

Title	メタボローム分析を用いた生薬の「熱と寒」の探求
Sub Title	A Metabolomic Study of Traditional Chinese Medicine with Cold and Hot Nature
Author	郭, 婧(Guo, Jing)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.71- 79
JaLC DOI	
Abstract	漢方薬(方剤)は複数の生薬を組み合わせて処方するオーダーメイドな治療薬で、生薬の加減を患者の体質に合わせて行う。生薬は性質により熱、温、涼、寒に分類されており、これは「四性」或いは「四氣」と呼ばれている体系に基づいている。生薬の四性は方剤の組み合わせを決める際に考慮されるパラメーターの一つであり、この分類法は、生薬が人体へ与える影響をもとに経験則的に決定されたものである。しかし生薬の四性は、約2000年以前から使用されてきたにも関わらず、分類基準の科学的根拠が未だ知られていない。客観的・定量的に四性の性質を区分することは、漢方薬の薬理作用のメカニズムの説明、臨床応用、及び中国伝統医学の正確な継承のために重要である。 メタボミクスは近年急速に発展している研究分野であり、細胞内または生体内の代謝物を対象とし、医薬品、食品、環境など様々な分野で応用されている。キャピラリー電気泳動：時間飛行型質量分析装置(CE-TOFMS)はイオン性低分子の測定に優れた質量分析装置であり、生体内の代謝物質の大半を占めるイオン性低分子を網羅的に定量できる。本論文ではCE-TOFMSを用い、代謝物生薬の「熱と寒」の分類及び意義の探求を目指した。 本研究では14種類の寒性生薬及び13種類の熱・温性生薬を用い、マウス胎児皮膚細胞(NIH3T3)の代謝に及ぼす影響をメタボローム解析により調べた。各生薬に対するNIH3T3の感受性を調べた結果、いずれの生薬も細胞増殖率を低下させることが確認された。この結果に基づき、増殖抑制する濃度の生薬を添加して細胞を培養した際の細胞内代謝物の解析を行った。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0071

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

メタボローム分析を用いた生薬の「熱と寒」の探求

A Metabolomic Study of Traditional Chinese Medicine with Cold and Hot Nature

環境情報学部4年

郭セイ

要旨

漢方薬（方剤）は複数の生薬を組み合わせて処方するオーダメイドな治療薬で、生薬の加減を患者の体質に合わせて行う。生薬は性質により熱、温、涼、寒に分類されており、これは「四性」或いは「四氣」と呼ばれている体系に基づいている。生薬の四性は方剤の組み合わせを決める際に考慮されるパラメーターの一つであり、この分類法は、生薬が人体へ与える影響をもとに経験的に決定されたものである。しかし生薬の四性は、約2000年以前から使用されてきたにも関わらず、分類基準の科学的根拠が未だ知られていない。客観的・定量的に四性の性質を区分することは、漢方薬の薬理作用のメカニズムの説明、臨床応用、及び中国伝統医学の正確な継承のために重要である。

メタボロミクスは近年急速に発展している研究分野であり、細胞内または生体内の代謝物を対象とし、医薬品、食品、環境など様々な分野で応用されている。キャピラリー電気泳動-時間飛行型質量分析装置（CE-TOFMS）はイオン性低分子の測定に優れた質量分析装置であり、生体内の代謝物質の大半を占めるイオン性低分子を網羅的に定量できる。本論文ではCE-TOFMSを用い、代謝物生薬の「熱と寒」の分類及び意義の探求を目指した。

本研究では14種類の寒性生薬及び13種類の熱・温性生薬を用い、マウス胎児皮膚細胞(NIH3T3)の代謝に及ぼす影響をメタボローム解析により調べた。各生薬に対するNIH3T3の感受性を調べた結果、いずれの生薬も細胞増殖率を低下させることが確認された。この結果に基づき、増殖抑制する濃度の生薬を添加して細胞を培養した際の細胞内代謝物の解析を行った。

キーワード：生薬、四性、メタボローム、培養細胞

1. 背景

熱性の生薬一般的に交感神経に対し興奮作用があり、基礎代謝率を増加させると言われている。一方、寒性の生薬は交感神経の抑止、副交感神経の興奮作用があり、主に鎮静、睡眠誘導、解熱、鎮痛などの効果があると示され、基礎代謝率を低下させると言われている (Deng, et al., 2009)。寒と熱の生薬の薬理学的作用機構は存在すると考えられており、寒性生薬或いは熱性生薬は共通した生理的傾向をもたらし可能性が考えられている。生体内外の物質と生体の相互作用を調べ、薬理学的観点より寒と熱のメカニズムを解明する試みが長年続けられている。

