

201235033B

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23年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 丸山 卓郎

平成25（2013）年3月

目次

I.	総合研究報告	
	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.	分担総合研究報告	
	1. シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性に関する研究	12
	丸山卓郎	
	2. 多変量解析を利用したシャクヤクの品質評価について	
	内山奈穂子	
	生薬のメタボローム研究における試料調製法及び データ処理に関する研究	17
	若菜大悟	
	シャクヤクの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いた メタボローム解析に関する研究	22
	若菜大悟	
	3. 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	
	$^1\text{H-NMR}$ 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	28
	若菜大悟	
	$^1\text{H-NMR}$ 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	32
	若菜大悟	
	4. 多変量解析を利用した芍薬甘草湯の品質評価について	35
	丸山卓郎	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	38

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

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として、最も単純な組成を有する漢方処方 の一つである芍薬甘草湯をモデル処方に選択し、その構成生薬であるシャクヤク及びカンゾウの遺伝子情報、成分情報を取得し、多変量解析による品質分類を行った上で、各成分パターンを代表する個体を用いて調製した芍薬甘草湯に対して、同様の解析を適用した。

遺伝子解析の結果、シャクヤクは、南方系、北方系の 2 種に大別され、カンゾウは、3 つの遺伝子型に分類された。また、西北甘草は、東北甘草に比べ遺伝的多様性が大きいことが示唆された。

成分情報の網羅的取得ツールとしては、 $^1\text{H-NMR}$ を選択し、試料調製法、抽出溶媒、測定条件の最適化を行い、各生薬へ適用した。その結果、シャクヤクについては、産地情報と成分プロファイルの間に相関関係が見出され、各産地由来の試料に特徴的な成分として、アルビフロリン、ペオニフロリン、カテキン、アルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコース、安息香酸、グルコースなどが同定された。一方、カンゾウでは、産地情報及び遺伝子型と成分プロファイルの間に相関関係が認められた。特に、遺伝子型との関連では、今回の研究に使用した試料の大部分を占めた T-4 型を示す試料が、高いグリチルリチン及びリクイリチン含量を示し、日本薬局方における含量規格値の設定により、特定の遺伝的形質を有する試料が自ずと選択されていることがうかがえた。

芍薬甘草湯の品質評価では、原料に用いたカンゾウの成分プロファイルが、シャクヤクのそれよりも寄与率が高いことを示す結果を得た。この要因として、他のピークと良好な分離を示したカンゾウ由来のグリチルリチンのメチル基が、3 個分の水素核により、高い積分値を示したことが影響していると考えられた。

$^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析を用いた生薬及び漢方処方 の品質評価における今後の課題としては、主に糖類をはじめとする多量の一次代謝産物由来のピークがデータの総量の大部分を占めてしまうことにより、その他の成分の変異が過小評価されてしまうことを避け

るため、ヒューマンエラーの介在を回避可能な糖類除去方法を作成し、そのような処理を施したエキスについて、解析を行うことが望まれる。

分担研究者 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
協力研究者 若菜大悟 国立医薬品食品衛
生研究所 生薬部 流動研究員

A. 研究目的

現在、漢方の処方経験を有する医師は、8割以上に上り、我が国の医療現場における漢方医学のニーズは、確実に高まっている。また、急速に国民の高齢化が進む我が国では、増大する医療費の圧縮が急務であり、莫大な研究開発費を要する化学薬品に比べコストの低い漢方処方製剤は、このような課題にも貢献しうる医薬品として、期待される。

一方で、漢方処方は、天然由来医薬品であることから、その品質を一定に保つことが、化学薬品に比べ難しいという不安定な要素を持っている。従って、上述した様な漢方医学へのニーズに応えるには、漢方処方製剤及びその原料である生薬の品質の標準化及び同等性の確保が必須であり、同時に、このことは、漢方医学の再現性の確保及び漢方 EBM 研究の根幹をなすものである。

現在、生薬及び漢方処方製剤の同等性評価は、日本薬局方及び各承認書に定められた規格及び試験により担われているが、その多くは、一定数の指標成分の定性及び定量分析をベースにしたものである。しかし

ながら、近年、コンピュータの性能の飛躍的な向上に伴い、不特定多数のデータを網羅的に取得し、多変量解析に供するオミクス科学が急速に普及し、生薬や食品などの天然物の品質評価に応用され始めている。

