

201235033A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

遺伝子及び成分化学情報の多変量解析に基づく

生薬及び漢方処方品質評価法に関する研究

平成24年度 総括・分担研究 XXXXXXXXXX 報告書

(H23-医薬-若手-015)

研究代表者 丸山 卓郎

平成25(2013)年3月

目次

I.	総括研究報告	
	遺伝子及び成分化学情報の多変量解析に基づく 生薬及び漢方処方品質評価法に関する研究	1
	丸山卓郎	
II.	分担研究報告	
	1. 多変量解析を利用した芍薬甘草湯の品質評価について	7
	丸山卓郎	
	2. 多変量解析を利用したカンゾウの品質評価について	
	内山奈穂子	
	¹ H-NMR スペクトルを用いたカンゾウのメタボローム解析における条件検討 について	12
	若菜大悟	
	¹ H-NMR スペクトルを用いたメタボローム解析によるカンゾウの産地と 品質の相関について	20
	若菜大悟	
	¹ H-NMR スペクトルを用いたメタボローム解析によるカンゾウの遺伝子型と 品質の相関について	30
	若菜大悟	
	メタボローム解析におけるピーク同定を目的としたカンゾウ成分の単離, 構造決定について	36
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	43

遺伝子及び成分化学情報の多変量解析に基づく 生薬及び漢方処方 の品質評価法に関する研究

研究代表者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長

研究要旨 本研究では、多変量解析を利用した漢方処方製剤の規格化を目指し、モデル処方として最も単純な漢方処方の一つである芍薬甘草湯を選択し、その構成生薬であるシャクヤク及びカンゾウについて検討を行っている。昨年度、シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性について調べるとともに、¹H-NMR スペクトルデータを利用した多変量解析によるシャクヤクの品質分類を行った。今年度は、同手法をカンゾウについて適用し、産地情報及び遺伝子情報と組み合わせた品質評価を行った。また、成分プロファイルの分類されたシャクヤク及びカンゾウを用いて調製した芍薬甘草湯に対しても、¹H-NMR メタボローム解析を適用し、漢方処方の成分プロファイルと原料生薬の成分プロファイルとの相関関係を調べた。

まず、¹H-NMR スペクトルデータを用いたカンゾウの品質評価について、条件検討を行った結果、昨年度、シャクヤクを材料に用いて検討した際と同様の条件で、多変量解析に供するのに十分なデータを取得することが可能であった。同手法によるカンゾウの品質評価では、PCA による解析では、成分変異の連続した集団が観察された。そこで、産地情報及び遺伝子情報を組み合わせた PLS-DA 分析を行ったところ、それぞれの情報に関連した品質分類に成功した。特に、今回検討した試料の 8 割を占めた T-4 型の遺伝子型を持つ試料が、高いグリチルリチン及びリクイリチン類含量を示したことは、日本薬局方が定めるグリチルリチンの含量規格が、生薬市場における選択圧として機能し、自ずと T-4 型の遺伝子型を持つ試料が、市場の主流となっていることをうかがわせた。

一方、芍薬甘草湯の品質評価では、シャクヤク由来の成分に比べ、カンゾウ由来の成分が、処方の成分パターンへの寄与率が高いことを示す結果が得られた。すなわち、第一及び第二主成分によるスコアプロットは、原料として用いたカンゾウの成分パターンを良く反映し、第三及び第四主成分によるスコアプロットは、原料としたシャクヤクの成分パターンを反映する結果となった。ただし、この結果は、グリチルリチンのメチル基及びペオニフロリン類の芳香族プロトンが、他の化合物由来のピークと良い分離を示したことによる影響が強く反映されており、処方全体の成分プロファイルを適切に評価していると判断

することは、拙速である。¹H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析は、水素核を有する成分を網羅的に観測出来るとともに、直接構造情報を得られるという利点を有する反面、検出感度及び分解能が低いという欠点を持っている。上記の結果は、NMR の分解能の低さに起因するものであり、これを補完するため、GC-MS, LC-MS など、高分解能の分析機器によるデータからの支援を組み合わせた手法が必要であると思われる。

研究分担者 内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 主任研究官
研究協力者 若菜大悟 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 流動研究員

である原料植物の遺伝的背景及び産地情報を生薬及び最終製品である漢方処方製剤の成分情報と結び付け、これらの要因が生薬の品質に与える影響の理解と影響を受ける成分の特定を目指した。

A. 研究目的

近年、国民の高齢化や食生活の欧米化に伴い、高血圧、糖尿病等の生活習慣病やアレルギー等の自己免疫疾患等、従来の医療では治療の困難な疾病が増加している。このため、従来の医療に代わる補完代替医療として、漢方医学に注目が集まっている。漢方医学による疾病治療を担うのは、数百種にも及ぶ生薬である。生薬は全て、動植物や鉱物を原料とするものであり、自然界から得られるものであることから、その品質を均質に保つ事が、化学合成薬に比べ難しい医薬品である。

生薬の品質に影響を与える主な要因は、1) 原料植物の種、品種あるいは系統 (遺伝子型)、2) 産地、栽培法等、成長時の環境、3) 収穫後の加工調製法の違いに大別される。これらの要因の内、加工調製法については、主産地である中国をはじめとする原産国が独自に行うものが多く、その方法は公開されていないものも多い。

そこで本研究では、残る 2 つの主要因

実験材料としては、シャクヤクとカンゾウの 2 種の生薬からなる最も単純な漢方処方である芍薬甘草湯を取り上げ、昨年度は、構成生薬であるシャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性の解析並びにシャクヤクの成分情報の網羅的解析を行った。

今年度は、カンゾウの成分情報の網羅的解析を行い、産地情報及び昨年度、明らかにした各試料の遺伝子型と成分情報の相関関係について調べた。

また、この 2 年間の研究で成分パターン分類を行ったシャクヤク及びカンゾウを用いて、芍薬甘草湯を調製し、原料植物の成分プロファイルと最終製品である芍薬甘草湯の成分プロファイルとの相関関係を調べた。

B. 研究方法

1. 実験材料

国内の生薬メーカー各社及び医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターより分譲を受けたカンゾウ及びシャクヤク試料を用いた。