寒と熱の違いとしてエネルギー生産が一般的に考えられている。

Liuらによる、寒性生薬と熱性生薬の機能を調べた論文では、神経細胞N9に生薬を付与した場合、寒性生薬はグルコース消費を抑制し、熱性生薬はグルコース消費を増加させる傾向があることを示唆している (Liu, et al., 2008)。グルコースは重要なエネルギー物質の一つであり、解糖系及びTCA回路を通しATPを生産する。もし寒性生薬と熱性生薬でグルコース消費が異なるならば、エネルギー生産に関する代謝経路から寒性生薬と熱性生薬の機能の違いを明確にできる可能性がある。

また、Koらは陽性生薬 (熱と温)と陰性生薬 (涼と寒)を与えたマウスでATP生産を調べた結果、温性生薬はATP生産を増加させる傾向を持ち、涼性生薬はコントロール群と比べATP生産に差が見られないか減少させる傾向が見られた (Ko and Leung, 2007)。マウスを用いた実験において、熱性生薬投与後は糖、脂質、アミノ酸の代謝影響によって、ATPの生産量を増加させる傾向があると報告されている (Yu, et al., 2012)。だが、このような熱と寒性生薬投与後にATP変化に規律性が見られることは細胞を用いた実験でまだ見られていない。

本研究では、寒性生薬14種類と熱・温性生薬13種類の抽出物を付与した正常培養細胞NIH3T3の代謝変化をメタボローム解析により調べた。Liuらはアルツハイマー病の研究を目的にN9を選択したが、本研究は基礎代謝経路を調べたいため、培養条件に厳しいN9でなく、正常細胞の性質も持つHIN3T3を選択した。

実験ではまず各生薬の細胞毒性テストを行い、その結果をもとに生薬の添加濃度を決定した。生薬負荷後、48時間でサンプルを採取し、CE-TOFMSにより代謝物を測定した。また、細胞サンプル以外に、細胞培養後の培地及び添加生薬のメタボロームデータを補充データとして取得し、主要代謝に関わる代謝物に関して俯瞰的な視点から考察した。

2. 対象と手法

2.1 対象生薬

表1 水抽出に用いた27種類の生薬

番号	生薬名	学名	四性	薬用部位
1	附子	<i>Radix Aconiti</i>	熱	塊根
2	肉桂	<i>Cortex Cinnamomi</i>	熱	樹皮
3	吳茱萸	<i>Fructus Evodiae</i>	熱	果実
4	乾姜	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	熱	根茎
5	高良姜	<i>Rhizoma Alpiniae officinari</i>	熱	根茎
6	小茴香	<i>Foeniculi Fructus</i>	温	果実
7	丁香	<i>Flos Caryophylli</i>	温	蕾
8	烏薬	<i>Radix Linderae</i>	温	根
9	独活	<i>Radix Angelicae Pubescentis</i>	温	根茎
10	川芎	<i>Rhizoma Cnidii</i>	温	根茎
11	麻黄	<i>Herba Ephedrae</i>	温	地上茎
12	木香	<i>Radix Aucklandiae</i>	温	根
13	黄芪	<i>Radix Astragali</i>	温	根
14	金银花	<i>Flos Lonicerae</i>	寒	蕾

15	黄芩	<i>Radix Scutellariae</i>	寒	根
16	黄连	<i>Rhizoma Coptidis</i>	寒	根茎
17	苦参	<i>Radix Sophorae Flavescentis</i>	寒	根
18	黄柏	<i>Cortex Phellodendri</i>	寒	樹皮
19	大黄	<i>Radix et Rhizoma Rhei</i>	寒	根茎
20	連翹	<i>Fructus Forsythiae</i>	寒	果実
21	柴胡	<i>Radix Bupleuri</i>	寒	根
22	白頭翁	<i>Radix Pulsatillae</i>	寒	根
23	青蒿	<i>Herba Artemisiae Annuae</i>	寒	枝葉
24	丹参	<i>Radix Salviae Miltiorhizae</i>	寒	根
25	穿心蓮	<i>Herba Andrographitis</i>	寒	枝葉
26	赤芍	<i>Radix Paeoniae Rubra</i>	寒	根
27	龍胆草	<i>Radix Gentianae</i>	寒	根茎

