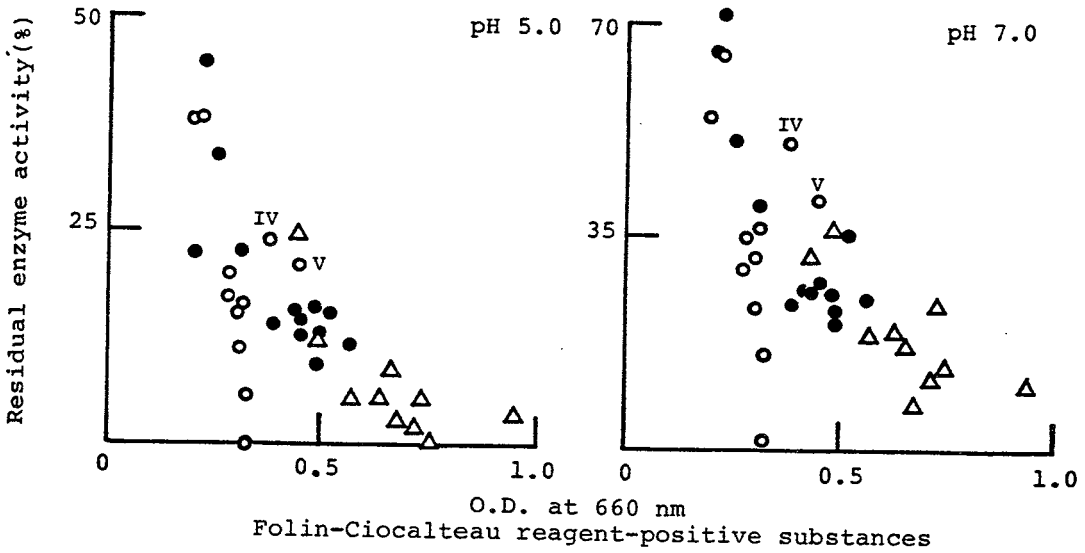

Fig. 29. Relationship between Amylase Activity and Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Rhubarb

Starch dextrinizing activity of α-amylase(from *Bacillus* species) was determined by the method described in Experimental section. pH of reaction mixture was adjusted at pH 5.0(0.1N sodium acetate buffer was used.), or 7.0 (0.1N phosphate buffer was used.).
○,Kinmon daiwo;△,Gawo; ●,Hokkai daiwo.

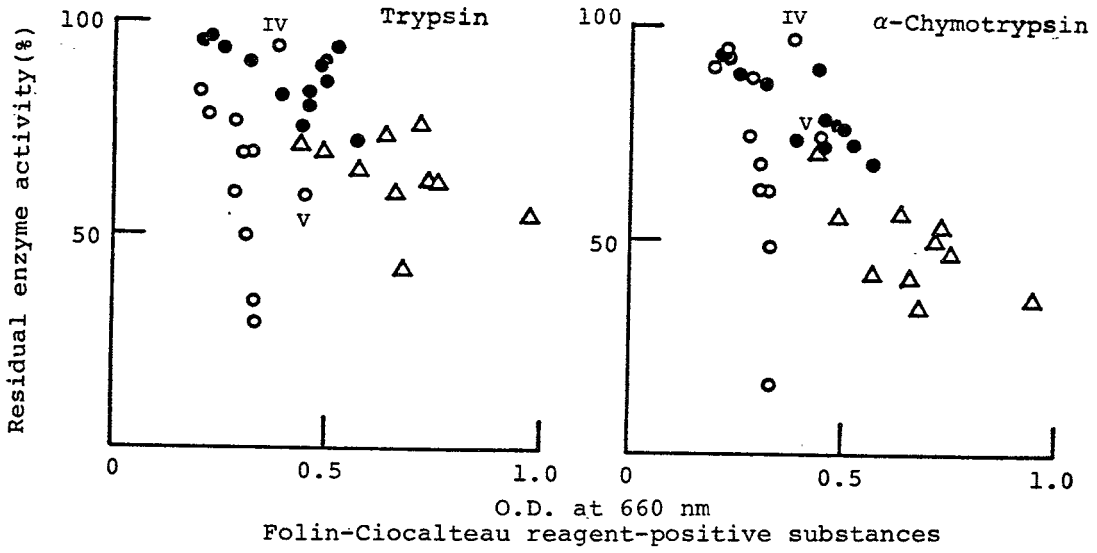

Fig. 30. Relationship between Protease Activity and Folin-Ciocalteau Reagent-Positive Substances in Rhubarb

Proteolytic activities of trypsin and α-chymotrypsin were determined by the method described in Experimental section.
○,Kinmon daiwo; △,Gawo; ●,Hokkai daiwo.

−40.1x＋49.8）となり、③と比較してあまり差がない。この傾向は他の酵素についてもほぼ同様に認められ、パンクレアチンのでんぷん糖化作用についても、 ①−0.705、②−0.360（y＝−74.6x＋57.8）、③−0.866（y＝−48.1x＋53.8）、④−0.884（y＝−67.0x＋63.7）、⑤−0.762（y＝−250x＋105）、⑥−0.909（y＝−56.7x＋66.0） となり、②よりも⑤が相関性が大で、また③と⑥が同程度であった。このことは、アミラーゼおよびプロテアーゼについても同様で（Fig.29、30）、とくに*Bacillus*属由来のα−アミラーゼ（pH 5.0で測定）では、⑤が−0.953（y＝−265x＋93.7）で、極めて高い相関が得られた。ところで、雅黄と北海大黄とでは回帰直線に大きな違いは認められなかったが、フォリン反応陽性物質含量は 0.5付近を境として雅黄で多く、北海大黄で少ないことが判明した。

Table 21. Effects of Some Components of Rhubarbs on Proteolytic Activity of Pancreatin

Compound[a)]	Residual enzyme activity(%)
Control[b)]	100
Sennoside A	97.3
Sennoside B	86.0
Rhein	99.0

a) 0.02 mg/ml of each compound was added to the enzyme solution.
b) No compound was added.

4　ダイオウ中の主成分と酵素活性との関係

ダイオウによる酵素活性への影響が、試料中のフォリン反応陽性物質との間に密接な関係があることが認められたことから、阻害の本体がフォリン試薬に反応するものである可能性が考えられた。ダイオウ成分中の瀉下成分である sennoside 類、その他による活性への影響をも考え、sennoside A 、sennoside B 、および rheinを用いてパンクレアチンのたん白消化作用におよぼす影響を検討した（Table 21）。その結果、これら化合物による活性低下はわずかであり、また成分含量と酵素活性値との間の相関性も認められな

かったことから、これらの成分はダイオウ中の阻害物質とは関連がないことが確認された。

考　察

ダイオウは、ゲンチアナ、カンゾウ、ケイヒ、オウバク等の健胃生薬に比べて、消化酵素に配合された処方は少なく、現在、市販胃腸薬中の７％に配合されている[1]。しかし、ダイオウは緩下薬として単用する機会も多く、生体酵素に与える影響を考慮する必要があることから、種々の酵素活性におよぼす影響について検討した。

今回の検討で、ダイオウは一部の酵素の作用を除いて、でんぷん、たん白、脂肪、せんい素の各消化酵素活性に対して阻害が認められた（Table 18）。とくに、でんぷん消化作用はビオジアスターゼ、タカジアスターゼなどの粗製酵素剤以外は、わずかなダイオウの存在で活性が低下した（Fig.25、26）。村田らは、ケイヒによる種々のアミラーゼ活性阻害作用について、Somogyi-Nelson法を用い、同一ｐＨにおいて検討し、やはり、活性の低下はジアスターゼで大きくビオジアスターゼで小さいことを報告している[45]。　一方、本節では、ダイオウによるでんぷん消化酵素の抑制効果が、同一酵素に対しても糖化力と糊精化力という測定方法の相違、さらには反応ｐＨの差によっても異なることを明らかにした。ところで、ダイオウがアミラーゼ、プロテアーゼ等の精製酵素の活性も顕著に抑制したことから（Table 19、Fig.25～27）、消化酵素に配合した場合の、酵素におよぼす影響だけでなく、投与した際、種々の生体酵素に与える影響についても検討する必要があると思われた。

Fig.28～30で、ダイオウ中のフォリン反応陽性物質の量と残存酵素活性値との相関を詳細に検討したが、試料を品種ごとに分別した場合、この相関は雅黄と北海大黄でとくに顕著で、錦紋についても２試料（IV、Ｖ）を除けば極めて高い相関係数が得られた。この錦紋大黄の２試料を雅黄に含めて同様

に検討しても、雅黄のみについての相関係数および回帰直線にはほとんど変化がみられず、したがって、この２試料は雅黄に近似のものであることが示唆された。また、各試料中のフォリン反応陽性物質含量の差から、雅黄と北海大黄の分類が可能となることが示唆された。なお、上記の相関が比較的顕著に確認された酵素作用はパンクレアチンのでんぷん糖化作用と糊精化作用およびたん白消化作用であった。

第４節　ケイヒ中の酵素阻害物質の諸性質

３節までで、ケイヒ、サンショウ、ダイオウ等に存在するフォリン反応陽性物質が酵素阻害と関連があることが示唆された。そこで、これらの酵素活性を強く抑制した生薬のうち、極めて重要で最も需要が多く、また食品中にも添加されることが多いケイヒについて、酵素阻害物質の性質の究明および検索を行った。

植物中の酵素活性阻害因子としては、タンニンやたん白性の酵素阻害物質などが考えられる。ケイヒ中の酵素阻害物質については、フォリン反応陽性物質との関連性からタンニン様の物質であることが推察されたが、その本態について、さらに詳細に検討を行った。

材料および方法

１　実験材料

ケイヒ：試料は、第３章第１節において、たん白消化活性を最も強く抑制した桂衣砕を用いた。なお、本試料は粉末にしたのち、300μm の篩を通し、粒度を均一にした。

酵素：パンクレアチン（ウシ膵臓由来）、トリプシン（Sigma 社製、２回再結晶、ウシ膵臓、12,000 BAEE units/mg)、 α－キモトリプシン（Sigma

社製、ウシ膵臓、３回再結晶、46 units/mg)、カルボキシペプチダーゼＡ（Sigma社製、２回再結晶、46 units/mg）サブチリシンＢＰＮ'（Sigma社製、再結晶、*Bacillus amyloliquefacience* 11 units/mg）、パパイン、ブロメライン、ペプシン（いずれも片山化学製）を用いた。

２　酵素活性の測定

パンクレアチンの酵素活性の測定は、第１章第１節のとおり行った。

また、パンクレアチン以外のプロテアーゼの活性測定には、パンクレアチン溶液のかわりに種々のプロテアーゼをパンクレアチン0.05％濃度での活性とほぼ同程度になるように酵素溶液を調製した。なお、カゼイン溶液のｐＨはトリプシン、α－キモトリプシン、サブチリシン、パパイン、カルボキシペプチダーゼＡに対しては 7.5、ブロメラインには 4.5、ペプシンには 1.2 に調整して用いた。

３　抽出および透析

ケイヒ１ｇをとり、25％エタノール溶液50mlを加えて水浴上で２時間還流した。エタノールを蒸発させ、水を加えて50ml（ケイヒ末 20mg/mlの抽出液に相当する）とし、透析チューブ（内径28.6mmのビスキングセルロースチューブ）に入れ、1,000 mlの蒸留水に対して５℃で24時間透析した。外液は褐色の着色物質が透析チューブから溶出しなくなるまで数回とりかえ、外液を集めて50mlになるまで減圧濃縮した。内液と濃縮した外液の各１mlをとり、パンクレアチンのたん白消化活性におよぼす影響を調べた。