2. 実験方法

2-1. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたカンゾウのメタボローム解析手法の条件検討

¹H-NMR スペクトルによるメタボローム解析の手順は、測定試料エキスの調製、¹H-NMR の測定、データ処理、そして多変量解析という流れになる。これらの手順の内、エキスの調製は、測定対象物の種類及び量、¹H-NMR 測定条件は、スペクトルデータの定量性及び定性性の精度、データ処理は、その後の多変量解析における精密度及び正確性に大きく影響を与えることから、これらの条件について、それぞれ検討を行った。

2-2. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたカンゾウのメタボローム解析

2-1. で確立された実験条件を用いてカンゾウのエキスを調製、¹H-NMR 測定を行い、得られたデータマトリックスを基に、PCA 解析を行った。また、産地情報及び遺伝子型をクラス変数に用いた PLS-DA 解析を行った。さらに、ローディングプロットからの化合物同定が困難な場合に備え、市販のカンゾウより成分分画を行った。

2-3. ¹H-NMR スペクトルデータを用いた芍薬甘草湯のメタボローム解析

昨年度及び今年度において、¹H-NMR スペクトルデータの多変量解析により、成分パターン分類を行ったシャクヤク及びカン

ゾウの試料から、各分類群を代表する個体を選び、全ての組合せで、芍薬甘草湯を調製し、¹H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析を行った。ただし、カンゾウの試料については、PCA において、明確な分類が出来なかったことから、第一主成分と第二主成分からなる二次元座標上の 4 隅に位置する個体及び原点付近に位置する個体を選択した。

C. 結果

1. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたカンゾウのメタボローム解析手法の条件検討

1-1. 抽出溶媒

重クロロホルム、重メタノール、重水を用いて検討を行った結果、重メタノールと重水の 1:1 混液が抽出溶媒として適当と考えられた。

また、測定溶媒として重水の代わりに、重水を用いて調製したリン酸緩衝液を抽出溶媒に用いる事で試料間の pH の違いに基づく化学シフトのズレを予防出来た。以上のことから、抽出溶媒は、重メタノールとリン酸緩衝液を含む重水溶液の 1:1 混液が適切と判断された。

1-2. 抽出濃度の検討

4 個体のカンゾウ試料について、1-20 mg/mL の範囲の濃度で、エキスを調製し、NMR スペクトルデータの PCA 解析を濃なった結果、寄与率 95% を示す第一主成分のスコアにおいて、濃度依存性が認めら

れた。各濃度値と第一主成分スコアの間で回帰分析を行った結果、いずれの個体も相関係数 0.99 以上を示し、良い直線性を示した。この結果に基づき、試料 10 mg を 1 mL の抽出溶媒で抽出することとした。

1-3. ダイナミックレンジの検討

カンゾウ試料 100 mg を 1 mL の溶媒で抽出したエキスを段階希釈し、それぞれの NMR スペクトルデータの PCA 解析を行った結果、2 倍積以上の希釈範囲と第一主成分スコアの高い相関関係が認められた。

2. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたカンゾウのメタボローム解析

2-1. 産地情報と成分プロファイル

¹H-NMR スペクトルパターンによる東北カンゾウと西北カンゾウの分類を試みた。東北カンゾウと西北カンゾウをクラス変数として、¹H-NMR スペクトルデータを PLS-DA 分析に供した結果、両者は、分離傾向が認められたものの、一部、他方の試料と重複するものが見られた。これら重複試料は全て、昨年度の研究において、遺伝子型が T-1, -2 型に分類されたものであった。そこで、試料の遺伝的背景の違いを除くため、T-1, -2 型の遺伝子型を持つ試料を除くとともに、¹H-NMR データについても、妨害成分の影響を除くため、直交シグナル補正 (OSC) による前処理を行った上で、再度、PLS-DA 分析を行った結果、東北カンゾウと西北カンゾウは、良好に分離可能であった。さらに、ローディングプロッ

トの解析から、西北カンゾウには、グリチルリチン類の、東北カンゾウには、スクロースの寄与が観測された。ただし、この2成分のみで東北カンゾウと西北カンゾウの分類を行うことは困難だった。

2-2. 遺伝子情報と成分プロファイル

昨年度の本研究で明らかにしたカンゾウの *trnH-psbA* IGS 領域の遺伝子型をクラス変数とし、¹H-NMR スペクトルデータを PLS-DA 分析に供した結果、各遺伝子型を持つ試料に分類が可能だった。また、各試料に特徴的な成分として、T-1 型には、グルコースおよびグルタミン、T-4 型には、グリチルリチン類、リクイリチン類が観測された。

3. ¹H-NMR スペクトルデータを用いた芍薬甘草湯のメタボローム解析

¹H-NMR メタボローム解析により、成分プロファイルを分類されたシャクヤク及びカンゾウを用いて調製した芍薬甘草湯について、¹H-NMR スペクトルを測定し、PCA 分析に供した結果、第一主成分と第二主成分とのプロットが、カンゾウの成分プロファイルを、第三主成分と第四主成分のプロットが、シャクヤクの成分プロファイルを反映していることが、明らかになった。

D. 考察

¹H-NMR スペクトルデータを用いた多変量解析によるカンゾウの品質評価及び昨年度、同様の研究を行ったシャクヤクとカ

カンゾウを用いて調製した芍薬甘草湯の品質評価を行った。

カンゾウの ¹H-NMR メタボローム解析の条件検討では、昨年度、研究を行ったシヤクヤクに適用した条件と同様の方法が適用可能であった。我々は、別の研究班において検討を行ったハンゲ、テンナンショウ、シンギについても同様の結果を得ており、他の生薬においても、重水及び重メタノールを用いたエキス調製が、¹H-NMR メタボローム解析に有用であると推察された。ただし、試料によって、pH の変動が大きい生薬については、ケミカルシフトのズレを抑制するため、リン酸緩衝液など、無機性の緩衝液の利用が必要である。

カンゾウの品質評価では、PCA 解析の結果、明確な品質分類は出来ず、連続した成分変異の集団が観察された。カンゾウは、同一ロット内の個体においても、成分変異の大きい生薬であることが知られており、今回の結果は、このことを支持するものであった。このため、産地情報や遺伝子情報などの付帯情報を組み合わせた PLS-DA 分析を行った結果、これらの情報と関連する成分プロファイルの分類に成功した。生薬の品質のバラツキは、遺伝的形質、生育（栽培）環境、加工調製法の違いが大きな要因であると考えられているが、カンゾウに関しても例外ではなく、遺伝的要素及び各産地における気候条件などの環境要因が、品質に大きな影響を与えていることが、示唆された。