本研究では、オミクス科学を利用した生薬及び漢方処方の品質の標準化手法の研究として、最も単純な組成の漢方処方の一つである芍薬甘草湯を取り上げ、その原料生薬であるシャクヤク及びカンゾウの成分プロファイルの分類を行うとともに、得られた結果をベースに、芍薬甘草湯の品質の規格化を試みた。

成分情報の取得ツールとしては、 $^1\text{H-NMR}$ を選択した。 $^1\text{H-NMR}$ は、化学成分を対象としたオミクス科学（メタボロミクス、ケモメトリクス）で汎用される CE, GC, LC-MS に比べ、感度、分解能に劣るものの、水素核を有する全ての化合物を網羅的に検出可能であり、個別のチューブに試料を充填して測定を行うため、上述の分析機器の使用の際に問題となるキャリアオーバーの不安が無い。また、直接化学構造に直結する情報が得られるため、ピーク同定に関して有利であるという利点を有している。

また、本研究では、生薬の品質に影響を与える因子の主なものが、遺伝的形質、生育（栽培）環境、加工調製法であることから、シャクヤク及びカンゾウの遺伝子情報

も取得し、遺伝子型、産地情報と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを組み合わせた多変量解析を行うことにより、各遺伝子型や産地に特徴的な成分プロファイルの特定も行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

産地及び入手年の明確なシャクヤク及びカンゾウを国内の生薬メーカー及び医薬基盤研究所北海道研究部より譲り受けた。

2. 実験方法

2-1. 遺伝子解析

各試料より、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型に用いた PCR を行う事により、目的の遺伝子領域を含む DNA 断片を増幅した。各生薬における標的遺伝子領域は、シャクヤクが核 rDNA ITS 領域、カンゾウが核 rDNA ITS 領域並びに葉緑体 DNA *trnH-psbA* IGS 領域とした。得られた PCR 産物を精製した後、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

カンゾウについては、ロット内においても品質のバラツキが大きい事が知られていることから、東北及び西北カンゾウ、それぞれのロット内のバラツキを調べる目的で、東北カンゾウ及び西北カンゾウ、各 1 ロット (Ka-1 及び Ka-21) について、10 個体を解析し、その他のロットについては、3 個体ずつを解析した。

2-2. $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析の条件検討

2-2-1. 試料調製

シャクヤクの粉末化は 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 mL を試験溶液として用いた。

2-2-2. $^1\text{H-NMR}$ 測定

NMR スペクトルの測定には ECA-500 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。

2-2-3. パケット積分単位及びダイナミックレンジの検討

試料粉末、20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 及び 250 mg をそれぞれ正確に量り取り、抽出溶媒 1 mL を加え、各濃度の試験溶液を調製し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。得られたスペクトルデータは Alice2 for metabolome (Jeol) を用いパケット積分を実行した。

2-3. シャクヤクの $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析

2-3-1. 試験溶液の調製

シャクヤクを 4 分割し、ボールミルを

用い 30 Hz, 1 min の条件で粉砕した。その粉末 100 mg を正確に測り取り、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-d₄-propionic acid Na 塩を 0.025% 添加したものをを用いた。

3-2-2. 多変量解析の前処理法の検討

前処理は各データポイントについて下記の計算式を適用した。

- ・平均化 (mean center)

$$x_{(mc)} = x - \bar{x}$$

x =raw data, \bar{x} =mean center of raw data

- ・オートスケール (auto scale)

$$x_{(as)} = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_i^n (x - \bar{x})^2}}$$

- ・パレートスケール (pareto scale)

$$x_{(ps)} = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_i^n (x - \bar{x})^2}}}$$

3-2-3. ¹H-NMR スペクトルの測定

¹H-NMR スペクトルの測定は、2-2-2 と同じ条件で行った。

3-2-4. データ解析

バケット積分は Alice2 for metabolome

(Jeol) を用い、0.05 ppm 単位で行った。多変量解析は Pirouette (Infometrix) を用いた。

2-4. カンゾウの ¹H-NMR メタボローム解析

2-4-1. 試料調製

試料の量を 10 mg とした他は、シヤクヤクの際と同様の方法で行った。

2-4-2. ¹H-NMR 測定

¹H-NMR スペクトルの測定は、2-2-2 と同じ条件で行った。

2-4-3. データ解析

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

2-5. 芍薬甘草湯の ¹H-NMR メタボローム解析

2-5-1. 試料調製

カンゾウ及びシヤクヤクを 4 分割し、ボールミルを用い 30 Hz, 1 min の条件で粉砕した。その粉末 10 mg ずつを正確に測り取り混和後、シヤクヤク及びカンゾウの際と同様の方法で行った。