４　皮粉処理

タンニン物質を吸着除去する方法として、ALCA公定法[46]による皮粉処理を行った。活性化した皮粉（乾燥品４ｇ相当量）を４等分し、各々に前記の透析操作で得られた内液、外液、未透析液（ケイヒ末 20mg/mlの抽出液に相当する）および 0.1％局方タンニン溶液（１ mg/ml）16mlを加え、25℃で10分間振とうしたのち、皮粉と接触15分後に濾過し、濾液各々１mlをとりパンクレアチンのたん白消化活性におよぼす影響を調べた。

５　プロナーゼ処理

阻害物質に対するプロナーゼ処理の影響を検討するため、長時間プロナーゼと接触させ、阻害活性の変化を検討した。反応混液は、0.1 M リン酸抽出液（pH8.0）3.9 ml （ケイヒ末200 mgに相当する）と 0.8%プロナーゼ溶液 0.1 ml（800 μg）とし、37℃でインキュベートした。5時間毎に35時間まで反応混液から0.1 ml（ケイヒ末5 mgとプロナーゼ20μg、すなわち15チロシン単位に相当する）をとり、パンクレアチンのたん白消化力の変化を調べた。

結　果

1　ケイヒ成分のパンクレアチンたん白消化活性におよぼす影響

まず、ケイヒ試料を日局生薬試験法中の精油定量法を用いて、精油成分、水溶性成分および残渣とに分離し、各成分の酵素活性におよぼす影響を検討した。結果をTable 22に示した。活性低下は、試料の水溶性部分に最も強く認められ、残渣にも若干認められたが、精油成分には活性抑制作用は認められなかった。さらに、ケイヒ中の主成分であるケイヒ酸、ケイヒ酸メチル、ケイヒアルデヒド、ケイヒアルコールの4成分について、パンクレアチンのたん白消化活性におよぼす影響を検討した（Table 23）。その結果、0.1mg/

Table 22. Effect of Each Fraction of Cinnamon Bark on the Proteolytic Activity of Pancreatin

Added[a]	Residual enzyme activity(%)[b]
None[c]	100.0
Volatile oil fraction	100.0
Water-soluble fraction	75.9
Residual fraction	80.7

a) Each fraction corresponding to 5 mg of original cinnamon bark sample was added to the enzyme solution.
b) Enzyme activity was determined by the Casein-Folin method. Each value represents the relative remaining activity(%).
c) No fraction was added.

Table 23. Effect of Various components of Cinnamon Bark on the Proteolytic Activity of Pancreatin

Compound[a]	Residual enzyme activity(%)[b]
Control[c]	100.0
Cinnamic acid	101.9
Methyl cinnamate	90.6
Cinnamaldehyde	97.2
Cinnamyl alcohol	105.3

a) 0.1 mg/ml of each compound was added to the enzyme solution.
b) Enzyme activity was determined by the Casein-Folin method. Each value represents the relative remaining activity(%).
c) No compound was added.

Table 24. Localization of Antiproteolytic Activity of Cinnamon Bark after Dialysis

Added[a]	Residual enzyme activity(%)[b]
None[c]	100.0
25% Alcohol extract	6.6
Inner solution	37.5
Outer solution	67.6

a) Each solution corresponding to 20 mg of original cinnamon bark sample was added to the enzyme solution.
b) Enzyme activity was determined by the Casein-Folin method. Each value represents the relative remaining activity(%).
c) No fraction was added.

tube（ケイヒ５mg中に最高２％含有されると仮定したときの量）の添加でも活性低下はほとんど認められず、これらの物質が阻害物質とは異なるものであることが判明した。

２　ケイヒ抽出液の透析

実験方法で記した操作にしたがい、ケイヒの25%エタノール抽出液を透析した液について、パンクレアチンのたん白消化活性におよぼす影響を検討し

た（Table 24）。その結果、透析内液・外液のいずれによっても酵素活性阻害が認められ、しかも内液の方が強く活性を阻害した。同様な透析条件で、ケイヒ中の抗トリプシン作用をもつ物質が透析膜を完全に通過するという古沢らの報告[47]と異なる結果となった。しかし、ケイヒ中のフォリン反応陽性物質はかなり多く透析膜を通過しており、ケイヒ中に存在するプロテアーゼ阻害物質は単一物質ではないことが推察された。

さらに、ケイヒ抽出液をスペクトラポールの透析チューブを用いて分子量1,000 以下、1,000～2,000、2,000～3,500、3,500～8,000、8,000～10,000 、10,000以上に分画し酵素活性に対する影響を検討したところ、各画分に阻害作用が認められた。

3　酸・アルカリおよび熱に対する安定性とプロナーゼ処理

ケイヒ試料中の阻害物質が、高分子（分子量１万以上）のたん白性プロテアーゼインヒビターである可能性も考えられるため、その諸性質について検討した。まず、阻害物質の熱とｐＨに対する安定性を検討した。結果をFig. 31に示した。ケイヒの0.1Mリン酸塩抽出液（pH 8.0）をpH１～11に調整し、100℃ で10時間まで還流を行った結果、酸性、とくにpH 1.0では阻害活性が著しく低下し、不溶性の褐色沈殿物を生じたが、pH 5.0以上では長時間の加熱でも強い阻害を示し、アルカリに対しては極めて安定であった。

つぎに、阻害物質がたん白質あるいはペプチドの場合、通常プロナーゼとの接触により、プロテアーゼに対する阻害活性が低下することから、プロナーゼ処理を行った。結果をFig.32に示した。リン酸抽出液（pH 8.0）にプロナーゼを37℃で35時間まで作用させたが、阻害活性の低下はほとんど認められなかった。なお、プロナーゼの添加量は、一般に植物成分から抽出されるたん白性プロテアーゼインヒビターの阻害効力を数時間で失活させるのに十分な量である。

4　皮粉処理による検討

前章第１節において、ケイヒ中のフォリン反応陽性物質と酵素活性との間に相関関係がみられたことから、阻害物質がタンニン類などのフェノール性

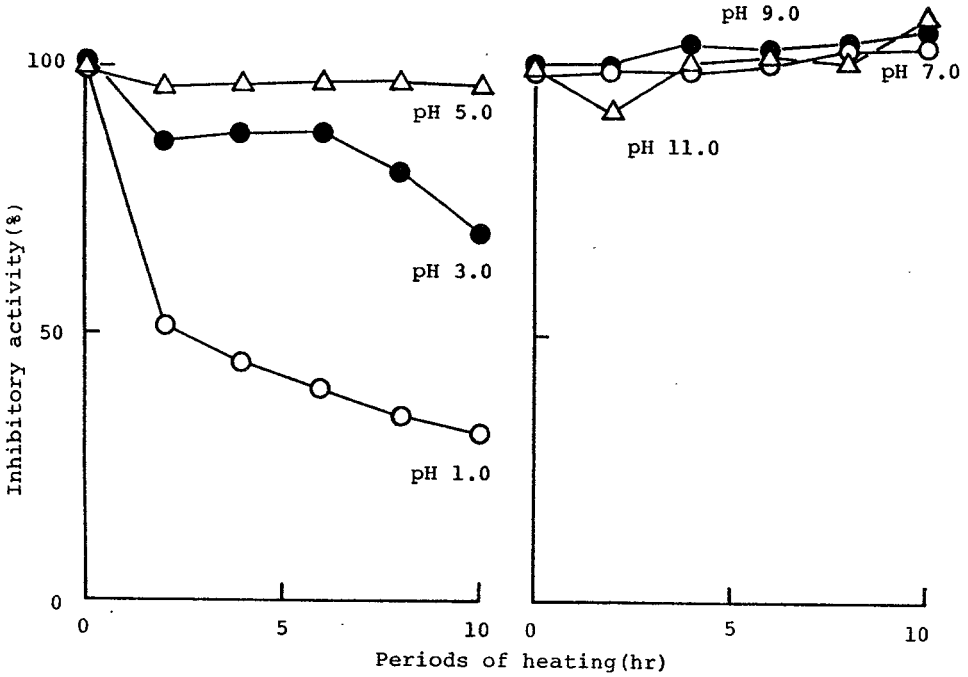

Fig. 31. pH-Stability and Thermo-Stability of Inhibitor

Inhibitor solution was heated at 100℃ for various time intervals at pH indicated. Then an aliquot corresponding to 10 mg/0.38 ml of original cinnamon solution was added to the 0.02 ml of trypsin solution (240 BAEE units) and protease activity was determined.

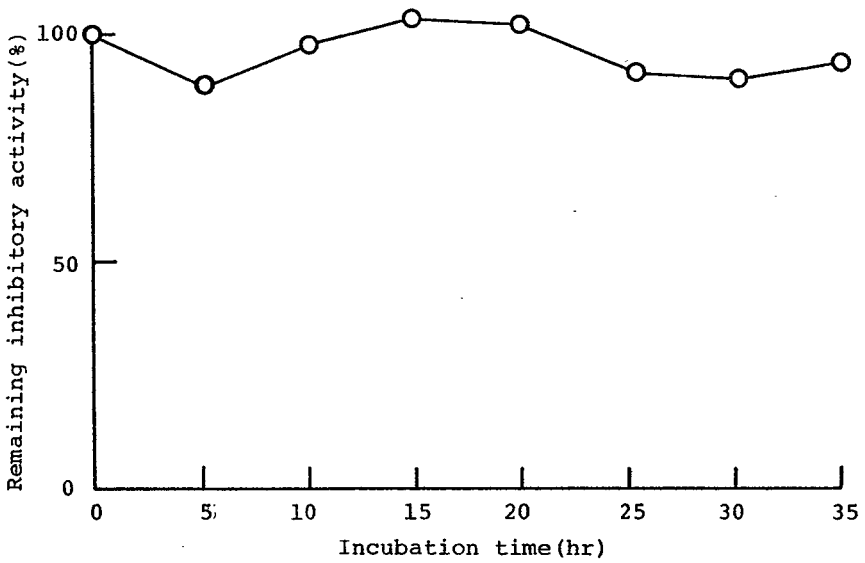

Fig. 32. Pronase Digestion of Inhibitor

The reaction mixture consisted of 0.1 ml of extract(corresponding to 5 mg of original cinnamon bark) and 15 units of pronase.

水酸基をもつ物質であることが考えられた。タンニンは皮粉に特異的に吸着されるため、皮粉法を用いて阻害物質がタンニン関連物質であるかどうかを検討した。結果を Table 25 に示した。25%エタノール抽出液（未透析液）、内液、外液について皮粉処理をしたのち、酵素活性への影響を調べた。外液は処理後、褐色物質が完全に皮粉に吸着され、また活性阻害もほとんど認められなくなった。一方、内液には処理後も褐色物質が存在し、阻害物質はほとんど皮粉に吸着されなかった。したがって、外液すなわち透析膜を通過した褐色物質はタンニンである可能性が強くなったが、内液に含まれる阻害物質は、タンニン以外の物質であることも考えられた。

Table 25. Effect of Hide Powder Treatment of Dialyzed Cinnamon Bark on the Proteolytic Activity of Pancreatin

Added[a]	Residual enzyme activity(%)[b]	
	Without hide powder treatment	With hide powder treatment
None[c]	100.0	100.0
25% Alcohol extract	27.9	32.0
Inner solution	44.8	46.4
Outer solution	79.9	96.9
Tannic acid[c]	92.0	91.5

a) Each solution corresponding to 20 mg of original cinnamon bark sample was added to the enzyme solution.
b) Enzyme activity was determined by the Casein-Folin method. Each value represents the relative remaining activity(%).
c) No fraction was added.
d) One mg of tannic acid was added to the enzyme solution.