2.2 細胞培養

NIH3T3細胞はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて5%CO₂, 37°Cの条件下で培養した。実験では播種から24時間後に培地交換し、同時に各生薬の抽出液を培地の10%量で添加した。

2.3 細胞毒性試験

生薬の細胞毒性はMTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)アッセイ及び、トリパンプルー染色法により測定した。MTTアッセイについて、細胞はPBSで1回洗浄後、MTT-DMEM混合液100 µlを添加し、5%CO₂, 37°Cの条件下で2時間培養した。その後、ホルマザン可溶化液 (Isopropanol, TritonX-100, 1N HCl aq.)を100 µl添加し、紫色結晶が完全に溶解するまで振動してから吸光度(570 nm)を測定した。この測定は生薬濃度0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3mg/mlの7系列で行った。トリパンプルー染色法では、始めに全培地をエッペンチューブに採取し、Phosphate Buffered Saline (PBS)で洗浄後、0.05%トリプシンで剥がした生細胞を同じチューブに採取した。遠心 (1000 g, 室温, 5分)して細胞懸濁液を濃縮後、トリパンプルー液を加えて死細胞と生細胞をそれぞれ数えた。この測定はMTTアッセイの結果から生薬濃度3点を選び行った。

2.4 細胞のメタボロームサンプル前処理

6穴プレートに細胞を播種し、24時間後に培地交換を行い、同時に生薬抽出液10%を添加し、恒温インキュベータ (5%CO₂, 37°C)で培養した。添加した生薬濃度は、細胞毒性試験の結果より、細胞増殖率が低下する濃度に設定した。生薬添加から48時間後に細胞サンプルを採取した。細胞サンプルは培地を除去し、5%マンニトールで洗浄後、25µMのIS1(L-Methionine sulfone, MES, CSA)入りのメタノール600µLを添加し10分静置した後に400µL溶液をチューブに移し、更にクロロホルム400µLとMilli-Q 180µLを添加した。培地サンプルと細胞サンプルは十分に攪拌して遠心分離 (10,000g, 3min, 4°C)し、水層400µLを限界濾過フィルターで遠心分離 (9,100g, 3h, 4°C)した。ろ液を乾燥固定(40°C, 2h)させ、測定前に200µMのIS2 (3-Aminopyrrolidone, Trimesate)入りのMilli-Q 25µLにより溶かし、CE-TOFMSによりメタボローム測定を行った。

2.5 メタボロームデータ測定と解析

CE-TOFMSの測定条件は論文で発表されている設定に基づいた (Soga, et al., 2009)。Cationモードの測定では、溶融シリカキャピラリー (50 µm i.d.×100 cm)を用い、1Mのギ酸をランニングバッファ及びプレコンディショニングバッファとして用いた。サンプルは圧力50 mbar条件下で3秒をかけてインジェクト (~3 nL)し、+30 kVの電圧下でサンプルの測定を行った。また、シース液は5 mMの酢酸アンモニウムと0.5 µMレセルピンを含んだ50% (v/v)メタノールを流速10 µL/minで流していた。Anionモードの測定では、カチオンモード用キャピラリーSMILE (+) (Nacalai Tesque, Kyoto,

Japan)を用い、50 mMの酢酸アンモニウム (pH 8.5)をランニングバッファとして、50 mM 酢酸 (pH 3.4)をプレコンディショニングバッファとして測定した。サンプルは圧力50 mbar条件下で30秒をかけてインジェクトし (～30 nL), -30 kVの電圧下でサンプルの測定を行った。ヌクレオチドと補酵素Aの測定では、溶融シリカキャピラリーを用いて、50 mM酢酸アンモニウムをバッファに用いた。50 mbarの圧力と-30 kVの電圧下でサンプルの測定を行った。

CE-TOFMSにより測定したデータはMasterHands Ver.2を用い、標準物質の質量電荷 (m/z)とマイグレーションタイム (MT)を基準にしてアノテーションを付け、ピークの積分値 (Area)を求めた (Sugimoto, *et al.*, 2010)。

代謝物濃度を算出後、1細胞あたりの代謝物量は、式1により計算した。

$$1\text{細胞あたりの代謝物量}[\text{fmol/cell}] = ((\text{物質濃度} [\text{M}] \times \text{抽出に要したメタノール量} [\text{L}]) / \text{細胞数}) \times 10^{15} \quad \dots \text{式1}$$