2-5-2. ¹H-NMR 測定

¹H-NMR スペクトルの測定は、2-2-2 と同じ条件で行った。

2-5-3. データ解析

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

C. 結果

1. 遺伝子解析

1-1. シャクヤク

今回、塩基配列解析した試料は、全て日本薬局方で規定されている通り、*P. lactiflora* であると確認された。

一方、小松らは、日本産芍薬、中国産白芍、赤芍の市場品並びに主に園芸用の *P. lactiflora* の栽培品種の ITS 配列の解析結果から、*P. lactiflora* は、北方系と南方系の 2 種に大別する事が出来、その判別には、3 箇所の塩基が重要であることを示している。

今回の解析結果を、この知見にあてはめると、日本産のシャクヤクは、北海道のものを除くと、奈良産の 1 検体以外、全て II 型のパターンを示した。一方、中国産の 2 検体は、いずれも I 型を示した。

1-2. カンゾウ

ITS 配列の結果から、今回の研究に用いた全検体が、*G. uralensis* を基原とするものである事が明らかになった。

一方、*trnH-psbA* 配列では、東北甘草のほとんどが、同一の遺伝子型 (T-4 型)

を示し、その他の遺伝子型としては、T-2 型が 2 個体、T-1 型が 1 個体、見出されたのみだった。西北甘草では、T-4 型が最も多く、19 個体検出され、次いで、T-1 型が、7 個体、T-2 型が、5 個体認められた。

2. ¹H-NMR メタボローム解析の条件検討

2-1. 試料調製

各個体を 4 分割し、それぞれについて、メタボローム解析を行うことにより、個体内のばらつき及び抽出・測定時の誤差を確認する事とした。また、操作時のヒューマンエラーの影響を排除するため、粉末化及び抽出操作には、ボールミル及び震とう抽出機を利用した。

次に、最適な抽出溶媒を選択するため、種々の重水素化溶媒を検討した結果、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。しかし、一部のピークにおいて、試料間におけるケミカルシフトのずれが観測された。これは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解消された。以上のことから、最終的に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、抽出溶媒として適当であると判断した。

さらに、後述のバケット積分をする際、基準物質の積分値に対する各範囲 (バケット) の積分値を求める事でサンプル間の定量性を確保することとした。基準物質としては水溶性であり、かつ不揮発性である

trimethylsilyl-2,2,3,3- d_4 -propionic acid Na 塩 (d_4 -TMSP) を用いる事とした。

2-2. $^1\text{H-NMR}$ 測定

$^1\text{H-NMR}$ の測定は田原らにより報告されている qNMR の条件を参考にした。すなわち、測定範囲を -15 ppm から 15 ppm 、データポイントを 32000 とした。また、緩和時間を 5 秒、積算回数を 64 回とした。

2-3. データ処理方法

多変量解析を行う際には $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを各ケミカルシフト値における積分値としてまとめたデータマトリックスが必要になる。網羅的データ取得に際しては、単位範囲ごとの積分値を計測する方法を採用した。この方法では積分単位の範囲により得られる結果が変わってくるため、その検討を行った。

各濃度の試験溶液を調製し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。得られたスペクトルを 0.01, 0.05 及び 0.1 ppm 単位でバケット積分し、濃度と積分値の直線性を相関係数で確認した。その結果として、積分範囲として、0.05 ppm 単位が適当であることを示す結果を得た。

次に、積分値の定量性について検討を行った。0.05 ppm 単位でバケット積分を行った場合、全範囲のうち 65.0% のサンプルが相関係数 0.9 以上を示した。また、積分値の大きい範囲が高い相関係数を持つ事が分かった。よって、一定以上の積分値を持つ範囲では十分なダイナミックレンジが