5　ケイヒ中の阻害物質に対する阻害様式

ケイヒ中の阻害物質がパンクレアチンのたん白消化作用に対してどのような阻害様式を示すかを、ケイヒ末と透析実験で得た内液・外液を用いて検討した（Fig.33、34）。酵素濃度とケイヒ添加量を一定にして、基質濃度をか

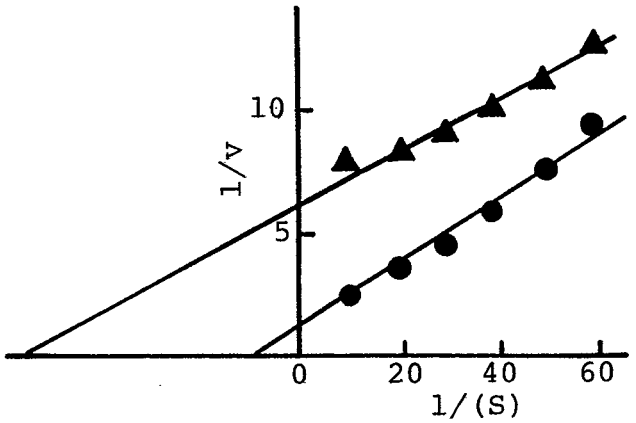

Fig. 33. Lineweaver-Burk Plots of Proteolytic Activity of Pancreatin in the Presence of Cinnamon Bark

●, control; ▲, 5 mg of cinnamon bark were added.

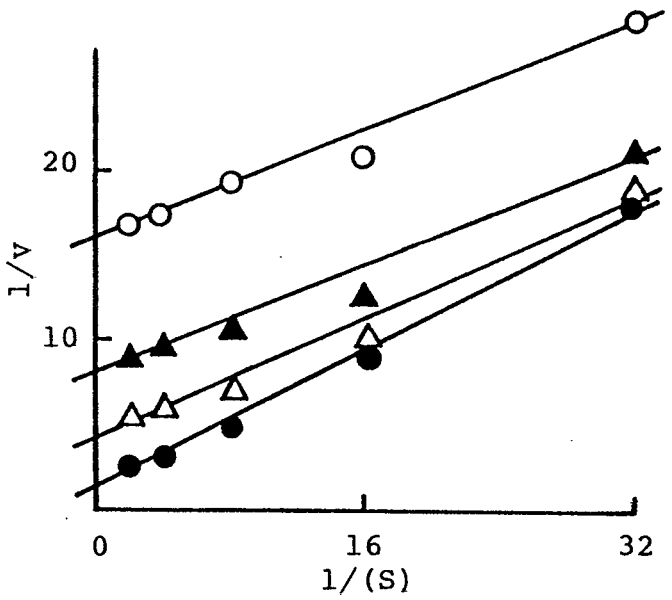

Fig. 34. Lineweaver-Burk Plots of Proteolytic Activity of Pancreatin in the Presence of Dialyzed Cinnamon Bark

●, control; ○, 25% alcohol extract; ▲, inner solution; △, outer solution.

Table 26. Effect of Preincubation of Cinnamon Bark with Substrate on the Proteolytic Activity of Pancreatin

Sample[b]	Assay method	Residual enzyme activity(%)[a]	
		Starch dextrinizing	Protein peptic
Control[c]	Standard method	100.0	100.0
With cinnamon	Standard method[d]	11.9	47.0
	Modified method[e]	69.8	84.0

a) Enzyme activities were determined by the method based on the approval standards for the manufacture and import of gastrointestinal crude drugs.
b) Cinnamon bark from Kwangnan was used.
c) No cinnamon bark added.
d) Cinnamon bark was preincubated with pancreatin for 5 min at 40℃ and then substrate was added.
e) Cinnamon bark was preincubated with substrate for 5 min at 40℃ and then pancreatin was added.

Table 27. Effects of Cinnamon Bark on Various Proteases

Sample[b]	Protease	Residual enzyme activity(%)[a]		
		Trypsin	α-Chymotrypsin	Subtilisin
	pH	7.5	7.5	7.5
Control[c]		100	100	100
Cinnamon bark		16	22	39

Sample[b]	Protease	Residual enzyme activity(%)[a]			
		Papain	Bromelain	Pepsin	Carboxypeptidase A
	pH	7.5	4.5	1.5	7.5
Control[c]		100	100	100	100
Cinnamon bark		56	67	98	20

a) Enzyme activity was determined by the method described in the Experimental section.
Each value represents the relative remaining activity(%).
b) Five mg of cinnamon bark were added to the enzyme solution.
c) No cinnamon bark was added.

えてプロテアーゼ活性の変動を調べた基質濃度曲線からLineweaver-Burk プロットを得た。活性阻害物質は、ケイヒ末、ケイヒ抽出液および透析内液・外液のいずれについても認められ、不拮抗型（Non-competitive） の阻害様式を示した。

さらに、ケイヒ中の阻害物質が酵素とのみ特異的に相互作用するものであるかどうかを、パンクレアチンのでんぷん消化活性とたん白消化活性について検討した。結果をTable 26に示した。ケイヒ末と基質を前処理したのち酵素を添加した場合、酵素にケイヒ末を接触させてから基質を加える標準法に比べて、阻害が緩和された。したがって、阻害物質が必ずしも酵素と特異的に反応していないことが確認された。

6　種々のプロテアーゼに対する影響

ケイヒ中の阻害物質の検討を、今までおもに粗製の酵素混合物であるパンクレアチンを用いて行ってきたが、活性残基の異なるプロテアーゼを用いてケイヒの影響を検討した。結果をTable 27に示した。ケイヒ末の添加によって、セリンプロテアーゼと金属プロテアーゼが強く阻害され、酸性プロテアーゼでは活性低下はほとんど認められなかった。

考　　察

ケイヒ中の薬効成分に関する研究は、従来精油成分（ケイヒ油）が主体であり、これらの成分による中枢抑制作用[48]、 心臓抑制作用[49]、 抗黴抗毒作用[50] 等が知られている。しかし、水溶性成分についての報告は比較的少ない（ケイヒ水製エキスが抗補体作用を有するという報告[51] がある。）。ところで、アルデヒド類は多くのプロテアーゼ剤に対して強力な阻害剤となることが報告されている[52]。 しかし、本節で検討したケイヒ中の酵素阻害物質は明らかに水溶性成分であり、ケイヒの主成分（ケイヒ酸、ケイヒ酸メチル、ケイヒアルデヒド、ケイヒアルコール）とはまったく異なる物質である（Table 23）。

ケイヒ中の酵素阻害物質は、熱やアルカリに対して極めて安定で　(Fig. 31)、また長時間のプロナーゼ処理によっても、活性阻害に影響がみられなかったことから(Fig.32)、たん白性プロテアーゼインヒビターではないことが明らかになった。

また、ケイヒ中の酵素阻害物質はその一部が透析膜を通過することから(Table 24)、本物質は単一構造の分子からなる物質ではないことが示唆された。この阻害物質の透析液を皮粉処理し除タンニンした結果、内液中にも強い阻害活性が認められたことから、この物質は古沢らが検討したタンニンと異なることが推察された。この内液中の阻害物質については、外液中の阻害物質とは①まったく異なるもの、②同じものであるが、重合体などのポリマーを形成している、③この物質と他の大きな分子との結合体、のいずれかであると考えられた。一方、外液中の阻害物質はタンニンである可能性が高くなった。

阻害物質の阻害型式は、その Lineweaver-Burk プロットから不拮抗型であった(Fig.33、34)。また、酵素活性測定の際、阻害物質と基質の添加順序をかえることによって、阻害活性に差が生じたこと、活性残基の異なる多種のプロテアーゼについても阻害が認められたことから、本物質の阻害様式は非特異的なものと考えられる。

第5節　ケイヒ中の酵素阻害物質の抽出・単離

前節までの検討で、ケイヒ中の酵素阻害物質の本態がタンニン関連物質である可能性が考えられたことから、ケイヒ末から阻害活性の強い成分を抽出・単離したのち機器分析を行い、その化学構造の究明を試みた。

材料および方法

1　実験材料

ケイヒ：広南ケイヒ（*Cinnamomum cassia* BLUME）を粉末にしたものを用いた。

2　酵素活性の測定

パンクレアチンの酵素活性の測定は、第１章第１節のとおり行った。抽出過程における阻害活性の測定には、パンクレアチンのでんぷん糊精化力およびたん白消化力に対する抑制を指標とした。

3　高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）による分離

ケイヒ抽出物の単離に用いたＨＰＬＣの測定条件は以下のとおりである。

装置はWaters 600、検出器はLC-Spectrophotometer、カラムはμBondapak C_{18}、μ8-10、7.8 mm×30 cm、移動相はメタノール、流速は１ml/min、注入量は５μlで行った。

4　赤外吸収スペクトル（ＩＲ）

装置は JEOL製 JIR-100（FT-IR）を用い、臭化カリウム法で行った。

5　核磁気共鳴スペクトル（ＮＭＲ）

装置は Bruker製 AM-400を、溶媒はメタノール－d_4、アセトン－d_6＋重水を用いた。

結　果

ケイヒ末３KgをFig.35のように、酢酸エチル、水、エタノール（各３ℓ）の順に室温で抽出した結果、エタノール抽出物30ｇを得た。各抽出物によるパンクレアチンの阻害作用は酢酸エチル抽出物ではほとんど認められず、アセトンおよび水抽出物でわずかでエタノール抽出物で最も強く認められた。

そこで、このエタノール抽出物をセライトカラム（ナカライテスク社製、Celite 545）に負荷し、酢酸エチル、アセトン、エタノールの順に溶出した。各溶媒によって得られた抽出物の酵素活性に対する影響をTable 28に示した。エタノール抽出物（８ｇ）に最も強い阻害作用が認められた。

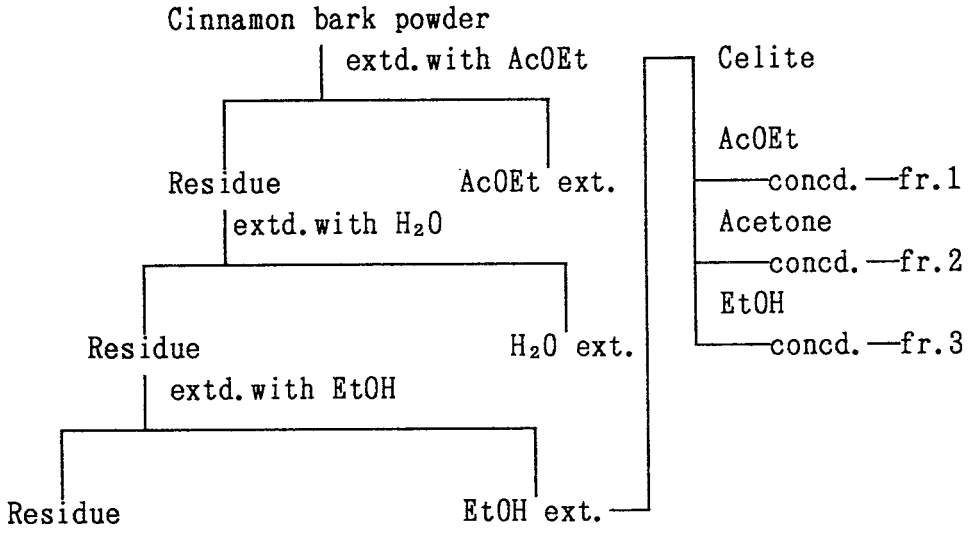

Fig. 35. Extraction of Inhibitor from Cinnamon Bark

Table 28. Effect of Elutes from Celite Column on Enzyme Activities

Fraction[b]	Residual enzyme activity(%)[a]	
	Starch dextrinizing	Protein peptic
Control[c]	100	100
Fr.1 (AcOEt ext.)	37.0	18.7
Fr.2 (Acetone ext.)	26.8	23.7
Fr.3 (Ethanol ext.)	2.0	14.7

a) Each value represents the relative remaining activity(%).
b) One mg of each fraction was added to the enzyme solution.
c) No fraction was added.