Kojoma らは、同一条件で栽培したカン

ゾウの実生苗、100 個体のグリチルリチン及びリクイリチン含量を測定した結果、両化合物の成分変異は、前者で 10 倍、後方で 20 倍の個体差が認められたことを示している。環境及び加工調製法が同一条件であるにも関わらず、このような結果が得られていることは、これらの化合物の含量には、遺伝的形質の影響が大きいことを示しており、今回の研究で、遺伝子型と成分プロファイルの間に相関が見られたことと一致する。さらに、本研究では、T-4 型の遺伝子型を持つ試料が、他のものに比べ、高いグリチルリチン類及びリクイリチン類含量を持つことが示された。先の Kojoma らの報告においても、カンゾウ中のグリチルリチンとリクイリチン含量の間には、正の相関が見られることが示されている。トリテルペンであるグリチルリチンとフラボノイドであるリクイリチンは、異なった生合成経路により産生される二次代謝物であり、両者の含量が正の相関を持つ、詳細な理由は、分かっていないが、今回の研究結果は、Kojoma らの研究結果を支持するものであった。

日本薬局方では、カンゾウについて、含量規格値として、グリチルリチン 2.5% 以上を含むと規定している。今回の研究で、高含量のグリチルリチンを持つ T-4 型の遺伝子型を持つ試料が、全試料数の 8 割を占めた理由の一つとして、局方の規格基準により、自ずとグリチルリチン含量の高い遺伝子型を持つものが市場で選択されていることがうかがえた。

芍薬甘草湯の $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析では、シャクヤクに比べ、カンゾウ由来の成分が、データ全体の寄与率が高いことを示す結果が得られた。今回の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたメタボローム解析では、グリチルリチンはメチル基の、ペオニフロリンはフェニル基のピークが他の化合物由来のピークと良い分離を示し、PCA で重点的に評価されていた。PCA では数値の大きい変数が強調される傾向が見られるため、今回の解析結果ではカンゾウの影響がより累積寄与率の大きい変数で表現されたと考えられる。このため、NMR スペクトルだけではなく、LC-MS を初めとした他の成分分析データにおけるメタボローム解析についても検討する必要がある。

また、芍薬甘草湯はこむら返りに用いられる漢方製剤であり、多くの漢方処方の中でも、標的とする疾病状態が明確な処方である。従って、今後は、本研究で標準化された各芍薬甘草湯を用いて、鎮痙作用の強度を調べることにより、より高品質の芍薬甘草湯の成分プロファイルを明らかに出来ると期待される。

E. 結論

$^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析によるカンゾウの品質評価を行った結果、PCA による明確なクラス分けは、認められなかったが、PLS-DA 分析の結果、産地及び遺伝子的形

質と成分プロファイルとの間に相関関係が見出された。

また、成分プロファイル分類を行ったシャクヤク及びカンゾウを用いて調製した芍薬甘草湯の品質評価では、カンゾウ由来の成分の寄与率が、シャクヤク由来成分よりも高い傾向が見出され、これは、ピーク分離しているグリチルリチンとペオニフロリンの含量差によって引き起こされていると推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

1) 若菜大悟, 内山奈穂子, 丸山卓郎, 山本豊, 神谷 洋, 川崎武志, 林 茂樹, 菱田敦之, 川原信夫, 柴田敏郎, 合田幸広, シャクヤク及びカンゾウの多変量解析を用いた品質評価, 第41回生薬分析シンポジウム(2012. 11, 大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

研究分担者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長

多変量解析を利用した芍薬甘草湯の品質評価について

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 若菜大悟

研究要旨 化学成分情報のオミクス解析を用いた生薬の規格化及び標準化について検討するため、メタボローム解析により規格化されたカンゾウおよびシャクヤクを用い芍薬甘草湯を調製した。このものの¹H-NMR スペクトルによるメタボローム解析を行った結果、主成分分析（PCA）のスコアプロットに芍薬甘草湯を構成するカンゾウおよびシャクヤクの成分プロファイルが直接的に反映されることが明らかとなった。

研究目的 これまで我々は生薬、漢方製剤の規格化、標準化を行うため、シャクヤクおよびカンゾウのメタボローム解析を行ってきた。その結果、シャクヤクは PCA により産地ごとに分類される傾向が示唆された。また、カンゾウは PCA では明確な群は観測されなかったものの、PLS-DA 分析により、東北カンゾウと西北カンゾウの分類、遺伝子型による分類の可能性が示唆された。以上の結果をもとに、シャクヤクとカンゾウからなる漢方製剤、芍薬甘草湯について、規格化、標準化を行う目的で、メタボローム解析による評価を試みた。なお、用いた試料は、シャクヤクは PCA により産地ごとに分類されたので、各産地のものを選択した。カンゾウは PCA では特徴的な分類はなされなかったため、最も累積寄与率の大きくなる組み合わせである第 1 主成分および第 2 主成分を示したスコアプロットで、各軸に正もしくは負の値を持つもの、および原点付近のものをそれぞれ選択した。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

シャクヤクは株式会社ウチダ和漢薬および医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部より譲り受けた。カンゾウは株式会社栃本天海堂より譲り受けた（Table 1）。HPLC には HPLC グレードの溶媒を用いた。重溶媒は太陽日酸から購入し、重水は 99.8% のもの、重メタノールは 99.9% のものを用いた。

2. 実験方法

2-1. 試験溶液の調製

カンゾウ及びシャクヤクを 4 分割し、ボールミルを用い 30 Hz, 1 min の条件で粉碎した。その粉末 10 mg ずつを正確に測り取り混和後、抽出溶媒 1 mL を加え、5 Hz, 30 分振とう抽出を行った後、3000 rpm で 10 分間遠心分離を実行し、得られた上清を試験溶液として用いた。抽出溶媒は重メタノールと重水で調製したリン酸緩衝液を 1:1 で混合した

ものに、基準物質として trimethylsilyl-2,2,3,3- d_4 -propionic acid Na 塩を 0.025% 添加したものをを用いた。

2-2. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定には ECA-800 型核磁気共鳴装置 (Jeol) をを用いた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは non spin 系で x offset = 5 ppm, x sweep = 30 ppm の範囲を測定した。積算回数は 64 回とした。この時、relaxation time は 5 s とした。