この計算で用いた細胞数は、代謝物質抽出後のプレート内の細胞残骸量を定量して用いた。すなわち、代謝物質抽出後にメタノールにつけて定着させた細胞膜を、0.4%トリパンブルー溶液で染色した。プレートをPBSで洗浄後Dimethyl sulfoxide (DMSO)とMilli-Q各600μLを加えて細胞膜を溶かし560nmで吸光度を測定した。吸光度と細胞数は比例関係になることが分かっており、吸光度からプレートあたりの細胞数を算出した。

3. 結果

3.1 各生薬の投薬濃度と細胞生存率

MTTアッセイとトリパンブルー染色法により、細胞毒性範囲を把握し、表2に示す濃度で生薬の投薬量を定めた。MTTアッセイの結果が50%前後でかつトリパンブルー染色法の結果が80%以上になる生薬濃度で設定した。また、この実験により、各生薬の臨界濃度は異なるものの、ある濃度以前では生存率はほぼ80%以上であり、その濃度を超えると生存率が一気に50%以下に下がる臨界濃度があることが判明した (未表示データ)。

表2 各生薬の投薬濃度とその濃度下の細胞毒性領域

生薬名	四性	生薬添加濃度MTTアッセイトリパンブルー染色法		
		(mg/ml)	(%)	(%)
附子	熱	3	67	90
肉桂	熱	0.01	80	86
呉茱萸	熱	0.3	67	95
乾姜	熱	1	45	95
高良姜	熱	0.1	45	92
小茴香	温	0.3	55	93
丁香	温	0.1	65	94
烏薬	温	0.3	68	95
独活	温	1	87	93
川芎	温	1	61	93
麻黄	温	1	67	91
木香	温	0.1	88	88
黄芪	温	0.3	85	91
金銀花	寒	0.3	47	83
黄芩	寒	0.3	41	83
黄连	寒	0.3	43	87
苦参	寒	1	72	96
黄柏	寒	1	62	88
大黄	寒	0.1	87	93
連翹	寒	0.1	68	94

柴胡	寒	0.03	82	87
白頭翁	寒	0.1	45	97
青蒿	寒	0.1	68	83
丹参	寒	0.3	71	87
穿心蓮	寒	0.3	57	93
赤芍	寒	0.3	64	89
龍胆草	寒	3	65	94

3.2 生薬負荷下の培養細胞メタボローム

3.2.1 細胞内物質全体

細胞のメタボローム解析では、27種類の生薬添加を添加したNIH3T3細胞より157種類の物質が同定された。生薬未添加のNIH3T3細胞よりは119種類の物質が同定された。生薬添加により減少し、検出不可の濃度まで下がった物質と、添加により細胞内に現れた物質もあった(付録)。

U検定により、7種類の物質が熱性またはと寒性を与えた場合の二群で有意差が見られた($p<0.05$)。1-Methulnicotinamide (0.010), 2-aminobenzimidazole (0.028), Asparate (0.003), UDG-glucuronate (0.029), Methionine sulfoxide (0.035), Carnosine (0.042)は熱性生薬に多く、Diethanolamine (0.031)は寒性生薬に多かった。

3.2.2 エネルギー状態

先ず、サンプリング時点の細胞のエネルギー状態を知るために細胞のエネルギーチャージ $\{([ATP]+0.5 \times [ADP])/([AMP]+[ADP]+[ATP])\}$, GSH/GSSG, ATP/ADP, NADH/NADの値を求めた。エネルギーチャージは、細胞内エネルギー状態を表す指標で、生細胞は通常約0.8~0.9の値を示し、細胞内エネルギー状態が破綻するとこの値が低くなる。今回の測定では、コントロールの値は0.8であって、最も低い値は、丁香を与えた細胞の0.62であった。それ以外は、0.7~0.9の値を示し、コントロールの値とほぼ同じで、エネルギーチャージの観点から見れば細胞の健康状態は生薬によって破綻してないことを示した(図1A)。一方でGSH/GSSG, ATP/ADP, NADH/NADの値は、寒と熱の間に違いは見られなかったものの、生薬添加による変動がいくつかの生薬で観察された(図1BCD)。

