

生薬の酵素活性におよぼす影響について (第2報)
パンクレアチンのたん白消化作用におよぼすサンショウの影響について山崎勝弘^{*,a}, 横山 浩^a, 布浦由樹^a, 梅沢智佐江^b, 米田該典^c^a大阪府立公衆衛生研究所^b神戸学院大学薬学部^c大阪大学薬学部Studies on Effect of Crude Drugs on Enzyme Activities (II)
Influence of Zanthoxylum Fruit upon Protein Digestive Action by PancreatinKATSUHIRO YAMASAKI,^{*,a} HIROSHI YOKOYAMA,^a YOSHIKI NUNOURA,^a
CHISAE UMEZAWA^b and KAISUKE YONEDA^c^a Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69,
Nakamaichi, Higashinari-ku, Osaka 537^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-Gakuin University,
Aruse, Ikawadani, Tarumi-ku, Kobe 673^c Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6,
Yamadaoka, Suita, Osaka 565

(Received June 20, 1983)

Zanthoxylum plant fruit was tested for its effect on protein digestion by pancreatin and was found to suppress the proteolytic activity of pancreatin by about 21-92%, depending on the samples used. Zanthoxylum fruit contained various amount of Folin-Ciocalteu reagent-positive substances and those Zanthoxylum fruit samples with higher content of Folin-Ciocalteu positive substances were found to suppress the proteolytic activity more efficiently. Thus, a negative correlation was observed between the remaining proteolytic activity of pancreatin and the content of Folin-Ciocalteu reagent-positive substances. Those Zanthoxylum fruit samples with a higher Folin-Ciocalteu reagent positive substance content were found to contain more essential oils.

Keywords—stomachic crude drugs; Zanthoxylum fruit; pancreatin; trypsin; α -chymotrypsin; Folin-Ciocalteu reagent-positive substances; volatile oil from zanthoxylum fruit

サンショウ Zanthoxylum Fruit は、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一方、漢方では椒梅湯、大建中湯、当帰湯などに用いられる。

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¹⁾。したがって、原植物にはサンショウ以外にアサクラサンショウ、フユサンショウ等も薬用として広く生産、使用される一方、近年中国産山椒 (一般に花椒と称される) も市場に出回り、需要の増大とともに輸入量も年々伸びつつある²⁾。花椒は、*Z. simulance* HANCE を基源とし、薬用あるいは食用として国産サンショウ³⁾ とほぼ同様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。しかしながら、その薬効、成分についてはまだ十分解明されていない。

すでに、ケイヒの酵素活性におよぼす影響は、ケイヒの品質により残存プロテアーゼ活性値に明らかな差があることを報告した⁴⁾。今回、やはり芳香性健胃生薬として用いられるサンショウについても同様の検討を行った。山椒、花椒、さらに犬山椒等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ルリン反応陽性物質および精油含量との間の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異があるかどうかについても明らかにしたので報告する。

材料および方法

実験材料

サンショウ 供試した試料を TABLE I 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、酸不溶性灰分、精油含量などは J. P. X 生薬試験法⁵⁾により測定した。なお、試料はすべて粉末にしたのち、300 μ m のふるいで篩過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, XV, XX が 1981 年、II, V, X, XI, XII, XIII, XIV, XVII が 1982 年のもの、IV, XIX が 10 年以上前の古いものとなっている。

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、内果実は薄い。種子は IV 以外はほとんどなく、あっても極めて小さい。果柄も細く短い。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。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 は日本薬局方サンショウ (*Z. piperitum*) 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びているもの (IX, X)、開裂の少ないもの (VII, XV, XVI)、外面突起の多いもの (VI) 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、暗紫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 I)。

酵素

胃腸薬に繁用されるパンクレアチン (岩城製薬)、およびトリプシン (シグマ社、2 回再結晶、牛膵臓、12,000 BAEE units/mg)、 α -キモトリプシン (シグマ社、3 回再結晶、牛膵臓、46 units/mg) を用いた。

TABLE I. Properties of Zanthoxylum Fruit

Sample	Place of origin	Purity*		Total ash (%)	Acid-insoluble ash (%)	Volatile oil content (ml/30 g)
		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