ここに得られたエタノール溶出物をさらに Sephadex LH-20 カラム（Pharmacia Fine Chemical 社製、粒径25～100 μm）にかけ、西沢らの五倍子からのガロタンニンの単離法[53] を利用して、メタノール、メタノール－アセトン、メタノール－アセトン－水の溶媒系の順で溶出した結果、最初のメ

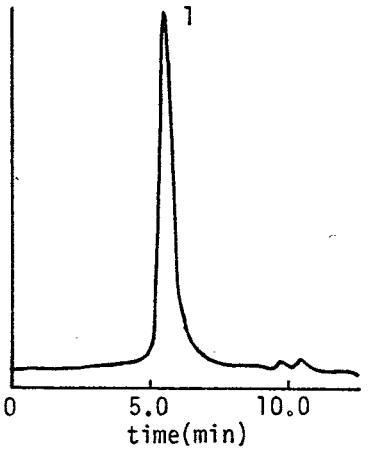

Fig. 36. HPLC of Ethanol Fraction from Celite Column
column, Wacosil 5C18 7.5Φ×300 mm; solvent, methanol;
flow rate, 1.0 ml/min; wave length, 254 nm.

タノール画分（Fr.1、３ｇ）に極めて強い酵素抑制作用が認められた。そこでこのFr.１をＨＰＬＣで分取精製したところ、 Fr.１、0.2ｇから60mgの収量で、極めて強い阻害活性を示す物質（ピーク１）が得られた。そのクロマトグラムをFig.36に示した。この物質について、紫外部吸収スペクトル（ＵＶ）、ＩＲおよびＮＭＲで検討を行った（Fig.37、38）。ＵＶスペクトルでは、285 nm付近に最大吸収が認められた。また、Fig.37のＩＲスペクトルでは、波数1,500cm^{-1}および 1,600cm^{-1} 付近にベンゼン環、 3,400cm^{-1}付近に水酸基の強い吸収がみられた。Fig.38に本物質の ^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルを示したが、分子量が大きく、また測定に必要な試料濃度が得られず明らかな知見は得られなかった。しかし、Morimotoらのケイヒ中のタンニンの化学構造の検討データ[54]から、シンナムタンニンであることが推察された。さらに、^{13}Ｃ－ＮＭＲスペクトルでも検討したが、本物質はサンプル量の関係から、12,000回積算にもかかわらず、明らかなピークは得られなかった。しかし、以上の結果から本物質はフェノール性物質の重合体、すなわちシンナムタンニンＡ$_1$～Ａ$_4$のいずれか、もしくはその類似物質であることが推察された。

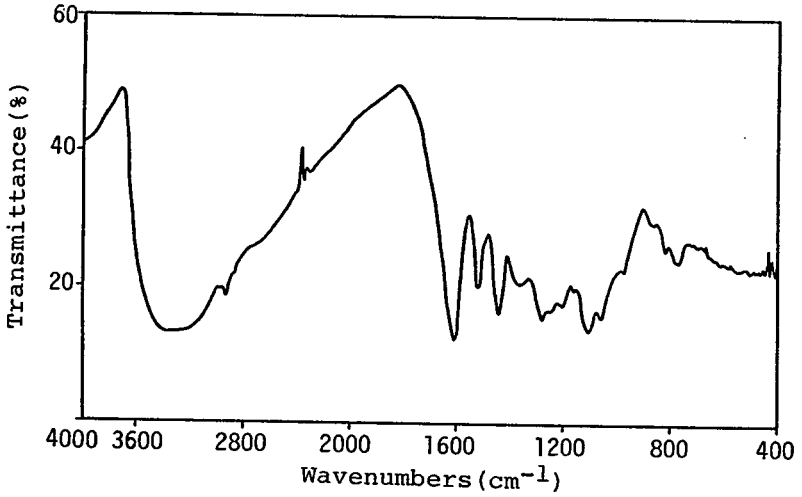

Fig. 37. Infrared Absorption Spectrum of Inhibitor from Cinnamon Bark
IR spectrum was performed by potassium bromide disk method.

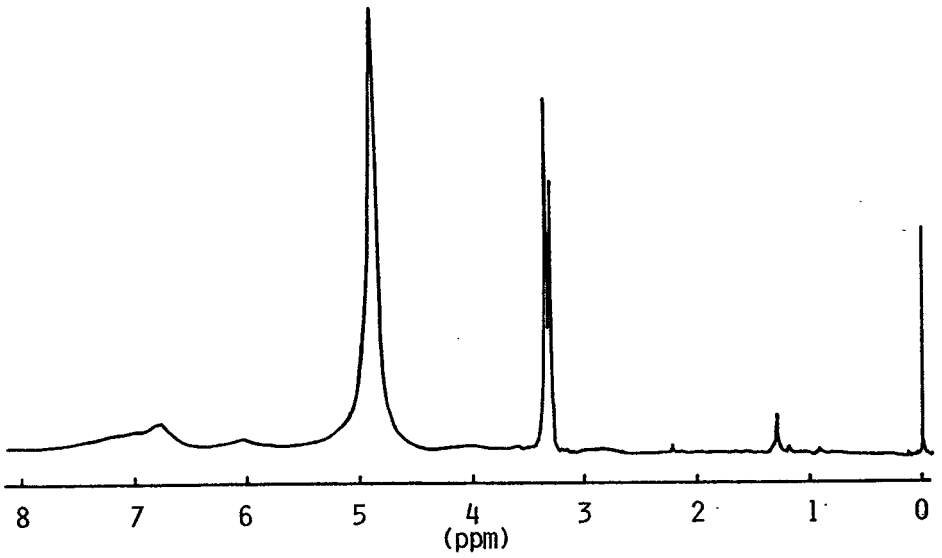

Fig. 38. ^{1}H-NMR Spectrum of Inhibitor from Cinnamon Bark
solvent: Methanol-d_4

考　察

ケイヒ中の酵素阻害物質の抽出操作において、本検討の前に、ケイヒ抽出液をイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルクロマトグラフィーを用いて検討したが、阻害物質は DEAE Sephadex A-25 および Sephadex G-50では完全にカラムに吸着し、CM Sephadex C-25では褐色の着色成分とともにカラムを素通りするなど、分画はできなかった。そこで、エタノール抽出物をセライトに吸着させ溶出後、有機溶媒で分画可能な Sephadex LH-20 カラムを用いて、ある程度の精製が可能となった。さらに、ＨＰＬＣによる分取によって、ほぼ単一物質にまで精製できたが、得られた阻害物質は赤褐色を呈しているが時間の経過とともにやや黒味を帯び、阻害活性もわずかづつ低下することが認められた。この原因は不明であるが、おそらく酸化などによるものと考えられた。

ケイヒ中のタンニンは、エピカテキンが数個重合した縮合型（カテコール）タンニンであることが報告されているが[54]、 今回得られた阻害物質は、ＩＲスペクトルでベンゼン環および水酸基を多く含んでおり、またＮＭＲスペクトルで分子量が比較的大きいことが示唆されたことから、数個のシンナムタンニンのうちのいずれかであると推定される。

第６節　小　括

生薬の品質と酵素活性におよぼす影響との関連について検討した結果、以下のことが判明した。

(1) ケイヒ、サンショウ、ダイオウではフォリン試薬で顕著に呈色を示す生薬試料ほどプロテアーゼ活性低下作用が強い傾向が認められた。

(2) ケイヒでは、品質、産地の違いに関係なく、フォリン反応陽性物質とプロテアーゼ活性抑制とのあいだに高い相関がみられた。

(3) サンショウでは、国産の和山椒と中国産の花椒とで異なる相関が得られ

た。しかし、試料中の精油含量とフォリン反応陽性物質含量との間に高い相関関係が認められた。

(4) ダイオウでは、錦紋大黄、雅黄、北海大黄とで、それぞれ異なる相関が得られた。

(5) 以上のことから、これらの生薬については、試料中のフォリン反応陽性物質の量を測定することにより、生化学的な品質評価の可能性が示唆された。

また、ケイヒ中の酵素阻害物質の諸性質の究明とその抽出・単離を試みた結果、以下のことが判明した。

(6) ケイヒ中の酵素阻害物質は精油成分とは関係ないことが認められた。

(7) ケイヒを塩基性下で加熱、あるいはアルコールの存在、プロナーゼ処理等によっても阻害活性が減弱しないことから、阻害物質はたん白性のインヒビターではないことが判明した。

(8) ケイヒの抽出成分を透析膜で分子量別に分画しても阻害活性が広い範囲に認められたことから、本物質は単一構造の分子からなるものではないことが判明した。

(9) ケイヒによる酵素活性の阻害は、酵素と特異的に反応しておらず、またその阻害様式は不拮抗型を呈した。

(10)ケイヒのエタノール抽出物をセライト、ついでSephadex LH-20カラムで分離分画し、このエタノール溶出画分中の酵素阻害物質をＨＰＬＣで分取精製した結果、本抽出物はフェノール性物質の重合体、すなわちシンナムタンニンA_1～A_4のいずれか、もしくはその類似物質であると推定された。

第４章　ラットの消化酵素活性におよぼす生薬の影響

前章までで、ケイヒ、サンショウなどの生薬が *in vitro* において酵素の活性を抑制することを明らかにしたが、その阻害作用は製剤として配合された酵素だけでなく、実際に、生薬を服用した場合、生体酵素のうちでもとくに最初に出会う、消化管中の消化酵素に対しても認められるかどうか不明であった。しかし、*in vivo* における消化酵素の阻害に関する研究は未だ報告されておらず、この種の研究成果が期待されていた。そこで、ケイヒ、サンショウ等の生薬による生体内酵素への影響を、シロネズミを用いて *in vivo* で検討を行った。

第１節　生薬のラット消化酵素活性におよぼす影響

動物の消化液中には、酵素だけでなく、粘液、胆汁をはじめ種々の分泌物が存在していることから、これらが生薬による酵素阻害効果を減弱させる可能性も考えられる。そこで、まずシロネズミから胃液および腸液を採取して、これらの消化液中の酵素活性におよぼす生薬（ケイヒおよびサンショウ）の影響を *in vitro* で検討した。