GSH/GSSGは酸化ストレスの指標として使われている。細胞への添加により、この値がコントロール群より上昇した生薬には、茴香、烏薬、独活、木香、黄芪、金銀花、黄芩、苦参、柴胡があり、いずれも生薬添加による細胞内酸化還元状態の変化があったことを示唆した。しかしGSH/GSSGの変化に熱性生薬と寒性生薬の間での違いは見られなかった(図1B)。エネルギーチャージとGSH/GSSGはいずれも細胞毒性評価に使用されている。生薬添加によるエネルギーチャージの変動はほぼないが、GSH/GSSGの値は大きく変化しており、細胞生存率に関わらず、細胞内の酸化還元状態が変動していることを示した。

Koらの論文ではマウス実験により熱性生薬はATPの蓄積を促す結果を示しているが、培養細胞を用いた本実験ではATPの蓄積量は寒性生薬または熱性生薬を負荷した細胞間で有意差が見られなかった(未表示データ)。ATPは解糖系や酸化的リン酸化で合成され、体内分子との加水分解により消費される。そのため、ATP/ADPはATPの合成と消費のバランスを評価できる。また、ATPの量はADPの5~10倍のため、ATP/ADPの比はATP濃度そのものより変化を示せる。乾姜、小茴香、川芎、金銀花、黄連、黄柏を負荷した細胞ではコントロールと比べ、比較的高いATP/ADPの値が見られる(図1C)。

また、生薬添加後、ほとんどのNADH/NADの値がコントロールと比べ上昇していた(図1D)。NADH-NADのやり取りが多く行われているのはTCAサイクルであり、次の結果では、TCAサイクルを含む主要代謝経路に着目した。

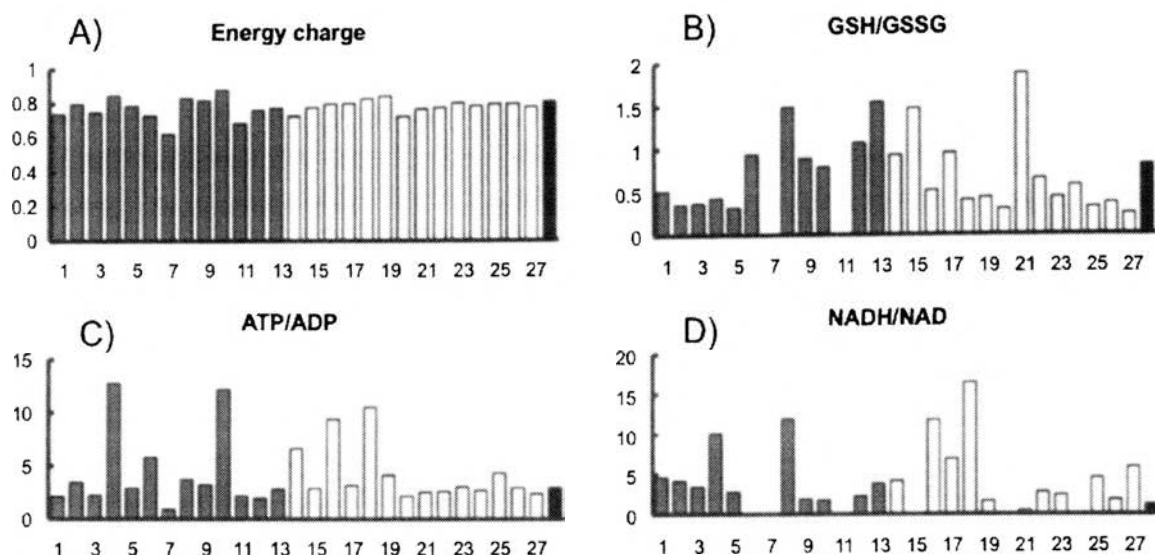


図1 灰色の棒グラフは熱/温性生薬を添加した細胞サンプル，白色の棒グラフは寒性生薬を添加した細胞サンプル，黒色の棒グラフはコントロール。生薬名は以下の通りである。1附子,2肉桂,3呉茱萸,4乾姜,5高良姜,6小茴香,7丁香,8烏薬,9独活,10川芎,11麻黄,12木香,13黄芪,14金銀花,15黄芩,16黄连,17苦参,18黄柏,19大黄,20連翹,21柴胡,22白頭翁,23青蒿,24丹参,25穿心蓮,26赤芍,27龍胆草,28コントロール

3.2.3 主要代謝経路

寒性生薬または熱性生薬を添加した際の細胞内の主要代謝経路の変化を俯瞰的に把握するため，寒，熱性生薬を投与した細胞内代謝物の平均値を求め，コントロール群に対する変化率を計算し代謝マップに示した（図2）。また，添加生薬の種類の違いにより，代謝変化が激しく，平均値ではデータを忠実に表せないため，コントロールと比べ，増加したサンプル数と減少したサンプル数を統計した。