* Foreign matter in each sample were unless 0.1%

酵素活性の測定

パンクレアチンのたん白消化作用の測定は前報⁴⁾と同様、カゼイン-フォリン法とカップ法で行った。また、トリプシンおよび α -キモトリプシンのプロテアーゼ活性測定にはパンクレアチン溶液のかわりにトリプシン、 α -キモトリプシンのそれぞれ0.002%溶液を用い、pH 7.5で酵素反応を行った。

フォリン反応陽性物質の測定

前報⁴⁾のとおり行った。

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である。使用機器：島津GC-6A (F. I. D)。カラム：2%, PEG-20 M 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°。試料気化室温度：230°。レンジ：2.56V。感度：10³MΩ。試料液注入量：3 μ l。

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. サンショウによるパンクレアチンのたん白消化作用への影響

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 IIのとおりである。各試料の添加によるパンクレアチンのたん白消化力は、カゼイン-フォリン法で測定した場合、対照と比較して約21から95%の広い範囲で活性値の低下が認められた。また、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。

TABLE II. Effects of Zanthoxylum Fruit on Proteolytic Activity of Pancreatin and Folin-Ciocalteu Reagent-Positive Substances in Samples

Sample ^{a)}	Activity (%) ^{b)}		Folin-Ciocalteu Reagent-Positive Substances
	by Casein-Folin method	by Cup method	Optical density at 660 nm
Control	100.0 ^{c)}	100.0 ^{c)}	—
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	0.222
V	33.0	46.0	0.475
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 crude drug was added per tube.

b) Each value represents the relative remaining activity (%).

c) Each value represents the average of 6 samples.

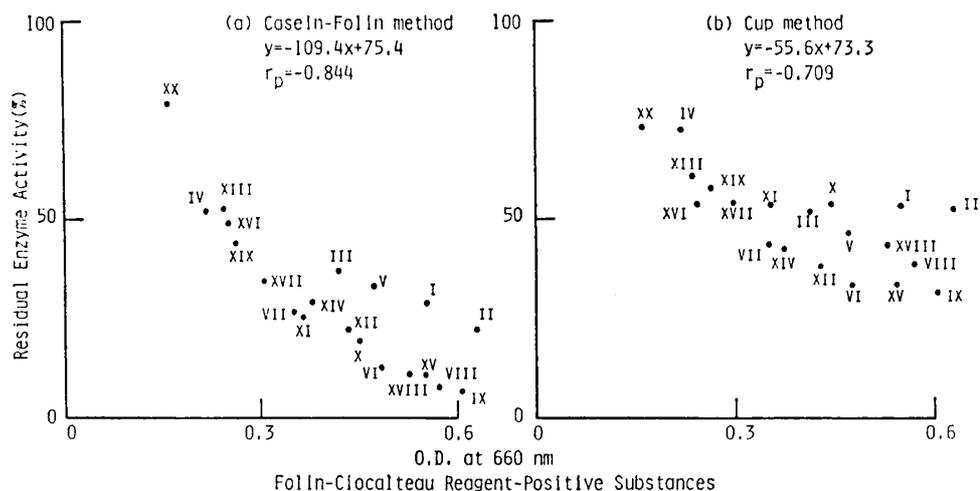


Fig. 1. Relationship between Proteolytic Activity of Pancreatin and Folin-Ciocalteu Reagent-Positive Substances in Zanthoxylum Fruit

Enzyme activity was determined by (a) Casein-Folin method and by (b) Cup method. r_p ; correlation coefficient. Correlation coefficient I-V; (a) -0.997 , (b) -0.736 . VI-XIX; (a) -0.962 , (b) -0.759 .

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が存在することが認められ、本物質の含量と上記酵素活性値に変動がみられる可能性がある。そこで、各試料中のフォリン反応陽性物質の量とパンクレアチンの残存プロテアーゼ活性値との相関性を検討した (Fig. 1)。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 など) で少ないことが確認された。(b) カップ法でも同じ傾向が確認され、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) を検討したところ、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 $y = -117.3x + 73.5$, $r_p = -0.962$ という結果が得られた。