材料および方法

１　実験材料

生薬：ケイヒ（*Cinnamomum cassia* BLUME、 中国広南産）とサンショウ（*Zanthoxylum piperitum* DE CANDOLLE、 兵庫県養父郡産）を用いた。各試料はすべて粉末にしたのち、300μm の篩を通して粒度を均一にした。

酵素：胃腸薬に繁用されるジアスターゼ（大麦由来）、ビオジアスターゼ

2,000（*Aspergillus oryzae* 由来）、パンクレアチン（ウシ膵臓由来）を用いた。

酵素活性の測定：第１章第１節の方法にしたがい行った。

２　ラット消化液の採取と反応条件

採取法：実験には Wistar 系雄性ラット（９～10週令、体重250±10ｇ、closed colony）４匹を用いた。24時間絶食したラットを、エーテルまたはネンブタール（ペントバルビタールナトリウム）麻酔下で開腹し、胃噴門部、幽門部、小腸上部（幽門部から約５cm）の３ヶ所で結紮し、腹部を縫合した。一夜絶食・絶水して、翌朝断頭と殺後、再び開腹して、注射器で胃および腸に滞留している消化液を採取した。

消化液の性状：４匹のラットから採取した消化液の量は、胃液が2.2～6.3 ml、腸液が2.5～4.2ml。色は、胃液がややにごりのある透明、腸液が茶褐色。また、ｐＨは胃液が3.8～6.3、腸液が7.3～7.7の範囲であった。

消化液の酵素反応条件：胃液のたん白消化力の測定に際しては、胃液５μl、反応液のｐＨは2.0、 反応時間は30分で行った。緩衝液は0.05M 乳酸溶液に0.1N塩酸溶液でpH 2.0に調整したものを用いた。

腸液のたん白消化力の測定に際しては、腸液20μl、反応液のｐＨは8.0、反応時間は60分で行った。緩衝液は0.05M リン酸二ナトリウム溶液に0.1Nの塩酸または水酸化ナトリウム溶液でpH 8.0に調整したものを用いた。

腸液のでんぷん糊精化力の測定に際しては、腸液20μl、 反応液のｐＨは7.0、 反応時間は20分で行った。緩衝液は 0.1N リン酸塩緩衝液（pH 7.0）を用いた。

各消化液のたん白消化力の個体間のバラツキは、胃液で大きく（C.V.＝18％）、腸液では比較的小さい（C.V.＝５％）ことから、胃液は最も比活性の高いラットのものを、腸液はラット４匹分を混合したものを用いることとした。なお、胃液と腸液各１mlあたりのたん白消化力単位を比較したところ、それぞれ 1,770 units と168 unitsで、胃液の方が約10倍活性が高いことから、腸液よりも４倍希釈して実験を行った。

結　果

たん白消化酵素に対する阻害が比較的大きかったケイヒとサンショウを用いて、ラット消化液におよぼす影響を検討した。用いた試料は、Table 1の広南産ケイヒと兵庫産サンショウである。

ラットから得られた消化液の至適ｐＨを調べた結果、胃液のたん白消化作用は 2.0、腸液のでんぷん糊精化力は 7.0、腸液のたん白消化力は9.0（但し、pH 6～9の範囲において）付近であった（Fig.39）。しかし、腸管内のｐＨは9以上にならないことから、消化液中の酵素活性の測定は胃液のた

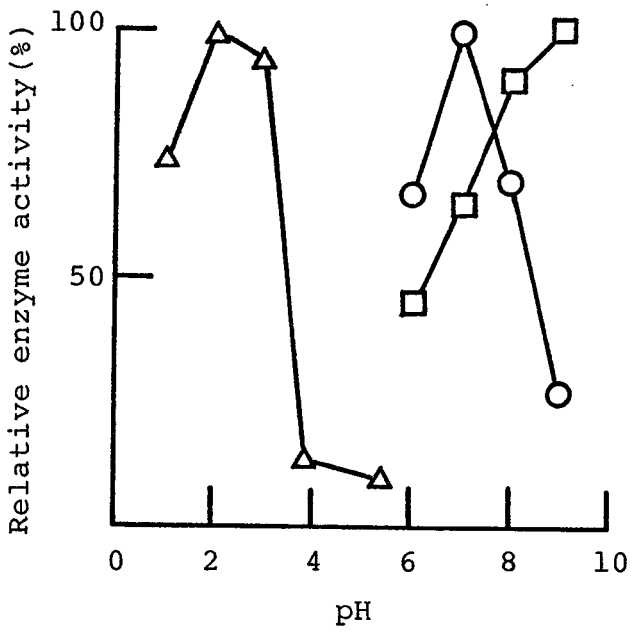

Fig. 39. ｐH Profile of Dextrinization and Proteolysis by Gastric Juice and Intestinal Juice

Starch-dextrinizing and protein-peptic activities of gastric and intestinal juices were assayed at various pH according to the methods described in Experimental section. As buffers, 0.05M lactate buffer(pH 1.0-3.8) and 0.05M phosphate buffer(pH 5.4-9.0) were used. ○,dextrinizing by intestinal juice; △,proteolysis by gastric juice; □,proteolysis by intestinal juice.

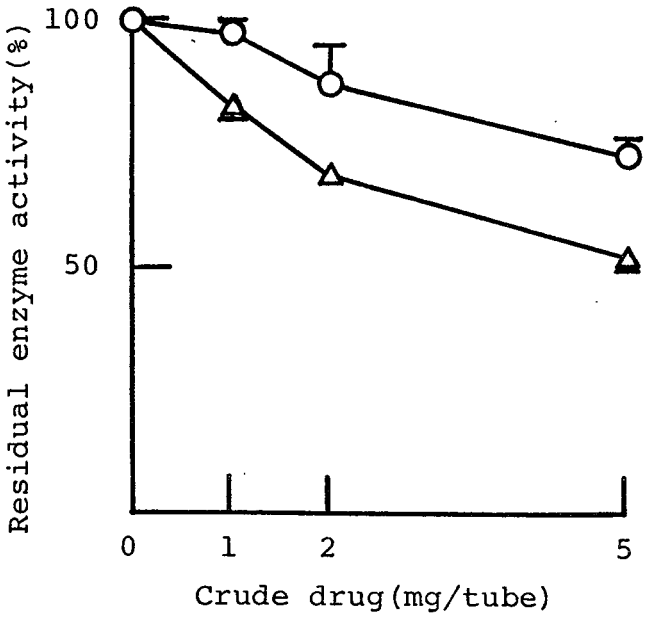

Fig. 40. Effects of Crude Drugs on Dextrinization by Intestinal Juice

Starch-dextrinizing activity of intestinal juice was assayed in the presence of various amounts of crude drugs according to the method described in Experimental section. ○, cinnamon bark; △, zanthoxylum fruit. Values are the means±S.D. (n=3).

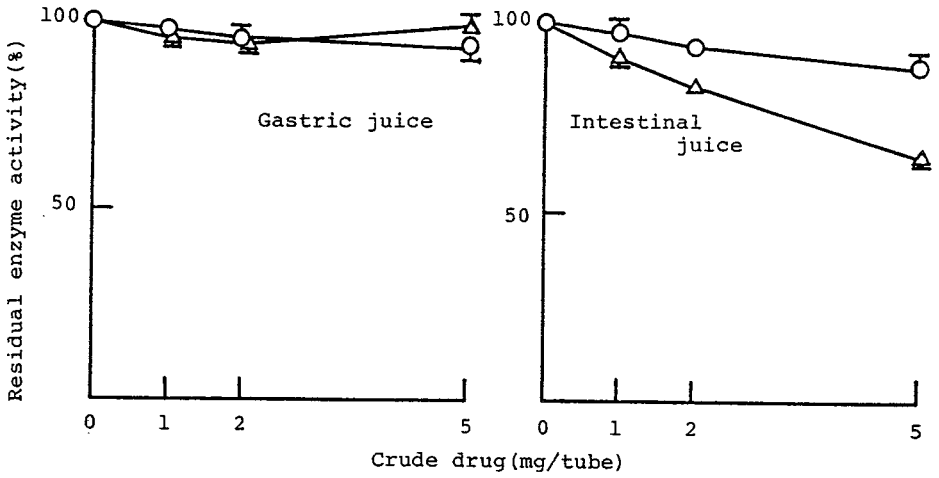

Fig. 41. Effects of Crude Drugs on Proteolysis by Gastric and Intestinal Juice

Proteolytic activity of either gastric or intestinal juice was assayed in the presence of various amounts of crude drugs according to the method described in Experimental section. ○, cinnamon bark; △, zanthoxylum fruit. Values are the means±S.D. (n=3).

ん白消化作用はpH 2.0、腸液のでんぷん糊精化作用はpH 7.0、腸液のたん白消化作用はpH 8.0で行った。

ラット腸液を用いて、でんぷん糊精化力に対するケイヒおよびサンショウの影響を検討した結果をFig.40に示した。両生薬によってでんぷん糊精化力の低下が認められたが、サンショウの方でより強い阻害を示した。ケイヒ5 mg/tube の添加によって、活性が71%に低下したのに対して、サンショウ5 mg/tube の添加で活性が52%に抑制された。

つぎに、胃液および腸液のたん白消化作用におよぼす両生薬の影響を検討した。結果をFig.41に示した。ラット胃液5 μlに対する影響を調べた結果、ケイヒ5 mg/tube の添加で若干の低下が認められた（93%）以外、これらの生薬による影響はほとんど認められなかった。また、腸液20μlに対する影響を検討した結果、ケイヒ5 mg/tube の添加によって活性が87%に、サンショウ5 mg/tube の添加によって活性が64%に抑制され、腸液のでんぷん糊精化力に対する作用と同様の結果が得られた。

考　察

ケイヒおよびサンショウを、ラットから採取した胃液および腸液に加えて酵素活性の変動を検討したが、胃液のたん白消化力はこれらの生薬による影響をまったく受けず、腸液のでんぷん糊精化力およびたん白消化力が抑制された。このことは、*in vitro*で今まで検討してきた、これらの生薬がビオジアスターゼなどの酸性域で作用する酵素のたん白消化力を抑制せず、一方、パンクレアチン等の膵臓性酵素のでんぷん糖化力およびたん白消化力を顕著に抑制したのと同様の結果となった。また、第1章第1節でも、ケイヒが胃から分泌されるペプシンなどの酸性プロテアーゼの活性を阻害しなかったことから、これらの生薬の存在によっても、酸性域で作用するプロテアーゼ等は活性阻害を受けにくいものと考えられた。

第２節　^{125}I－アルブミンの消化吸収におよぼす生薬の影響

第１節で、シロネズミの腸液中の酵素活性がケイヒおよびサンショウの添加によって低下したことから、あらかじめ、ケイヒ末およびサンショウ末の水溶液をシロネズミに投与したのち、^{125}I でラベルしたアルブミンを経口的に投与して^{125}I-チロシンの血中への移行を調べることによって、これら生薬の消化管プロテアーゼにおよぼす影響を検討した。

材料および方法

１　実験材料

生薬：ケイヒ（*Cinnamomum cassia* BLUME、 中国広南産）とサンショウ（*Zanthoxylum piperitum* DE CANDOLLE、 兵庫県養父郡産）を用いた。各試料はすべて粉末にしたのち、300μm の篩を通して粒度を均一にした。