解糖系前半の代謝物は比較的多くのサンプル内で減少している傾向が見える。Glucose 6-phosphatase(Glc6P)は熱性生薬を投与した細胞内でコントロールと比べ増加しているサンプルが多いが，その差が僅かであるため，平均値では逆に減少していた。だが，解糖系後半では，サンプル数，濃度ともに熱と寒の間で差が見られた。また，ペントースリン酸経路では，生薬を添加した細胞サンプルとコントロールのどちらからも検出された物質がなかった。

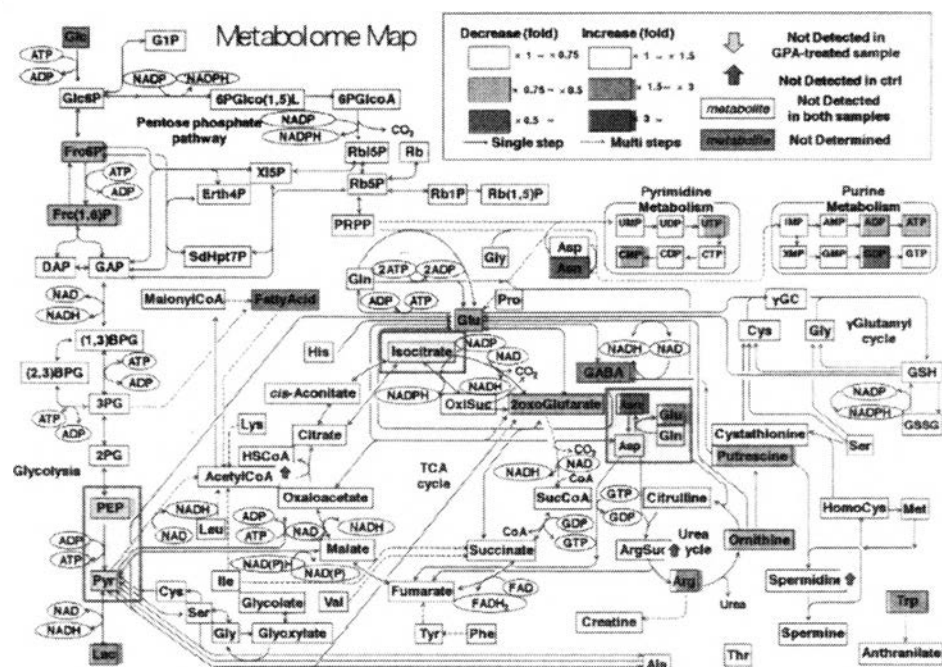
TCA回路では，Isocitrate，Oxalosuccinate以外にほとんどの代謝物がコントロールより増加している傾向が見られ，特にTCA回路後半のMalateはほとんどのサンプル内では増加していた。

尿素回路の反応物のアスパラギン酸は，熱性生薬を与えた細胞に増加，寒性生薬を与えた細胞には減少の傾向が見られた。また，熱性生薬を与えた細胞のOrnithineとPutrescineが寒性と比べ，減少している傾向があった。

Aspartic acid，Asparagine，Glutamine，Glutamic acidを除いたアミノ酸の変化は少なく，TryptophanとGABAは全体的に増加した。プリン，プリミジン類はAMPを除いて全体的に減少している傾向が大きい。

平均値データを総合的に評価し，サンプル濃度，サンプル数，ともに寒と熱のどちらかに偏りがあった物質は解糖系のPhosphoenolpyruvic acid (PEP)とPyruvate，TCA回路のIsocitrate，及びマン・ホイットニーのU検定でも最も有意差が顕著であった尿素回路に参与するAspartic acidであった。

A)



B)