2-3. データ解析

バケット積分は Alice2 for metabolome (Jeol) をを用い、0.08 ppm 単位で行った。多変量解析は SIMCA v13 (Umetrics) をを用い、前処理方法としてパレートスケールを適用した。

<倫理面での配慮>

本研究では、ヒト及び動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

カンゾウおよびシャクヤクを 10 mg ずつ混和し、抽出を行い調製した試験溶液について、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、PCA を行った。そのスコアプロットを Fig. 2 に示した。本図は横軸に第 3 主成分、縦軸に第 4 主成分を記したもので、各色はシャクヤクのロットを示している。これからシャクヤクの産地ごとに偏在していることが確認された。次に、第 1 主成分と第 2 主成分をプロットした場合、カンゾウのロットごとに分類される傾向が確認された (Fig. 3)。

D. 考察

今回、これまでメタボローム解析を行ったカンゾウおよびシャクヤクを試料として用い、芍薬甘草湯の規格化、標準化を試みた。その結果、PCA における第 1 主成分と第 2 主成分で評価した場合、カンゾウの成分プロファイルの影響が反映された分類がなされることが確認された。また、第 3 主成分と第 4 主成分にて評価した場合、シャクヤクが直接的に芍薬甘草湯の成分プロファイルに関与していることが示唆された。

第 16 改正日本薬局方によると、カンゾウは乾燥生薬に対し 2.5% 以上のグリチルリチンを、シャクヤクは乾燥生薬に対し 2.0% 以上のペオニフロリンを含むと規定されている。また、今回の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたメタボローム解析では、グリチルリチンはメチル基の、ペオニフロリンはフェニル基のピークが他の化合物由来のピークと良い分離を示し、PCA で重点的に評価されていた。PCA では数値の大きい変数が強調される傾向が見られるため、今回の解析結果では、3 個分の水素核を有するメチル基が指標となっていたカンゾウの影響がより累積寄与率の大きい変数で表現されたと考えられる。このため、NMR スペクトルだけではなく、LC-MS を初めとした他の成分分析データにおけるメタボローム解析についても検討する必要がある。

また、芍薬甘草湯はこむら返りに用いられる漢方製剤であり、多くの漢方処方の中でも、標的とする疾病状態が明確な処方である。従って、今後は、本研究で標準化された各芍薬甘草湯を用いて、鎮痙作用の強度を調べることにより、より高品質の芍薬甘草湯の成分プロファイルを明らかに出来ると期待される。

E. 結論

今回、芍薬甘草湯のメタボローム解析を行った結果、構成するカンゾウおよびシャクヤクの成分プロファイルが直接的に反映されることが明らかとなった。今後、各成分プロファイルを有する芍薬甘草湯の鎮痙作用の強度を調べることにより、より薬用価値の高い芍薬甘草湯の成分パターンを明らかにするとともに、そのような芍薬甘草湯を調製するために必要なシャクヤク及びカンゾウの成分パターンも規格化出来るものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

3. 特に無し

4. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

Table 1 Detail of Glycyrrhizae and Paeoniae Radix using in this study

カンゾウ			シャクヤク		
ロット	入手年月	産地	ロット	入手年月	産地
Ka-1-1	1994, 3	吉林	H1-C1	2008	北海道
Ka-1-2	1994, 3	吉林	N4-A1	2009	新潟
Ka-2-2	1995, 5	内モンゴ	N6-A2	2009	新潟
Ka-3-1	1998, 11	内モンゴ	T2-A2	2009	安徽
Ka-5-3	2002, 9	内モンゴ	Y1-A1	2008	奈良
Ka-21-5	1994, 10	甘肅			
Ka-24-1	2003, 6	内モンゴ			
Ka-25-2	2003, 6	内モンゴ			
Ka-26-1	2007, 8	内モンゴ			
Ka-28-3	2009, 12	内モンゴ			

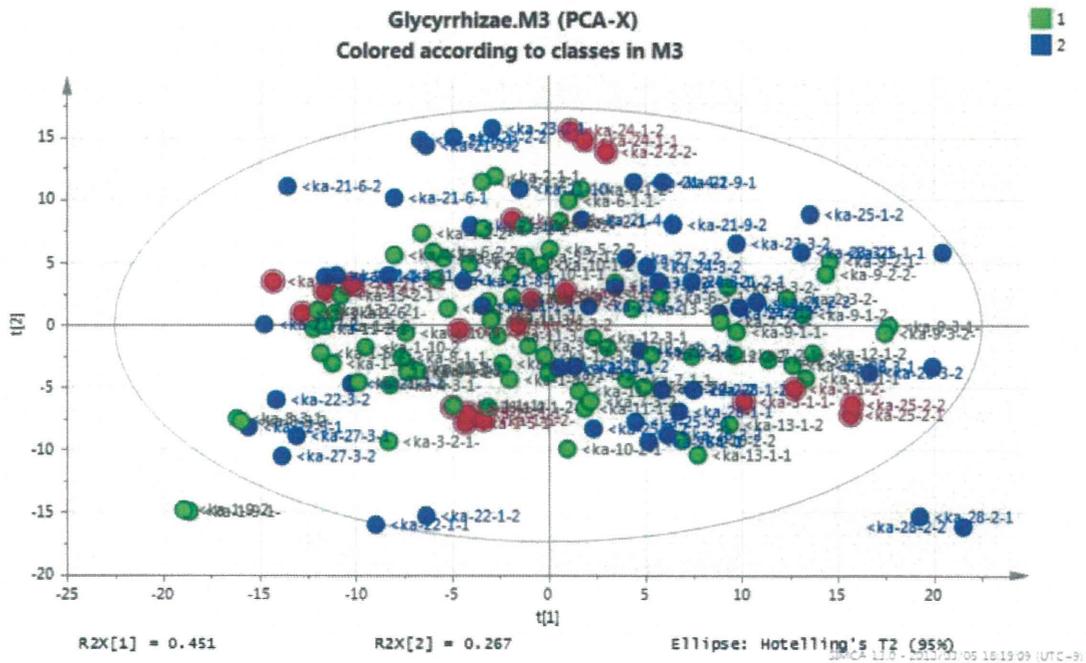


Fig. 1 PCA score plot for Glycyrrhizae Radix.