２ ^{125}I－アルブミンの消化（吸収）におよぼす生薬の影響

^{125}I－アルブミンの調製：Na^{125}I（NEN社製、 NEW-033A）１mCi を、クロラミンT[55) 56)]法を用いて、牛血清アルブミン（Sigma 社製、フラクションV）および卵白アルブミン（Sigma 社製、グレードIII） に標識し、ゲル濾過（Sephadex G-100）を行い分離精製した。この標識化合物を、それぞれ20%の牛血清アルブミン（ＢＳＡ）および卵白アルブミン（ＥＷＡ）溶液に注入し、３ml（アルブミン600 mg含有）中に ５μCiの放射能を有するようにした。

^{125}I－アルブミンの投与と採血：実験には、Wistar系雄性ラット（９～10週令、体重250±10ｇ、closed colony）12匹を用いた。ＢＳＡ投与のラットは、生薬投与群とそのコントロール群各３匹づつを実験に供し、１週間後に交差試験を行った。ＥＷＡ投与群についても同様に行った。

24時間絶食したラットに、各生薬10%水溶液（100mg/ml）１mlを経口投与

し、10分後、37℃に予温しておいた ^{125}I－アルブミン溶液3ml（5μCi、アルブミン 0.6g）を経口投与した。^{125}I－アルブミン投与後、それぞれ30分、60分、120分、180分後、経時的に非麻酔下でラットを固定し、頸静脈から約 300μl採血した[57]。コントロールは、生薬水溶液のかわりに水を投与し、以下同様に操作した。

放射能の測定と計算　：　採取した血液から 200 μl を小試験管にとり、Packard 社製 Auto-Gamma Scintillation Spectrometer 5220型 で放射能を測定した。

結　果

ラットに、生薬水溶液 100 mg/mlを経口投与し、10分後に ^{125}I－BSA 5μCi を含む20%BSA溶液3mlを経口投与し、経時的に血中の放射能を測定し、生薬無投与のラットの血中放射能と比較した（Fig.42、43）。

BSAを投与した場合の結果をFig.42に示した。経時的に血中の放射能を測定したところ、生薬無投与のラット群と比較して有意差はほとんど認められなかった。サンショウを投与した場合の60分後の放射能が、コントロールに比べて86%に低下した以外は、数%以内の低下であった。　したがって、BSAの消化吸収は、ケイヒおよびサンショウの投与によって影響を受けないことが明らかとなった。

EWAを投与した場合の結果をFig.43に示した。BSAの場合と同様の検討をおこなったが、ケイヒまたはサンショウの投与により血中放射能が低下した。しかも、ケイヒよりもサンショウの方が強い低下を示した。とくに30分後では、ケイヒが対照群の83%であるのに対して、サンショウでは64%に低下した。この低下の幅は、サンショウの場合 60分、120分、180分 と、時間の経過とともに小さくなり（それぞれ80、84、96%）、ケイヒ、サンショウとも 180分でそれぞれ96%となった。なお、5時間以後ではコントロールとほぼ同等のカウント数になることを確認している。したがって、EWAに

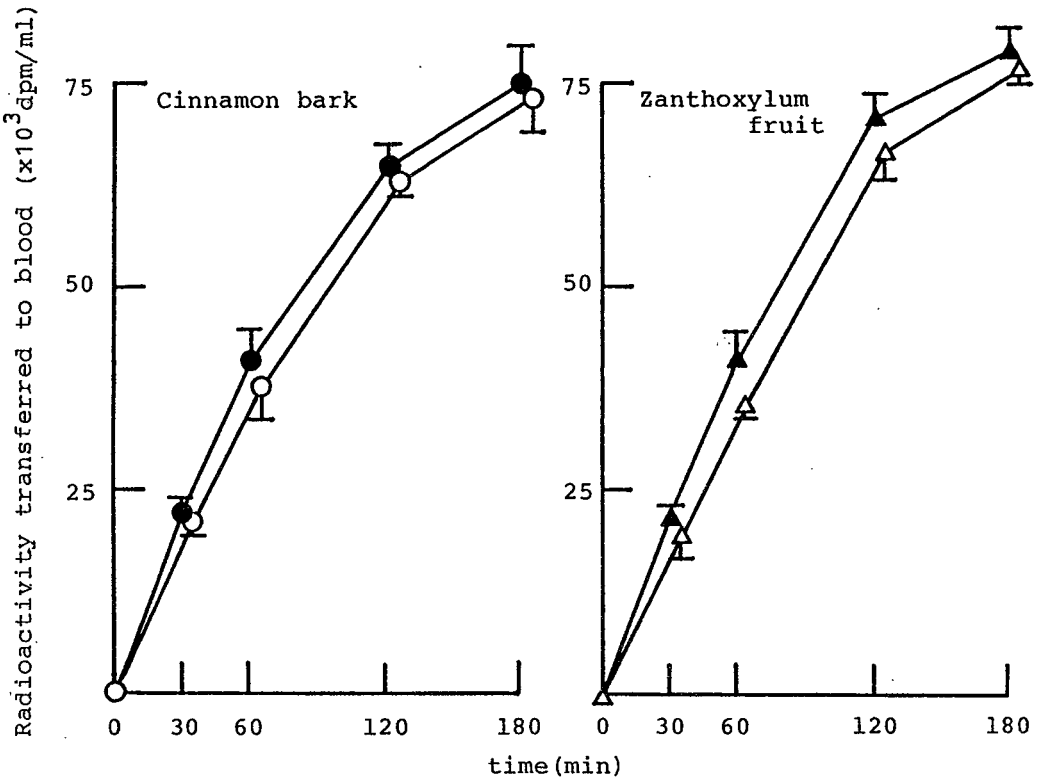

Fig. 42. Effects of Crude Drugs on Digestion of ^{125}I-Bovine Serum Albumin
Prior to oral administration of ^{125}I-bovine serum albumin(5 μCi/600 mg), animals were tube-fed with 100 mg of crude drug. At the indicated time after ^{125}I-albumin administration, blood was drawn from juglar vein and radioactivity transferred to the blood was determined. ●,▲, control; ○,cinnamon bark; △,zanthoxylum fruit. Values are the means±S.D.(n=6).

ついては、ケイヒおよびサンショウの投与によって、とくに初期の消化吸収が抑制されることが明らかとなった。

ところで、第３章第４節において、ケイヒが基質に対して非特異的に結合するため、ケイヒをあらかじめ基質に接触させたのち酵素を加えた場合、活性阻害が減弱することを示したが、同様の結果が、*in vivo* においても得られるか否かを検討した。

ラットに、まず ^{125}Ｉ－アルブミン５μCi を含む20％アルブミン溶液３ml を経口投与し、10分後に生薬水溶液 100 mg/mlを経口投与し（基質と阻害剤

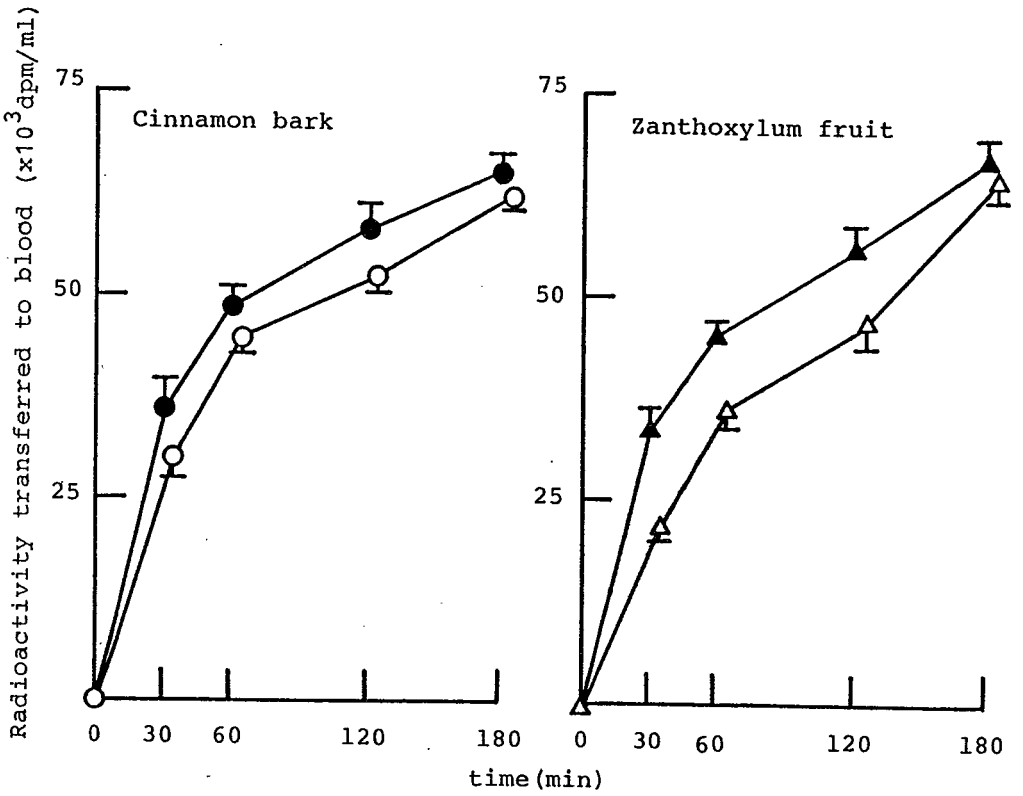

Fig. 43. Effects of Crude Drugs on Digestion of ^{125}I-Egg White Albumin
Prior to oral administration of ^{125}I-egg white albumin(5 μCi/600 mg), animals were tube-fed with 100 mg of crude drug. At the indicated time after ^{125}I-albumin administration, blood was drawn from juglar vein and radioactivity transferred to the blood was determined. ●,▲, control; ○,cinnamon bark; △,zanthoxylum fruit. Values are the means±S.D.(n=6).

