

エキスライブラリーの構築について

幾井 康仁

高知県立牧野植物園植物研究課

はじめに

2021年5月4日、自然・臨床科学専門オープンアクセス電子ジャーナル Scientific Reports に名古屋市立大学と高知県立牧野植物園の連携協定の成果となる論文が公開された (Tokugawa et al. 2021)。小胞体ストレス応答 (UPR) の慢性的な活性化を抑制し、がんをはじめとする疾患の治療につなげることを目的としたこの研究では、当園が構築し、保有するミャンマー産植物由来のエキスライブラリーが活用され、UPR 抑制活性についてのスクリーニングが実施された結果、キョウチクトウ科の植物である *Periploca calophylla* (Wight) Falc. の茎から抽出されたエキスに強力な活性が示された。このエキスからは「ペリプロシン」という UPR 抑制化合物が単離され、UPR 抑制作用の根幹となる分子構造を調べる試験や、実際ががん細胞を用いた試験が行われ、その効果が実証された。前述のとおり、本研究において植物由来の化合物から医学的に有用な結果が得られた背景には当園のエキスライブラリーが重要な役割を果たしている。そこで本稿では、スクリーニングとエキスライブラリーについて簡単に触れた後、現在筆者が行っている植物エキスの調製工程について紹介する。

1. 植物の有用性を評価するために

(1) スクリーニング

植物から医薬品や機能性食品、化粧品等ができるまでには多くの段階を経なければならない。まず、どの植物のどの部位が何に効果を発揮するのかを調べるため、植物から抽出されたエキスを用いたスクリーニングと呼ばれる選抜試験を行う。初期のスクリーニングでは主に酵素や抗体、細胞等を用いた試験によって、多くの植物エキスの中から効果の高い植物エキスを選抜していく。選抜に残った植物エキスは、さらに動物やヒトを対象とした試験によってその効果や安全性が検証され、実用化に向けた様々な取り組みが行われることになる。

(2) エクスライブラリー

当園にはこれまでに国内外で採取された分析用の乾燥植物サンプルが多数保管されている。しかし乾燥した葉や茎、根といった植物体そのものの状態ではスクリーニングの試験に使用できず、その有用性を評価することもできない。そこで、植物体からその成分を取り出した植物エキスが必要となるのだが、より効果の高い植物エキスを効率よく探索するためには、できるだけ多くの植物を一度に評価できる植物エキスのまとまりが求められる。そこで当園では、植物エキスの調製を継続して行い、スクリーニングにいつでも利用可能なエキスの集合体である「エキスライブラリー」の構築とその充実化を進めてきた。

2. 植物エキスができるまで

(1) 植物サンプルの乾燥

野外で採取した植物はまず部位ごとに分けた後、腐敗や変質を防ぐために乾燥させる。特に当園で乾燥を行う場合には、乾燥条件である温度と時間が設定でき、送風機能も付された専用の乾燥機を使用する (図1)。この乾燥機によって天候に左右されず、一定の条件下で、短い時間で乾燥が可能となっている (図2)。

次にシーラー (図3) を用いて乾燥した植物サンプルを脱気、密封した後、直射日光の当たらない、一定の温度に管理された条件下で保管する。こうすることで植物に含まれる化合物の変質を抑えることができ、任意のタイミングで植物エキスの抽出を行うことが可能となる。

(2) 植物エキスの調製

1) 粉碎と抽出

植物に含まれる成分の抽出をより効率的に行うため、まず乾燥した植物サンプルを料理に使われるような電動ミルを用いて粉碎する (図4)。粉碎した乾燥植物サンプル約1gに対し70%エタノール水溶液を20mL加え、よく攪拌する。その後、超音波洗浄器を用いて超音波を

30分間当て(図5), 植物に含まれる成分を70%エタノール水溶液に溶け出させる(図6, 7). この工程では水に難溶性成分も抽出できるように, 水とアルコールの混合溶液を溶媒として使用している.



図1. 植物サンプル専用の乾燥機.



図2. 乾燥済みの植物.



図3. 密封後の乾燥植物サンプルとシーラー.



図4. 粉碎した乾燥植物サンプル.



図5. 超音波処理中のサンプル.



図6. 超音波抽出前.

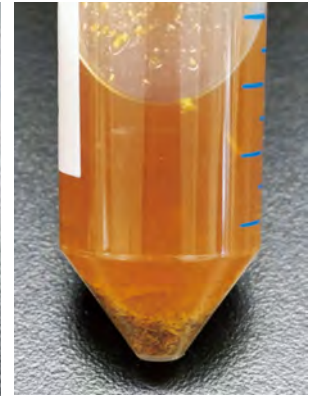


図7. 超音波抽出後.