red: samples used in this study

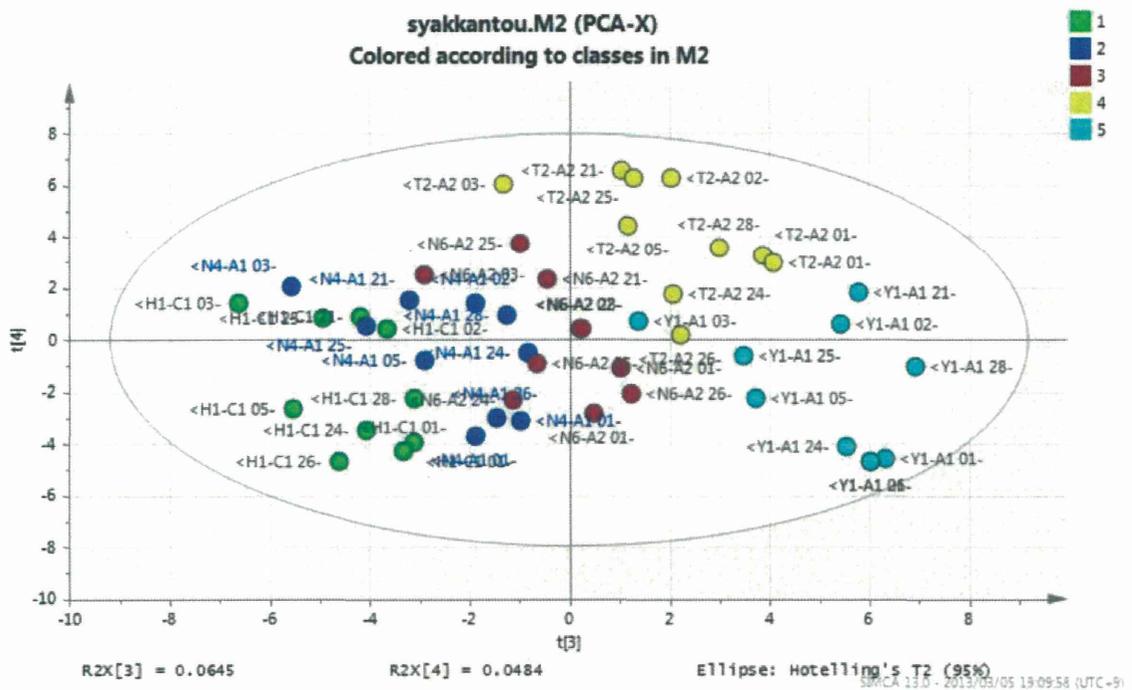


Fig.2 PCA score plot for syakuyakukanzoto colored by each Paenoniae Radix.
Green: Hokkaido, Blue: Niigata, Red: Niigata, yellow: China, Aqua blue: Nara

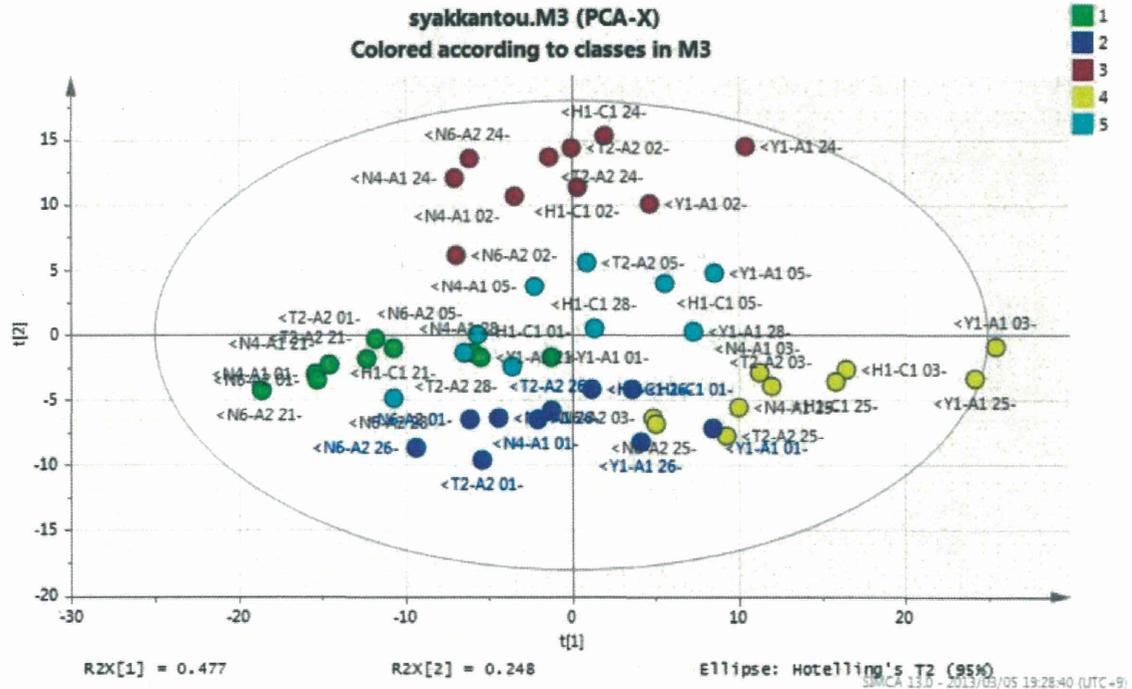


Fig.3 PCA score plot for syakuyakukanzoto colored by Glycyrrhizae Radix.

研究分担者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 主任研究官

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたカンゾウの メタボローム解析における条件検討について

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 若菜大悟

研究要旨 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたカンゾウのメタボローム解析を適正に行うため、抽出濃度及び $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定・解析方法の検討を行った。その結果、10 mg のカンゾウ末を抽出溶媒 1 mL を用いて抽出することで適正な結果が得られることが判明した。

研究目的 近年、多量のデータを網羅的に取得し、解析を行うオーム科学が発展し、様々な研究分野に活用されている¹⁻³⁾。我々は、生薬・漢方製剤の品質管理・評価の場におけるオーム科学の有用性を検討するため、汎用生薬の一つであるカンゾウを材料に、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたメタボローム解析を行った。

昨年度、分担研究報告書に記載したシャクヤクの場合と同様に、多変量解析における精密度及び正確性に大きく影響を与えるエキスの調製及びデータ処理について検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