3. プロテアーゼ活性への影響

サンショウ添加による酵素活性の低下が、パンクレアチンのたん白消化作用で認められたことから、プロテアーゼ

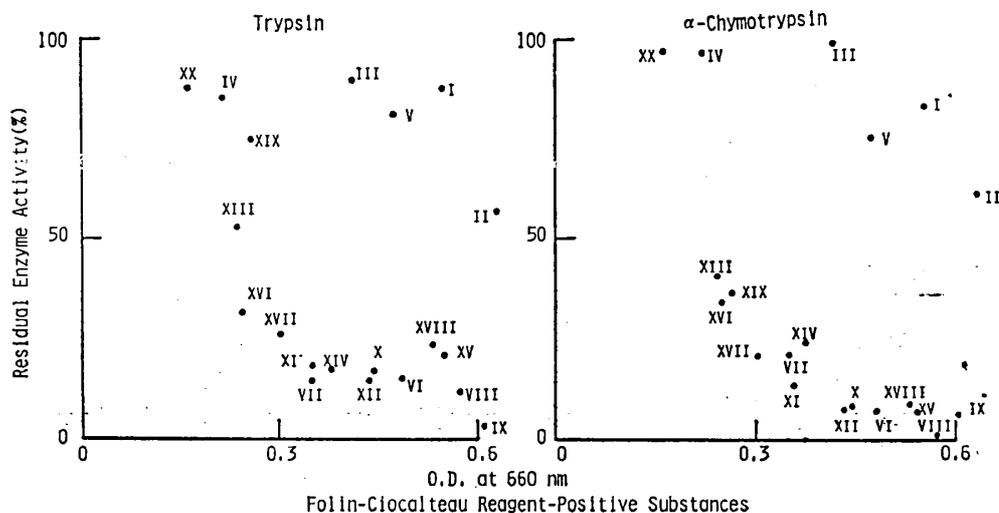


Fig. 2. Relationship between Folin-Ciocalteu Reagent-Positive Substances in Zanthoxylum Fruit and Proteolytic Activity of Trypsin and α -Chymotrypsin

Correlation coefficient VI-XIX; Trypsin -0.681 , α -Chymotrypsin -0.901 .

であるトリブシンと α -キモトリブシンとを用いて検討した (Fig. 2). トリブシンでは, 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) が下部に集合している. また, α -キモトリブシンでは試料 IV, XX が左上部, I, II, III, V がやはり右上部, 他が下部にほぼ1本の線上に集合していることが認められた. 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, プロテアーゼ活性値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) はトリブシンで $y = -101.2x + 66.1$, $r_p = -0.681$, α -キモトリブシンで $y = -92.1x + 55.2$, $r_p = -0.901$ である.

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, J. P. X 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¹⁾. 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 III). その結果, 果皮で活性低下が最も顕著に認められ, フォリン反応陽性物質も最も多く, 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試料中のフォリン反応陽性物質の量との

TABLE III. Effects of Part of Plant of Zanthoxylum Fruit (Sample XV) on Proteolytic Activity of Pancreatin, and Folin-Ciocalteu Reagent-Positive Substances in Each Part

Part of plant ^{a)}	Activity ^{b)} (%)	Folin-Ciocalteu Reagent-Positive Substances (optical density) ^{c)}
Control	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 was added per tube.

b) was determined by Casein-Folin method. Each value represents the relative remaining activity (%).

c) was determined by optical density at 660 nm.

d) Each value represents the average of 3 samples.

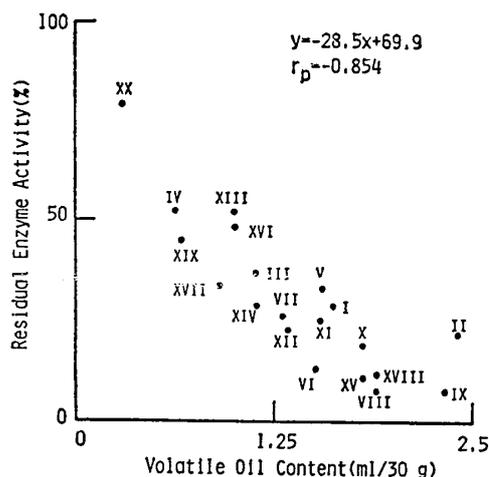


Fig. 3

Fig. 3. Relationship between Proteolytic Activity of Pancreatin and Volatile Oil Content from Zanthoxylum Fruit

Enzyme activity was determined by Casein-Folin method. r_p ; correlation coefficient. Correlation coefficient I-V; -0.950 VI-XIX; -0.880