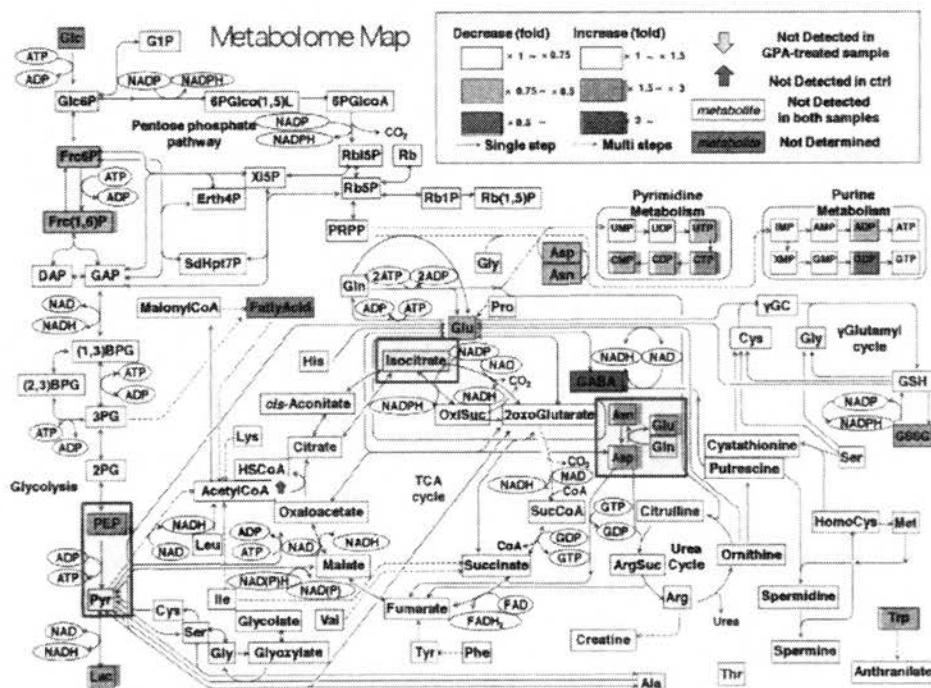


図2 濃度の平均値/コントロールの倍数を示した代謝マップ

A)熱性生薬を添加した時の細胞内代謝物濃度の平均値/コントロールの倍数

B)寒性生薬を添加した時の細胞内代謝物濃度の平均値/コントロールの倍数

緑系の色は物質平均濃度の減少を意味し、橙系の色は物質平均濃度の増加を意味している。

4 議論

本実験はまずマウスの皮膚培養細胞NIH3T3を用い、27種類の生薬負荷条件下における毒性テスト、ATP量測定などの実験を行い、細胞生存率が80%以上、細胞増殖が抑制されている生薬濃度を決定した。そして、培養細胞に生薬を添加した時の細胞内外のメタボロームデータ、及び添加した

生薬抽出液の成分をCE-TOFMSを用いて測定・解析した。

細胞内代謝物の解析では、まず生薬負荷による代謝物質全体の変動をプロファイリングした(付録)。寒と熱の生薬で同様な変動を示す物質は少ないが、生薬の添加により、細胞の代謝変動は大きく変動し、同じ細胞間でも代謝状態が異なることが分かる。また、コントロール群との比較で、コントロール群では検出されず、生薬添加培地及び生薬成分から検出された物質があった。これは一部の生薬成分は細胞膜を通過するものがあると予想できる。生薬添加によって全体的に濃度細胞内濃度の上昇を見せた物質はTryptophan, GABA, Lactateが見られる。Tryptophanはトリプトファン代謝経路において、tryptophan hydroxylase (1.14.16.4)と dopa decarboxylase (4.1.1.28)により抑制性神経伝達物質のserotoninに成りうる。GABAも抑制性の神経伝達物質である。

汎用的な指標を用い、細胞エネルギー状態を調べたところ、エネルギーチャージについてはいずれの生薬添加でも変化せず、細胞の健康状態が保たれていることを示唆した。一方、GSH/GSSG, ATP/ADP, NADH/NADの値は細胞間で比較的大きな差が見られた(図1)。GSH/GSSGの値より、生薬の添加により細胞内の酸化還元状態が大きく変化した可能性が考えられる。また、NADH/NADの値はコントロールと比べ生薬添加した細胞の多くで上昇が見られた。TCA回路の異化反応で1回転あたり3分子のNADHが得られる、このNADHは電子伝達系でNADに酸化され、ATPの合成に使用される。NADH/NAD比が高い状態では、TCAサイクルにより生産されたNADHは電子伝達系で使用されず、酸化的リン酸化のレベルが低下している可能性が考えられる。ATPも生薬添加により減少している細胞が多かったことから、酸化的リン酸化の停滞が支持される。細胞の生薬感受性試験では、MTTアッセイとトリパンブルー染色法2種類の毒性テストにより、細胞の増殖抑制が示された(表2)。このような増殖抑制は酸化的リン酸化レベルの低下によりATP生産が減少し、引き起こされている可能性が考えられる。