カンゾウは株式会社栃本天海堂より、東北カンゾウ 13 ロット、西北カンゾウ 18 ロットを譲り受けた (Table 1)。

HPLC には HPLC グレードの溶媒を用いた。重溶媒は太陽日酸から購入し、重水は 99.8% のもの、重メタノールは 99.9% のものを用い

た。

2. 実験方法

2-1. 試験溶液の調製

カンゾウの粉末化は MM-300 型ボールミル (Qiagen) を用い、1 分間、30 Hz の条件で行った。シャクヤクエキスの抽出は SR-2w 型振とう機 (Taitec) を用い、30 分、5 Hz で行った。抽出後 3000 rpm で 10 分間遠心分離をし、得られた上清 600 μL を試験溶液として用いた。

2-2. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

NMR スペクトルの測定には ECA-800 型核磁気共鳴装置 (Jeol) を用いた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは non spin 系で x offset = 5 ppm, x sweep = 30 ppm の範囲を測定した。積算回数は 64 回とした。この時、relaxation time は 5 s とした。

2-3. 抽出濃度の検討

東北カンゾウ 2 個体 (ka-1, 2 個体), 西北カンゾウ 2 個体 (ka-21, 2 個体) の計 4 個体を選択し, それぞれの粉末を 1 mg, 3 mg, 5 mg, 7 mg, 10 mg, 15 mg および 20 mg 量り取り, それぞれに抽出溶媒 1 mL を加え, 30 分振とう抽出を行った. 抽出後, 10 分間, 3000 rpm で遠心分離を行い, その上清 600 μ L を試験溶液とし $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定を行った. 得られたスペクトルデータを JEOL 製 Alice2 for metabolome を用い, 0.08 ppm 単位でバケット積分を行い, データマトリックスを作成した. このデータマトリックスを Infometrics 製 Pirouette もしくは Umetrics 製 SIMCA v13 を用いて主成分分析 (PCA) により解析した.

2-4. ダイナミックレンジの検討

カンゾウ末を 100 mg 量り取り, 抽出溶媒 1 mL を加え 30 分振とう抽出を行った. 抽出後, 10 分間, 3000 rpm で遠心分離を行い, その上清 600 mg を分取した. これについて順次 2 倍希釈を行い, 64 倍希釈の濃度まで調製し, それぞれ $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した. データ解析は JEOL 製 Alice2 for metabolome を用い, バケット積分を 0.08 ppm 単位で行った. PCA は Infometrix 社製 Pirouette または Umetrics 社製 SIMCA v13 を用い, 無処理のマトリックスデータを PCA にて処理した.

<倫理面での配慮>

本研究では, ヒト及び動物由来試料を用いた実験は行わず, 倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる.

C. 結果及び考察

1. 抽出方法の検討

$^1\text{H-NMR}$ を用いたカンゾウのメタボローム解析に最適な抽出溶媒を選択するため, 重クロロホルム, 重メタノール, 重水を用いて抽出を行い, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した. その結果, シャクヤクの場合と同様に重クロロホルムは抽出溶媒として適さず, 重メタノール及び重水抽出時に第 16 改正日本薬局方において, カンゾウの確認試験及び含量規格の指標成分に規定されているグリチルリチンが検出された. そのため, 重メタノールと重水の 1:1 混液が抽出溶媒として適当と考えられた. また, 一部のピークにおいて, ケミカルシフトのズレが観察されたが, 重水の代わりに, 重水を用いて調製したリン酸緩衝液を抽出溶媒に用いる事で解消された. 以上のことから, 抽出溶媒は, 重メタノールとリン酸緩衝液を含む重水溶液の 1:1 混液を用いることとした.

さらに, 基準物質として水溶性であり, かつ不揮発性である trimethylsilyl-2,2,3,3- d_4 -propionic acid Na 塩 (d_4 -TMSF) を用いる事とした.

2. 抽出濃度の検討

抽出に用いるカンゾウ末の量を変化させると抽出量に変化し, 得られる $^1\text{H-NMR}$ スペクトルも変化する可能性がある. そこで, 適当な抽出濃度を設定するため, 4 個体のカンゾウを用い, 複数濃度の試料を調製し, それぞれの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータの PCA を行った. なお, ここで用いる濃度とは (カンゾウ末量)/(抽出溶媒量) を示している. PCA のスコアプロットを Fig. 1 に示した. 本図は横軸

に第 1 主成分、縦軸に第 2 主成分を記したもので、ka-1-1 を緑、ka-1-3 を青、ka-21-1 を赤、ka-21-3 を黄色で示している。なお、試料の名称は (ロット番号)-(個体番号)_(濃度) を示している。PCA スコアプロットから、第 1 主成分は濃度と相関があり、第 2 主成分は個体差を表していることが示唆された。そこで第 1 主成分スコアと濃度の相関を確認するため、横軸に濃度、縦軸に第 1 主成分スコアを記したグラフを作成した (Fig. 2)。直線性を示す指標である R^2 値は 4 個体全てで 0.99 以上を示したため、第 1 主成分スコアと濃度の間に強い相関関係があることが示唆された。また、第 1 主成分スコアの寄与率は 95 % と高い値を示していたため、第 1 主成分スコアはスペクトルデータの総体と考えられる。よって、今回用いた試験溶液の濃度範囲では、濃度と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータ間の相関が確認されたと判断した。以上の結果から、カンゾウ末 10 mg を抽出溶媒 1 mL で抽出することとした。

3. ダイナミックレンジの検討

800 MHz NMR を用いた場合のダイナミックレンジを確認するため、カンゾウ末 100 mg を量り取り、抽出、及び希釈操作を行い、得られた試験溶液の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルについて PCA を行った。PCA スコアプロットを Fig. 3 に示した。これは横軸が第 1 主成分スコア、縦軸が第 2 主成分スコアを示し、サンプル名は (ロット番号)-(個体番号)/(希釈倍率) を示している。この図から第 1 主成分が希釈倍率と相関を示す可能性が示唆されたため、希釈後の濃度と第 1 主成分スコアからなるグラフを作成した (Fig. 4)。その結果、濃度と第 1 主成分スコアには強い相関が認め