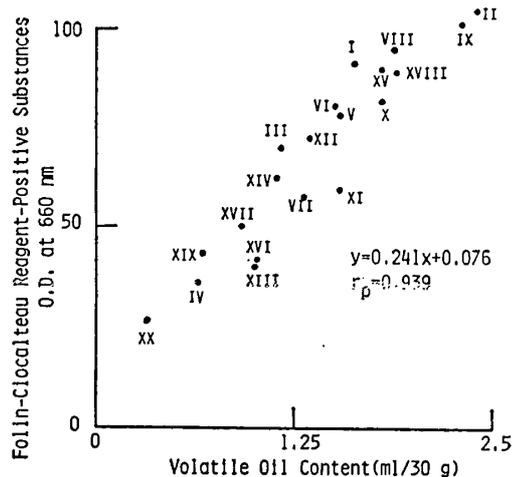


Fig. 4

Fig. 4. Relationship between Volatile Oil Content and Folin-Ciocalteu Reagent-Positive Substances in Zanthoxylum Fruit

r_p ; correlation coefficient. Correlation coefficient I-V; 0.962 VI-XIX; 0.920 .

間に相関性が認められるかどうかを検討した (Fig. 3, Fig. 4). Fig. 3 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いことが認められ (相関係数 -0.854), また, Fig. 4 に示すように、精油の多い試料では水溶性のソリン反応陽性物質も多く存在していることが認められた (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小さいことが認められた。

6. 精油成分のガスクロマトグラフィー

TABLE III で、精油成分の最も多い果皮で活性の低下が強く、また、Fig. 3 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プロテアーゼ活性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、プロテアーゼ活性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ことが認められたが、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る。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小さいことも認められた (Fig. 3)。