の投与順序を逆にした。）、^{125}Ｉ－アルブミン５μCi 投与時から経時的に血中の放射能を測定し、生薬無投与のラットの血中放射能と比較した。結果をFig.44に示した。ＢＳＡを投与した場合、両生薬ともFig.43での検討とほぼ同様の結果が認められた。ＥＷＡを投与した場合、30分後の血中放射能はケイヒはわずか、サンショウは75%、60分後でケイヒ、サンショウとも約83%程度の低下にとどまった。また120分、180分ではコントロールとの差は認められなかった。したがって、本検討においても、 *in vitro* での結果が再現されることが認められた。さらに、アルブミン投与後にこれらの生薬を投

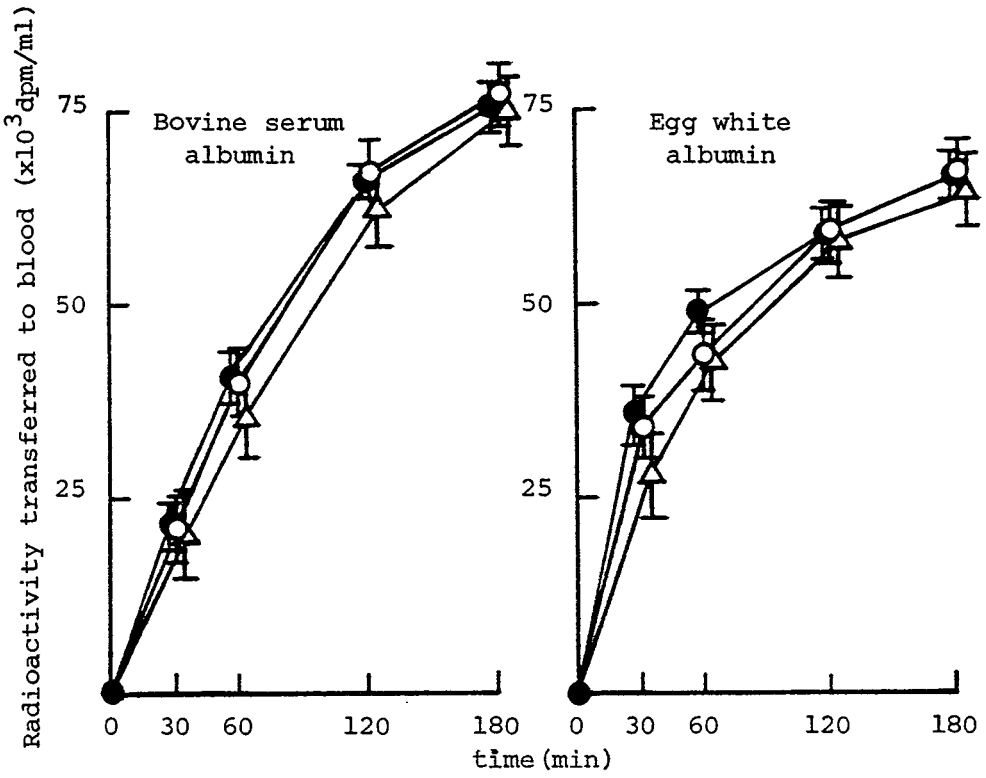

Fig. 44. Effects of Crude Drugs on Digestion of ^{125}I-Albumin
After oral administration of ^{125}I-albumin(5μCi/600mg), animals were tube-fed with 100 mg of crude drugs. At the indicated time after ^{125}I-albumin administration, blood was drawn from jugler vein and radioactivity transferred to the blood was determined. ●, control; ○, cinnamon bark; △, zanthoxylum fruit. Values are the means±S.D. (n=6).

与した場合、生薬を先に投与したものよりも血中放射能の測定値のバラツキが大きくなることも確認された。

考　察

生薬を経口投与したのち ^{125}I－BSAを投与した場合、^{125}I－チロシンの血中への移行（BSAの消化吸収）にはほとんど影響がなかったが、

^{125}I－EWAを投与した場合、EWAの消化吸収速度は遅くなった。この結果は、種々のたん白質をラットの胃内に直接投与し、消化管に残存する抗原量を経時的に測定した結果、BSAが大半胃で消化を受けるのに対してEWAの消化吸収部位は小腸中下部であるという、岩井らの報告[58]から理解できる。すなわち、はじめに投与した生薬水溶液はアルブミンよりも先にペプシンおよび膵液と接触している。 *in vitro* で検討したように、これらの生薬は胃から分泌されるペプシンの活性を抑制せず、膵臓性酵素であるパンクレアチンの活性を抑制した。したがって、小腸において消化吸収を受けるEWAの血中への取り込みが抑制されたものと考えられる。なお、24時間絶食したラットに、これらの生薬水溶液 100mg/ml を投与し10分後に開腹したところ、その一部はすでに小腸中部まで移行していることを確認している。

また、 ^{125}I－EWA投与後、時間とともに血中放射能が上昇し、コントロールに近づくが、これは阻害剤である生薬が消化管内の基質EWAと結合していき、阻害活性を徐々に失っていくため、新たに分泌される酵素が失活しなくなるためであると思われる。さらに、Fig.44の検討で、生薬をEWA投与後に与えた方がEWAの消化吸収におよぼす影響が小さくなることも、第3章第4節で、ケイヒ中の阻害物質がたん白質と非特異的に結合するという結果から理解できる。

また、Fig.42および43において、生薬を投与していない対照群の動物における、BSAとEWAの吸収速度を比較すると、後者の方が速くなったが、これは、20%EWA溶液が20%BSA溶液よりもはるかに流動的であり、小腸への移行がすみやかであるためと思われる。

今回の *in vivo* における実験条件、すなわち24時間絶食し、たん白質よりも先に生薬を投与するという操作は、実際、我々が胃腸薬を服用する場合とは異なるものである。しかし、胃腸薬以外に、これらの生薬を食品あるいは漢方薬として摂取した際の、生体酵素におよぼす影響、さらに、他の生薬等による影響は、さらに十分な検討をなされるべき必要がある。

さらに、ラット消化管中のたん白消化酵素の活性におよぼす生薬の影響を、

^{125}I－アルブミンを用いて検討したが、このような*in vivo* での検討方法はまったく新しい試みであり、 *in vitro* で阻害効果を認めた物質が、実際に体内においても同様の傾向を示すことを確認できたことは極めて意義深い。この実験方法は、生薬にとどまらず、以前から *in vitro* で検討されている制酸剤や金属イオン、サリチル酸、その他の薬物のたん白消化酵素におよぼす影響[5) 9)]を*in vivo* で実証する際にも大いに役立つものである。

第３節　小　括

生薬の生体酵素におよぼす影響をシロネズミを用いて、*in vivo* で検討を行った結果、以下のことが判明した。

(1) ラットから採取した消化液にケイヒおよびサンショウを添加して酵素活性の変動を検討したところ、胃液のたん白消化力は影響を受けなかったが、腸液のでんぷん糊精化力およびたん白消化力は抑制された。

(2) ラットに、あらかじめ上記の生薬を投与し、 ^{125}I－アルブミン経口投与後の血中 ^{125}I－チロシン量を指標として、生体内酵素への影響を検討した結果、アルブミンに牛血清アルブミンを用いた場合、 ^{125}I－チロシンの血中への移行には影響がなかったが、卵白アルブミンを投与した場合 ^{125}I－チロシンの血中への移行は生薬の投与で若干遅くなった。

(3) 生薬と ^{125}I－アルブミンの投与順序を逆にした場合、 ^{125}I－チロシンの血中への移行におよぼす生薬の効果は (2)に比べて軽減された。

(4) 以上の結果から、 *in vitro* で観察された、生薬によるプロテアーゼ活性抑制は*in vivo* においても再現されることが明らかとなった。

総括および結論

第１節　総　括

現在我国において繁用されている総合胃腸薬は、消化酵素に制酸剤と生薬が配合されたものがほとんどであるが、本製剤は我国特有のものであり、諸外国においてはほとんどみられない。本来、消化剤と制酸剤とは区別して用いられるべきものである。すなわち、消化器官の働きのよくない人や消化不良の人には消化剤を、一方、消化管機能が亢進して胃液の分泌が多く、空腹時に胃痛を訴える人には制酸剤を投与することが必要である。また、生薬の粉末を消化酵素に配合した場合の酵素の有効性や、生薬を服用した際の生体内酵素への影響などについて、未知の点が多く、これらの詳細な検討が必要であった。本研究では、これらの観点から、生薬の消化酵素の活性におよぼす影響を *in vitro* および *in vivo* において検討した。

本検討において、消化酵素に生薬を配合して酵素活性を測定した場合、生薬によっては消化酵素の活性を著しく阻害する場合も認められ、総合胃腸薬を服用する際、水とともに口中に入れた時点で、すでに酵素活性の数％から数十％が失活していることが推察された。さらに、同一生薬であっても産地・品質等の違いによって酵素活性に与える影響に差が生じる場合があり、また、起源の異なる酵素によっても生薬の与える影響に違いがみられた。以上の点から、胃腸薬の製剤化にあたっては消化酵素の作用が十分発揮できる処方設計がなされる必要があることを明らかにした。

酵素活性の測定にあたっては、公定法である統一試験法（胃腸薬製造承認基準[6]中の消化力試験法[7]）を用いるのが一般的であるが、この方法では、種々の妨害物を含む生薬の存在下での活性値の信頼性が疑われた。　そこで、Blue value法をさらに改良してでんぷん糊精化力を測定、またカップ法を利用してたん白消化力を測定するなど、生薬存在下でも酵素の正確な活性を測定する方法を考案したが、これらの方法でも種々の生薬による酵素活性への

影響が確認された。このことから、種々の共存物質を含んだ酵素の活性測定法について十分な検討を行う必要があることが明らかとなった。

生薬中には、酵素の活性を抑制するものだけでなく、酵素作用をもつものがあることを明らかにした。すなわち、ニンジン、カンゾウ、オウレンなどの生薬中に多くのアミラーゼが存在することを初めて確認し、さらに産地・品質間の差によってアミラーゼ含有量に差があることを示した。とくにアミラーゼ活性が強いニンジンからβ－アミラーゼを抽出・精製し、その酵素化学的・たん白化学的諸性質について検討した結果、高等植物由来では未報告の、中性糖を多く含有するβ－アミラーゼであるなど、幾つかの知見を得た。

本研究の結果、胃腸薬に配合されることが多いケイヒ、サンショウ、ダイオウでは、その生薬の品質の違いにより、酵素の活性に与える影響や試料中のフォリン反応陽性物質含量が異なることがわかった。生薬の品質は、原植物、産地、採取時期、用部、保存期間・方法、調製・加工方法などの違いにより、多様となっている。品質の評価には、従来、形態学的、成分化学的な方法がとられているが、本研究によって、生薬の品質と消化酵素との関連が初めて明らかとなるとともに、胃腸薬に配合される生薬の品質評価に、酵素活性に与える影響を考慮する必要性が示された。

ケイヒ、サンショウ、ダイオウについては、フォリン反応陽性物質の多い試料ほど酵素活性を強く抑制したことから、フォリン反応陽性物質が阻害物質の本体であると考えられた。酵素の活性を阻害する物質として、ケイヒからエタノール易溶のタンニン様物質を抽出したが、ケイヒ中の阻害物質は本物質だけとは考えにくく、種々のタンニンおよびフェノール性物質の重合体等からなるものと推察された。これらの阻害物質は、酵素と特異的に反応せず、基質に対して不拮抗型阻害を示したが、ここで用いた方法は他の酵素阻害作用を示す生薬中の物質について検討を行う際に応用しうるものである。

in vitro で認められた、生薬による酵素活性への抑制作用が、実際に生体酵素に対しても認められるかどうかをシロネズミを用いて検討したが、予め経口投与したケイヒおよびサンショウによって、あとに投与した卵白アル

ブミンの血中への取り込みが抑制されたことから、これらの生薬は*in vivo*においても消化管中のたん白消化酵素の活性を抑制していることが明らかとなった。さらにこの抑制作用はケイヒよりもサンショウの方で顕著で、しかも基質たん白質を生薬よりも先に投与することによって、抑制が弱められるなど、 *in vitro* の結果が再現され、本実験の有用性が明らかとなった。

第２節　結　論

(1) 生薬存在下での消化酵素活性の測定法として、生薬中の種々の妨害成分の影響を受けにくいカップ法およびBlue value法を改良した方法を考案した。公定法ならびにこれらの改良法を用いて、健胃生薬の各種消化酵素におよぼす影響を検討した。

(2) 種々の生薬中にアミラーゼが存在することを明らかにし、とくにアミラーゼ活性が高かったニンジンからアミラーゼを抽出・精製し、その性質について検討した。その結果、植物由来では未報告の、糖たん白性のβ－アミラーゼの存在を証明した。