られることが確認された。また、第 2 主成分スコアについては、無希釈の試験溶液のみ他の希釈溶液と比べ外れ値を示していた。これを解明するため、ローディングプロットの確認を行った (Fig. 5)。本図は横軸に第 1 主成分のローディングスコア、縦軸に第 2 主成分のローディングスコアを示したものであり、各プロットはパケット積分範囲を記した。その結果、第 2 主成分について、負の影響を与えるものとして、赤で示したパケット積分範囲が考えられた。この赤点をスペクトルデータ上に反映したものを Fig. 6 に示した。Fig. 6 は横軸にケミカルシフト値、縦軸に積分値を示したもので、同一希釈濃度の点を繋いで表現したものである。Fig. 5 において赤で示した積分範囲を赤丸で示しており、この部分は、無希釈の試験溶液はピークのずれが生じている、もしくはピークがブロードリングしていることが示唆された。以上の結果から、2 倍希釈以下の濃度範囲においてダイナミックレンジの保証がなされることが示唆された。

D. 結論

今回、 $^1\text{H-NMR}$ を用いたメタボローム研究を行う際の試料調製法等の検討を行った。カンゾウは高濃度の溶液を用いるとケミカルシフトのずれが発生した。また、800 MHz の NMR を用いた場合、カンゾウ 10 mg から調製した試験溶液でも濃度と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータ間に相関が確認されたため、カンゾウでは本濃度で測定を行うこととした。

E. 研究発表

1. 論文発表
特に無し

2. 学会発表

1) 若菜大悟, 内山奈穂子, 丸山卓郎, 山本豊, 神谷 洋, 川崎武志, 林 茂樹, 菱田敦之, 川原信夫, 柴田敏郎, 合田幸広, シャクヤク及びカンゾウの多変量解析を用いた品質評価, 第41回生薬分析シンポジウム(2012. 11, 大阪)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

参考文献

- 1) S. Hayashi, S. Akiyama, Y. Tamura, Y. Takeda, T. Fujiwara, K. Inoue, A. Kobayashi, S. Maegawa, E. Fukusaki, A novel application of metabolomics in vertebrate development, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **386**, 268-272 (2009)
- 2) R. P. Hopton, E. Turner, V. J. Burley, P. C. Turner, J. Fisher, Urine metabolite analysis as a function of deoxynivalenol exposure: an NMR-based metabolomics investigation, *Food Additives and Contaminants*, **27**(2), 255-261 (2010)
- 3) H. Wen, S. Kang, Y. Song, Y. Song, S. H. Sung, S. Park, Differentiation of cultivation sources of *Ganoderma lucidum* by NMR-based metabolomics approach, *Phytochem. Anal.*, **21**, 73-79 (2010)

Table 1 Details of Glycyrrhizae Radix used in this study.

東北カンゾウ					西北カンゾウ				
ロット	入手 年月	産地	数	Gly	ロット	入手 年月	産地	数	Gly
Ka-1	1994, 3	吉林	10	4.04	Ka-21	1994, 10	甘肅	10	6.77
Ka-2	1995, 5	内蒙古	3	5.41	Ka-22	1995, 9	陝西	3	3.53
Ka-3	1998, 11	内蒙古	3	4.88	Ka-23	2000, 8	寧夏	3	4.83
Ka-4	1999, 7	内蒙古	3	4.88	Ka-24	2003, 6	内蒙古	3	5.82
Ka-5	2002, 9	内蒙古	3	6.12	Ka-25	2003, 6	内蒙古	3	3.35
Ka-6	2004, 3	内蒙古	3	6.63	Ka-26	2007, 8	内蒙古	3	3.14
Ka-7	2005, 7	内蒙古	3	4.23	Ka-27	2009, 3	甘肅	3	6.82
Ka-8	2006, 12	内蒙古	3	4.65	Ka-28	2009, 12	内蒙古	3	3.00
Ka-9	2007, 2	内蒙古	3	4.20					
Ka-10	2008, 6	内蒙古	3	3.42					
Ka-11	2009, 1	内蒙古	3	4.12					
Ka-12	2010, 5	内蒙古	3	4.83					
Ka-13	2011, 3	内蒙古	3	3.43					

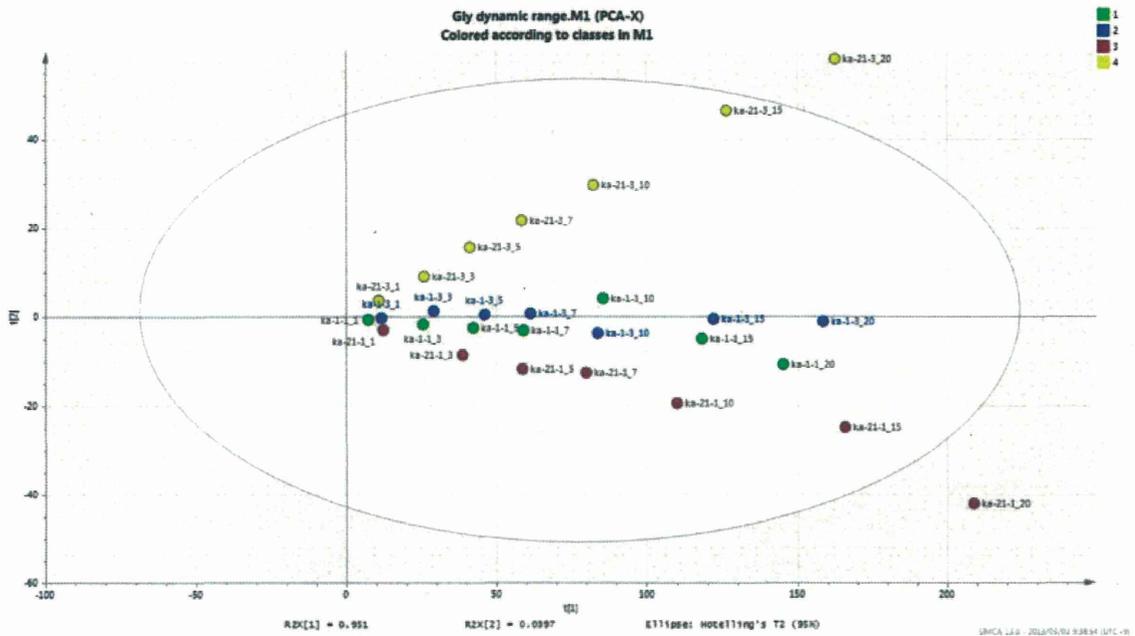


Fig.1 PCA score plot of Glycyrrhizae Radix using 7 concentrations.
 Green: ka-1-1, Blue: ka-1-3, Red: ka-21-1, Yellow: ka-21-3