従来、山椒の精油成分については Sakai ら⁶⁾をはじめ、多くの研究報告があるが、花椒はわが国での需要が新しい

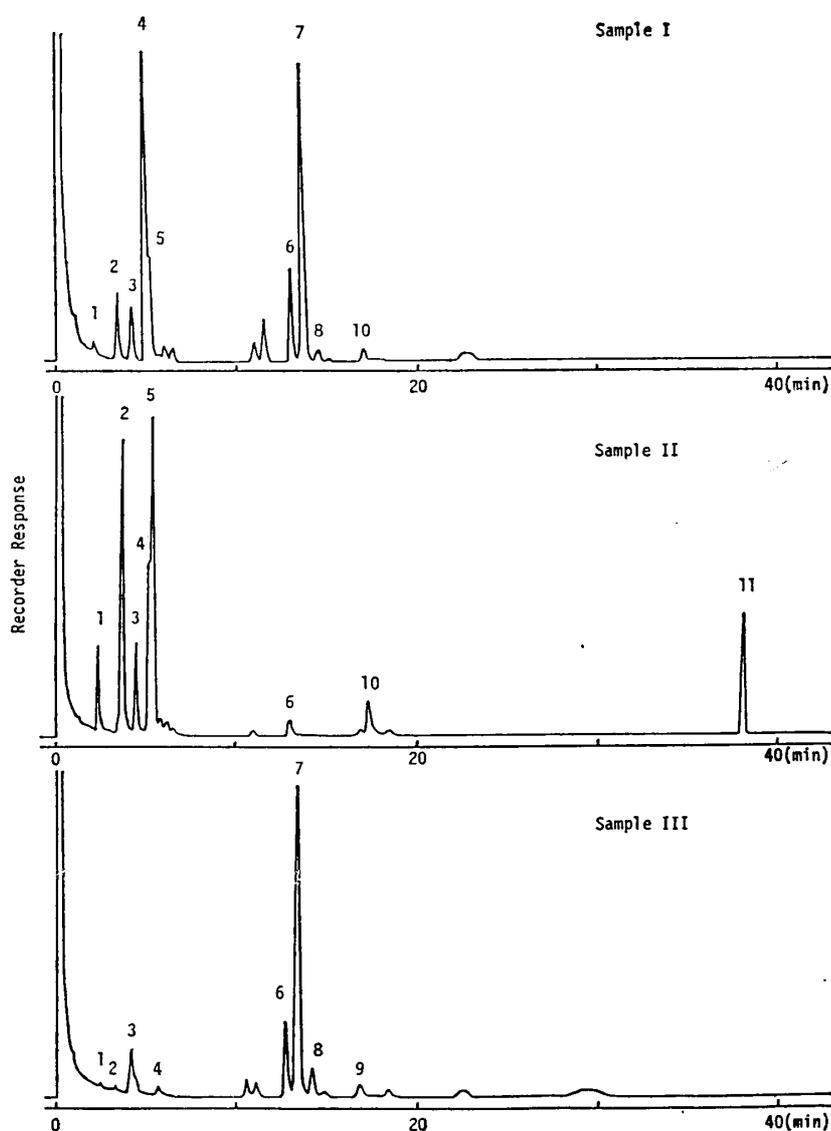


Fig. 5. Gas Chromatograms of Volatile Oil from *Zanthoxylum Simulacra* HANCE
Column: 2% PEG-20M on Chromosorb W (AW-DMCS) 100~120 mesh, 3 mm × 3 m; column temp.: temperature isothermal at 50° for 10 min then programmed at 5° per minute to 200° and run isothermal there after; detector oven temp.: 230°; injection port temp.: 230°; range: 512 × 0.01 V; sensitivity: 10³MΩ; sample size: 3 μl.

TABLE IV. Chemical Constituents of Volatile Oil from *Zanthoxylum Simulance* HANCE

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

ため、その精油成分についての研究は安田らの報告⁷⁾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⁷⁾を用いて行った(試料 I~III のガスクロマトグラムを Fig. 5 に示す)。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となった。すなわち I は limonene, isopulegol を、II は sabinene, β -phellandrene を⁸⁾、また III は isopulegol をそれぞれ主成分としていることが認められた。そのほかに α -pinene, myrcene, linalool などが各試料中に含まれていることが認められた。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ることが認められた。しかし、試料 I と 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。さらに、試料 V について検討したところ、そのガスクロマトグラムは I とほとんど同一のパターンを示し、形状も近似していた。よって、試料 V は和歌山産の山椒であるが、花椒に極めて近縁のものである。このことから、我国においても花椒と基源を同じくする植物が栽培され、生薬の生産にまで至っているものと考えられる⁹⁾。

考察および結論

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. 1, Fig. 2 で、パンクレアチンおよびプロテアーゼであるトリプシンおよび 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、この相関は顕著に認められた。試料中のフォリン反応陽性物質が同等の場合、山椒よりも花椒の方が活性に与える影響が小さいことも試められた。このことから、花椒の方が生体酵素への影響は少ないように思える。また、サンショウを消化酵素に配合、あるいは同時に服用する際は、酵素の活性、効果を考慮して、花椒またはフォリン反応陽性物質含量の少ない山椒を選ぶ方がよいと思われた。しかし、花椒に山椒と同程度の薬効が期待できるかどうか、また、本物質の少ない山椒は一般に古いものが多いことなどの問題点があり、今後さらに検討すべき必要がある。

サンショウの構成部分のうち、プロテアーゼ活性を最も強く低下させたのは果皮であった (TABLE III) が、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ことを確認しているが、Fig. 3, Fig. 4 で、サンショウ中の精油含量と、プロテアーゼ残存活性値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ものと思われる。このことから、サンショウ中のフォリン反応陽性物質の量を測定することは、消化酵素に配合した場合の、サンショウの酵素活性に与える影響と精油含量を知る上で、極めて簡便で有意義な品質評価の一手段になるとと思われる。さらに、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. 5) 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る。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⁷⁾、著者らの検討では数種に分類されることが推察された。したがって、多種類の花椒が市場に出回っている可能性がある。また、試料 V にみられたように、日本産の山椒中にも中国産花椒と同様の形状、成分を示すものが認められたことから、今後、花椒は国内においても栽培、生産が広まることが予測される。そのため、そ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と考える。なお、花椒については、今後さらに薬効的、品質的な検討を重ねる必要がある。

引用文献および注

- 1) 日本公定書協会編, 第10改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 1981, D-378.
- 2) 安田一郎, 瀬戸隆子, 下平彰男, 田窪栄一, 東京衛研年報, 31-I, 82 (1980).
- 3) 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。
- 4) 山崎勝弘, 横山 浩, 布浦由樹, 梅沢智佐江, 米田該典, 生薬, 36, 11(1982).
- 5) 日本公定書協会編, 第10改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 1981, B-117.
- 6) T. Sakai, K. Yoshihara, Y. Hirose, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 41, 1945 (1968).
- 7) 安田一郎, 竹谷孝一, 糸川秀治, 生薬, 36, 301(1982).
- 8) 試料 II のガスクロマトグラムで得られたピーク 11 が 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone であるかどうかは目下検討中である。
- 9) 詳細については和歌山県における調査を行い, 別に報告する。