メタボロームデータを代謝経路にマッピングし、代謝経路ごとにその特徴を見た結果、ペントースリン酸経路では、コントロールと生薬添加サンプルとも物質が検出されなく、この経路では、生薬の添加による影響が少ないことを示している。解糖系の最終産物にあたるピルビン酸は、熱性生薬で減少していたサンプルが多く、寒性生薬で増加しているサンプルが多かった。TCA回路上のイソクエン酸はその逆の傾向を示し、熱性生薬では増加している傾向が多く、寒性では減少している傾向のサンプルが多かった。そして、TCA回路に入る物質のピルビン酸の差が見られたのに関わらず、TCA回路上の多くの物質は熱性生薬添加群と寒性生薬添加群で大きな違いはなく総じて蓄積しているように見られる。特に回路後半のSuccinate, Malateについてはほとんどのサンプルにおいて、コントロールより増加している傾向が見れる。前文で述べた酸化的リン酸化の停滞が原因に、このようなTCA回路後半の物質の蓄積が起こる可能性も考えられる。

熱性生薬添加群と寒性生薬添加群で違いがあった単一物質に着目すると、代謝マップからも、マンホイットニー検定からもAspartic acidは寒と熱の二群間で最も有意差が大きかった。代謝マップ上で近隣しているGlutamic acid, Glutamine, Asparagineには、Glutamic acidとAsparagineの2種類の生成物は全て減少する傾向が見られた。Aspartic acidとGlutamic acidは興奮性神経伝達物質として知られているが、Aspartic acidは熱性に多く、寒性に少ない傾向であったが、Glutamic acidは変動が在るが明確ではない。Aspartic acidの蓄積は熱性生薬投与の影響だと考えられ、熱性生薬の興奮性作用に寄与している可能性を示している。

5 結論・展望

本研究は生薬を培養細胞に投与することにより、寒と熱の表現型は代謝上どのような変動を示しているかを調べた。先行研究に示されている熱性の生薬による基礎代謝の上昇と、寒性の生薬による基礎代謝率を降下は細胞の実験では確認されなかった。一方で細胞のメタボロームデータ解析により、生薬による熱と寒の間で主に代謝変動の差が見られるのは、解糖系後半とTCA回路前半の物質、及びアスパラギン酸であった。また、NADH/NADの値の上昇と乳酸の蓄積より、生

薬添加によって酸化的リン酸化レベルが低下し、嫌気呼吸に移行していると考えられた。そのため、今後細胞の呼吸量などの観点から、生薬添加によるエネルギー代謝の変化について調べていきたい。

謝辞

本研究の研究期間につき、アドバイザーの飯野さんにいろんな指導、助言、援助及び楽しさを頂き、謝辞の場を借り感謝の気持ちを申し上げます。また、北川さん、杉本さんにも実験、分析でお世話になりました。最後、このような研究環境を提供して下さった冨田さんに感謝申し上げます。

参考文献

- DENG, J., QIN, H., LIU, L. and LIANG, Y. (2009). [Review and reflection on study of four properties of traditional Chinese medicine]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **34**, 3310-3312.
- KO, K. M. and LEUNG, H. Y. (2007). Enhancement of ATP generation capacity, antioxidant activity and immunomodulatory activities by Chinese Yang and Yin tonifying herbs. *Chin Med.* **2**, 3.
- LIU, Y. Q., CHENG, M. C., WANG, L. X., ZHAO, N., XIAO, H. B. and WANG, Z. T. (2008). Functional analysis of cultured neural cells for evaluating cold/cool- and hot/warm-natured Chinese herbs. *Am J Chin Med* **36**, 771-781.
- SOGA, T., IGARASHI, K., ITO, C., MIZOBUCHI, K., ZIMMERMANN, H. P. and TOMITA, M. (2009). Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem* **81**, 6165-6174.
- SUGIMOTO, M., HIRAYAMA, A., ROBERT, M., ABE, S., SOGA, T. and TOMITA, M. (2010). Prediction of metabolite identity from accurate mass, migration time prediction and isotopic pattern information in CE-TOFMS data. *Electrophoresis* **31**, 2311-2318.
- YU, H. Y., WANG, S. J., TENG, J. L., JI, X. M., WU, Z. C., MA, Q. C. and FU, X. J. (2012). Effects of Radix aconiti lateralis preparata and Rhizoma zingiberis on energy metabolism and expression of the genes related to metabolism in rats. *Chin J Integr Med* **18**, 23-29.