(3) 膵臓性プロテアーゼは、ケイヒ、サンショウ、ダイオウなどにより阻害を受けやすいことが明らかとなった。プロテアーゼ活性の抑制と、これら生薬のフォリン反応陽性物質含量のあいだに明確な相関が認められた。

(4) 酵素阻害の本体の一つとして、ケイヒ中の阻害物質を検索し、エタノール易溶の構造的に不安定なフェノール性物質の存在を確認した。本物質の阻害様式は基質に対して不拮抗型を示すことを明らかにした。

(5) 生薬によるプロテアーゼ活性抑制作用を *in vivo*で検討する方法を確立した。すなわち、予め生薬を投与したラットを用いて ^{125}I－アルブミン経口投与後の血中 ^{125}I－チロシン量を指標として生体内酵素に対する生薬の影響を検討し、ケイヒおよびサンショウは、小腸上部におけるたん白質の消化吸収を遅延させ、 *in vitro* におけるプロテアーゼ活性抑制が*in vivo* においても再現されることを示した。

謝　辞

本論文の作成にあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学薬学部教授　近藤雅臣先生に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、有益な御助言と御指導をいただきました大阪大学薬学部　米田該典助教授、神戸学院大学薬学部　梅沢智佐江教授、同谷　昇平教授、並びに大阪府立公衆衛生研究所薬事指導部長　田中凉一博士、同副部長　横山　浩博士に感謝の意を表します。

併せて、御協力および有益な討論に参加していただいた、大阪大学薬学部衛生化学講座、生薬材料学教室の諸氏、並びに大阪府立公衆衛生研究所の所員の皆様に感謝いたします。

引用文献

1) 日本医薬情報センター編：一般薬　日本医薬品集、第６版、薬業時報社、東京、1987, p.189-290.

2) 杉浦　衛：酵素の製剤化について、薬局、29, 7-16(1978).

3) 岡崎寛蔵：消化酵素剤の効果の検討（第６報）、薬物のアミラーゼ剤に及ぼす影響、薬剤学、17, 33-40(1957).

4) 岡崎寛蔵、飯沼竜一、鶯谷有甫：消化酵素剤の効果の検討（第９報）諸種薬物の消化酵素剤におよぼす影響、薬剤学、17, 115-117(1957).

5) 一柳　明、長谷川正英、西　一也、藤元　弘、示野寛子：医薬品の消化酵素に対する作用、病院薬学、１、152-154(1975).

6) 日本公定書協会編：製薬関係通知集、薬業時報社、東京、1985, p.365-376.

7) 日本公定書協会編：製薬関係通知集、薬業時報社、東京、1985, p.390-403.

8) H.Fuwa: A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate, *J.Biochem.*(Japan), **41**, 583-603(1954).

9) 岡崎寛蔵、山本次郎、千葉洋子：消化剤の研究（第３７報）薬物のプロテアーゼ剤におよぼす影響（その１）、薬剤学、22, 98-101(1962).

10) 中村道徳、山崎鏡次、丸尾文治：植物に於ける Phosphorylase, Phosphatase及びβ-Amylaseの分布（第１報）、農芸化学、24,197-201(1951)

11) A.K.Balls, H.Lineweaver: Isolation and properties of crystalline papain, *J.Biol.Chem.*,130,669-686(1939).

12) M.Bergmann, J.S.Fruton, H.Fraenkel-Conrat : On proteolytic enzymes, XV. Regarding the general nature of intracellular proteolytic enzymes, *J.Biol.Chem.*, **119**, 35-46 (1937).

13) M. Higashihara, S. Okuda : Studies on β-amylase of *Bacillus megaterium* strain No.32, *Agric.Biol.Chem.*,**38**, 1023-1029(1974).

14) A.Gertler, Y.Birk : Purification and characterization of a β-

amylase from soya beans, *Biochem.J.*, **95**, 621-627 (1965).

15) R.Shinke, N.Mugibayashi : Studies on barley and malt amylases, part XVII, Isolation and some properties of urea-soluble zymogen β-amylase in barley, *Agric.Biol.Chem.*, **35**, 1381-1390(1971).

16) 相原茂夫、森田雄平：ダイコンおよびダイズβ－アミラーゼ、蛋白質核酸酵素　別冊、**76**, 434-437(1976).

17) J.W.Bailey, D.French: The significance of multiple reactions in enzyme-polymer systems, *J.Biol.Chem.*,**226**, 1-14(1957).

18) M.Somogyi: Notes on sugar determination, : *J.Biol.Chem.* **195**, 19-23(1952).

19) 赤堀四郎：酵素研究法、２、朝倉書店、東京、1966, p.108-120.

20) 米田該典、山形悦子、神保みずほ、成戸俊介：生薬資源の研究（第４報）黄連の加熱調製とアルカロイド組成について、生薬学雑誌、**43**, 129-134(1989).

21) 中山医学院編：漢薬の臨床応用、医歯薬出版、東京、1980, p.301-306.

22) 藤田路一、糸川秀治、柴田承二：薬用人参の成分研究（第１報）（サポニンの研究、第４報）人参サポニンとサポゲニンの分離、薬学雑誌、**82**, 1634-1638 (1962)：薬用人参の成分研究（第２報）（サポニンの研究、第５報）Panaxadiolの性質について、薬学雑誌、**82**,1638-1641(1962)

23) 田中　治：ニンジン（*Panax ginseng* C.A.Meyer の根）の成分、代謝、**10**,548-555(1973).

24) S.Sanada, N.Kondo, J.Syoji, O.Tanaka, S.Shibata : Studies on the saponins of ginseng, I. Structures of ginsenoside -Ro,-Rb_1,-Rb_2, -Rc and -Rd, *Chem.Pharm.Bull.*,**22**,421-428(1974) : Studies on the saponins of ginseng, II. Structures of ginsenoside -Re, -Rf and -Rg_2, *Chem.Pharm.Bull.*,**22**,2407-2412(1974).

25) 高木敬次郎：ニンジンの薬理作用、現代東洋医学、３,47-54(1982).

26) B.J.Davis: Disk electrophoresis, II, Method and application to

human serum proteins, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Art 2, 404-427 (1964).

27) P. Vretblad: Immobilization of regands for biospecific affinity chromatography via their hydroxy groups, Cyclohexaamylose-β-amylase system, *FEBS Lett.*, **47**, 86-89(1974).

28) N. E. Welker, L. L. Campbell: Effect of carbon sources on formation of α-amlase by *Bacillus stearothermophilus*, *J. Bacteriol.*, **86**, 681-686(1963).

29) 不破英次、二国二郎：α－アミラーゼ及びβ－アミラーゼの分類と名称、農芸化学、**26**, 154-159(1952).

30) 松尾雄志、堀尾武一：蛋白質の電気泳動的等電点分画法、蛋白質核酸酵素、**12**, 737-748(1967).

31) U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685(1970).

32) C. H. W. Hirts: Determination of cystine and cysteic acid, *Method in enzymology*, **11**, 59-62(1967).

33) T. W. Goodwin, R. A. Morton : The spectrometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins, *Biochem. J.*, London, **40**, 628-632(1946).

34) J. S. Sawardeker, J. H. Sloneker, A. Jeanes: Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetate by gas liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **37**, 1602-1604(1965).

35) 西沢一俊、志村憲助：入門酵素化学、南江堂、東京、1967, p. 24-43.

36) Y. Morita, F. Yagi, S. Aibara, H. Yamasita: Chemical composition and properties of soybean β-amylase, *J. Biochem.*, **79**, 591-603(1976).

37) 朱　忠魯、松繁克道、李　昇奎、洪　錫根：薬用人参の韓国最高権威者を囲んで、鐘薬　八味箪笥、カネボウ薬品、東京、９, 21-25(1987).

38) ：薬局製剤における漢方用薬の品質と選品、日本薬剤師会雑誌, **34**, 221-

226(1982).

39) 日本公定書協会編、第11改正日本薬局方解説書、廣川書店、1986,D-395-401.

40) 下村　盂：山椒の生薬学的研究、薬学雑誌、63,427-441(1943).

41) 安田一郎、瀬戸隆子、下平彰男、田窪栄一：生薬の品質評価に関する研究（第６報）市場品山椒の品質、東京衛研年報、31-1,82-85(1980).

42) T.Sakai, K.Yoshihara, Y. Hirose : *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, 41, 1945-1950,(1968).

43) 安田一郎、竹谷孝一、糸川秀治：辛味および精油成分による本邦市場の中国産山椒の品質評価、生薬学雑誌、36,301-306(1982).

44) 吉田尚利、三橋　博、畠山好雄、逸見誠三郎、本間尚次郎、水谷次郎：薬用植物の栽培研究　大黄の栽培および調製について、生薬、25,1-6,(1971).

45) 村田康次、余越真由美、吉田昭義、林　信一、生薬のでんぷん消化酵素におよぼす影響について　ケイヒのでんぷん消化酵素活性阻害について、生薬、38,90-95(1984).

46) American Leather Chemical Association: *J.AM.Leather Chem.Assoc.*, 49,174-207(1954).

47) 古沢良雄、黒沢祐一郎、中馬一操：和漢薬用植物の抗トリプシン作用とその抗炎症作用、農芸化学会誌、47,359-365(1973).

48) 原田正敏、尾崎幸紘：桂皮の薬理学的研究（第１報）Cinnamaldehydeの中枢作用、薬学雑誌、92,135-140(1972).

49) 萩庭文寿、原田正敏、中島基之、境　一成：生薬の薬物学的研究（第６報）クスノキ科植物精油成分の性状、ガスクロマトグラフィーによる分離ならびに循環器系におよぼす薬理作用、薬学雑誌、82, 1441-1446 (1962).

50) 岡崎寛蔵、大島荘一：高等植物の抗菌性（第23報）高等植物の抗菌性（第23報）精油の抗菌性、その４、薬学雑誌、72,1131-1135(1952).

51) 八木　晟、野原稔弘、西岡五夫、江田昭英、永井博弐、野田寛治、徳渕信能：桂皮の成分と実験的腎炎に対する作用、和漢薬シンポジウム講演要旨集、13,72-78(1980).

52) E.Mihalyi: Application of Proteolytic Enzymes to Protein Structure studies, *CRC Press*, Florida, 1.114(1978).

53) M.Nishizawa,T.Yamagishi,G.Nonaka,I.Nishioka :Tannins and related compounds.Part 5. Isolation and characterization of polygalloylglucoses from Chinese gallotannin, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.*1, 2963-2968(1982).

54) S.Morimoto, G.Nonaka, I.Nishioka: Tannins and Related Compounds. XXXVIII.Isolation and characterization of flavon-3-ol glucosides and procyanidin oligomers from cassia bark(*Cinnamon cassia* BLUME), *Chem.Pharm.Bull.*,34,633-642(1986).

55) W.M.Hunter, F.C.Greenwood : Preparation of Iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity, *Nature*, 194,495-496(1962).

56) F.C.Greenwood, W.M.Hunter J.S.Glover : The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity, *Biochem.J.*, 89,114-123(1963).

57) 金武朝春：ラット・マウスの連続頸静脈採血および薬物注射法、日本細菌学雑誌、37,943-947(1982).

58) 岩井和夫：食品タンパク質消化過程の解析、日本栄養食糧学雑誌、 36, 403-404(1983).