2) 遠心分離とろ過

この工程は, 成分が溶液中に溶け出したことで不要となった植物の粉碎物を取り除く工程である. 遠心分離機(図8)を用いた遠心分離(7000 g, 10分間)を行うことにより, 粉碎物は容器の下方に沈殿し, 植物抽出物を含む70%エタノール水溶液は上澄み液として上方に分離する(図9). 可能な限り沈殿した粉碎物を避けて上澄み液を取り出し, 綿を使った簡易なろ過を行う. ろ過により溶液中に浮かんでいる固形の物質(植物の繊維片や細かい粉末など)まで取り除かれ(図10), 溶媒であるエタノールと水, そして植物抽出物の三つで構成される抽出液が得られる.



図8. 遠心分離機.



図9. 分離した溶液と植物の粉碎物.



図 10. ろ過後の抽出液.

3) 減圧濃縮

ろ過を終えた抽出液から溶媒を除去する工程となる。最終的に凍結乾燥によって溶媒を完全に除去するのであるが、その前に必ず濃縮を行う。濃縮を行わなかったり不十分であったりすると、凍結乾燥時に抽出物が細かい粉末となり容器から飛んで出てしまうことがある。また抽出液中のエタノールの割合が高いままであると、凍結乾燥機のポンプの寿命を短くしたり、凍結乾燥前に行う抽出液の凍結を阻害したりする原因となる。

減圧濃縮に用いるロータリーエバポレーターは（図 11）、内部の気圧を低く保った状態で液体の蒸発、回収

図 11. ロータリーエバポレーター。
矢印は水とエタノールの流れを示す。

を行うことができる装置であり、本工程では 50mbar 以下まで内圧を下げて使用する。この際、抽出液の入ったナス型のフラスコ（図 11 中、最も右の矢印下の緑色の液体が入った部分）を 40℃ に加温する。気体となったエタノールと水が機器の上方にある冷却器（図 11 中、左上の赤い不凍液が入っている部分）まで飛んで行き、冷やされて液体に戻り、直下のトラップ（図 11 中、左下の矢印の丸いガラス部分）へ流れ落ちて回収される。

こうして植物抽出物のみがナス型のフラスコ内に留まり、徐々に濃縮されていく。十分に濃縮を行った後、抽出液を -30℃ の冷凍庫内で凍結させ、凍結乾燥の工程へ進む。

4) 凍結乾燥

凍結乾燥機を用いて、凍結した抽出液から水を完全に除去する（図 12）。この機器は内部を 20Pa 以下という非常に低い圧力にまで減圧することにより、凍った抽出液中の水を水蒸気に昇華させる。水蒸気は容器から飛んで行き、機器内部に設置された -50℃ のトラップで再度水となって保持される。こうして抽出液中の水が徐々に取り除かれていき、最後には乾燥した植物抽出物のみが容器に残る（図 13）。



図 12. 凍結乾燥機.



図 13. 凍結乾燥後の植物抽出物.

5) 冷凍保管

乾燥を終えた植物抽出物を 100mg/mL の濃度となるようジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かし、エキスサンプルとして保管用のサンプルチューブに分注後、-30℃ の冷凍庫に保管する（図 14）。DMSO を保管用の溶媒として用いるのは、性質の異なる様々な物質を溶かしやすいという理由からであり、植物抽出物に含まれる未知の化学物質を溶かし、均質な溶液とするのに適当な溶媒である。

100mg/mL という濃度については、高濃度小容量で保管することにより、エキスをライブラリーの省スペース化に繋がる。また試験の際に試薬の発色や細胞の活性に影響を及ぼす DMSO の濃度をできるだけ低く抑えるためでもある。例えば、水を用いて 1000 倍に希釈し、100 μ g/mL の植物エキスとして試験に用いる場合、DMSO の濃度も十分に希釈され 0.1% となる。



図 14. エクシライブラリーとして冷凍保管される植物エキスサンプル。

3. 高知県産植物を使ったエクシライブラリー

筆者は現在、当園の新たなエクシライブラリーとして、高知県産植物を用いたエクシライブラリーの構築を進めている。原料となる植物の採取とエキスの調製を並行して行っており、2021年11月30日現在、約300種の植物サンプルを採取し、212種のエキス調製を終えている。

当園には高知県内の植物について調査・研究を行っている職員が在籍していることから、野外で目的の植物を採取することは難くない。また許可が下りれば園内に植栽された植物をサンプルとすることも可能であり、期間の限られる花や果実といった部位についても容易に採取できる。さらに希少種の栽培・増殖を担当している職員を頼れば、野外では採取不可となっている植物もサンプルとして扱うことが可能だ。このような高知の植物園であることの強みを活かし、高知県産植物のエクシライブラリーの構築とその充実化に引き続き努めていきたい。

引用文献

Tokugawa M., Inoue Y., Ishiuchi K., Kujirai C., Matsuno M., Ri M., Itoh Y., Miyajima C., Morishita D., Ohoka N., Iida S., Mizukami H., Makino T. and Hayashi H. 2021. Periplocin and cardiac glycosides suppress the unfolded protein response. *Sci Rep.* 11(1): 9528.