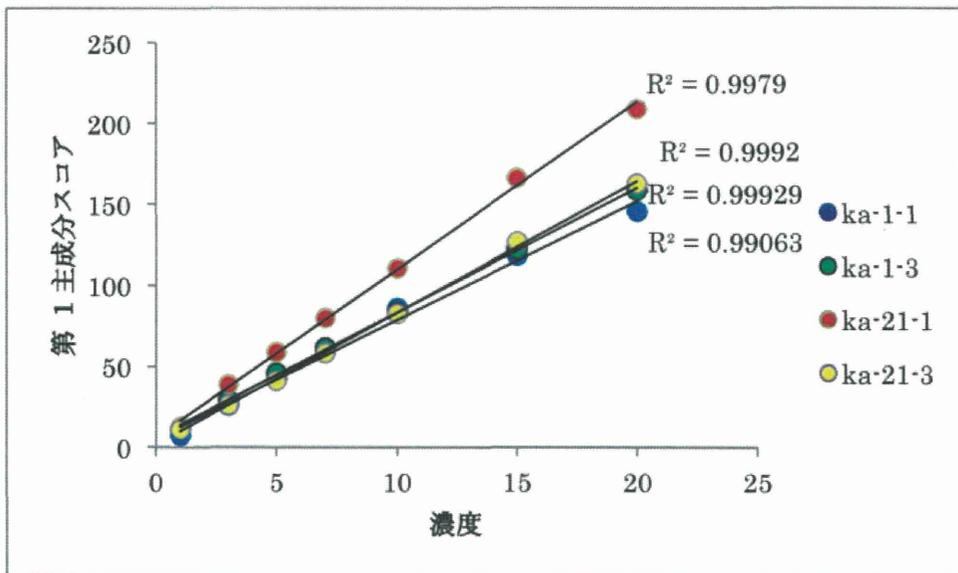


Fig.2 The linearity between the concentrations and the PCA score values of factor 1.

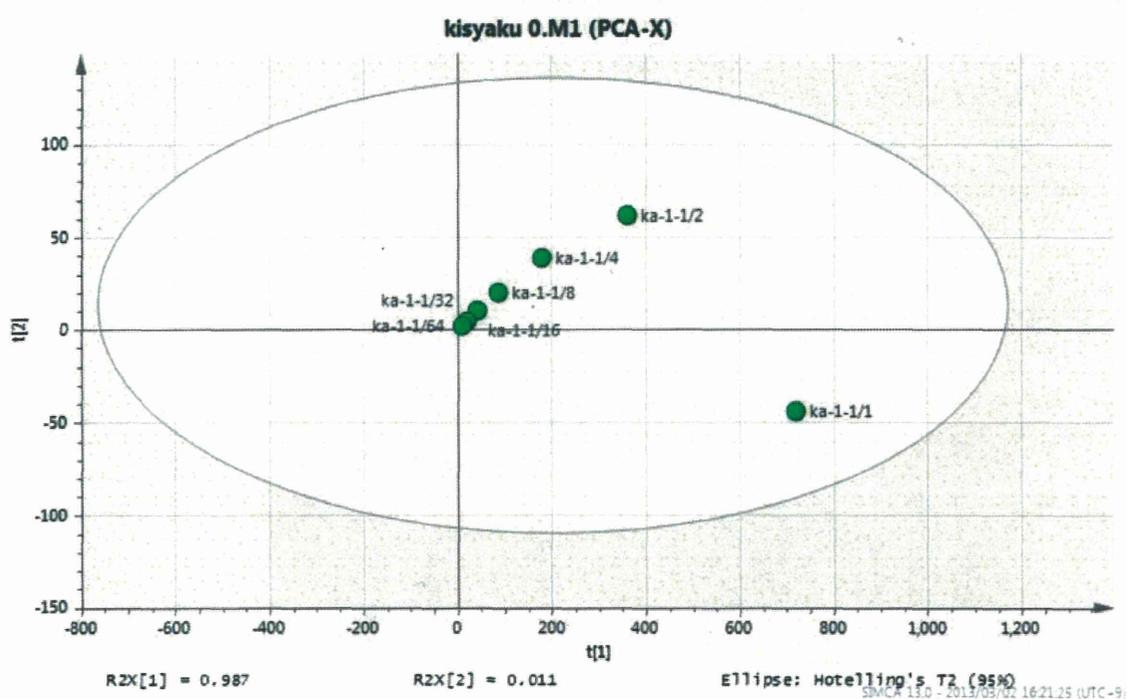


Fig.3 PCA score plot of diluted test solutions prepared from Glycyrrhizae Radix.

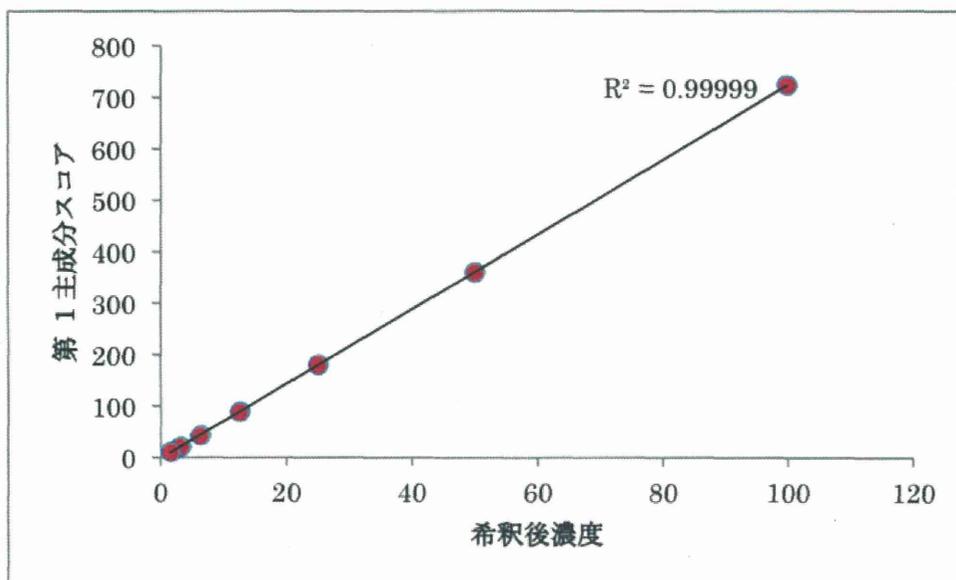


Fig.4 The linearity between the concentrations and the PCA score values of factor 1 of diluted test solutions of Glycyrrhizae Radix.