確保されていると判断した。

3. シャクヤクの $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析

3-1. データ前処理方法の検討

多変量解析に供するデータの前処理方法として、①無処理、②平均化処理、③オートスケール、④パレートスケール、⑤平均化+対数処理について検討を行った。その結果、パレートスケールを用いるとベースラインの影響を抑え、かつ積分値の小さいバケットの影響を大きくする事が可能になり、検討した処理方法の中で、最適な結果が得られた。

3-2. PCA 解析-1

シャクヤク全試料について $^1\text{H-NMR}$ を測定し、得られたデータを PCA 解析に供したところ、3 グループに分類可能だった。ローディングプロットを解析することにより、各グループは、スクロース高含量群、グルコース高含量群、糖類低含量群に分類されることが明らかになった。

3-3. PCA 解析-2

上記の分析の結果、全検体は、3 グループに分類可能だったが、ビャクシャクの大部分はスクロース高含量群に含まれていた。そのため、次いでビャクシャクのみサンプルを限定し PCA 解析を行った。その結果、第一主成分軸と第二主成分軸との間のスコアプロットからは産地毎に分類される傾向が確認された。

この分類に影響を与えている物質をローディングプロットから確認したところ、中国産は没食子酸、アルギニン、ペンタガライルグルコース、安息香酸が、北海道産はペオニフロリン、アルギニンが、奈良県産はグルコース及び安息香酸が、新潟県産はアルビフロリン、ペオニフロリン及びカテキンが多く含まれる事が分かった。

4. カンゾウの $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析

4-1. 産地情報と成分プロファイル

$^1\text{H-NMR}$ 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、 $^1\text{H-NMR}$ 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、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、 $^1\text{H-NMR}$ 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。

4-2. 遺伝子情報と成分プロファイル

カンゾウの *trnH-psbA* IGS 領域の遺伝子型をクラス変数とし、 $^1\text{H-NMR}$ 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。

5. 芍薬甘草湯の $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析

$^1\text{H-NMR}$ 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、 $^1\text{H-NMR}$ 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

1. 遺伝子解析

小松らの報告に基づく、北方系、南方系の分類では、中国産シャクヤク 2 検体及び北海道産の 3 検体（このうち、べにしずかと北宰相は市場品ではない）がいずれも I 型に、日本産の他の産地のもの 8 検体中、奈良産の 1 検体を除き、II 型に分類された。小松らは、中国及び日本産市場品の解

析を行い、中国産の 10/11 検体が I 型、日本産の 3/4 検体が II であったと報告しているが、今回の解析結果は、同報告とよく一致していた。

一方、カンゾウの解析では、ITS 配列の解析結果から、全検体の基原種が、*G. uralensis* であると判断された。現在、市場に流通するカンゾウは、ほとんどが *G. uralensis* であることが知られているが、今回の結果から、上記の状況は、1990 年代から見られるものであることが、明らかになった。

東北カンゾウと西北カンゾウの比較では、*trnH-psbA* 領域の塩基配列解析の結果から、西北甘草の遺伝的多様性は、東北甘草のそれに比べて大きいと考えるのが妥当である。

2. $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析の条件検討

試料の粉碎、エキスの調製過程において、専用の機械を利用することが、ヒューマンエラーを避け、適切なデータを取得する上で、重要であることが明らかになった。また、NMR データには、定性的パラメータとして化学シフトが、定量的パラメータとして積分値が存在する。適切なメタボローム解析を行う上で、試料間における各パラメータのバラツキを適切に捉えることが重要であるが、前者のパラメータについては、抽出溶媒にリン酸緩衝液を用いることが、有効であった。後者については、qNMR の手法を転用し、測定範囲を広くとるととも

に、緩和時間を長くすることで、メタボローム解析に適用可能なダイナミックレンジを有するデータを取得可能であった。

3. シャクヤクの $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析

今回の研究結果から、シャクヤク試料は、糖類の種類及び量により 3 つのグループに分類された。シャクヤクにおける糖類の含量は加工・調製法や貯蔵期間により変化する事がすでに報告されており、今回の分類もこれらの点による影響が考えられる。ビャクシャク（日本薬局方におけるシャクヤク）の大部分が、スクロース高含有グループに帰属されたことから、このものに特化した PCA 解析を行った結果、産地により、各群を形成した。ITS 配列解析の結果からは、今回の研究に用いられたシャクヤク試料は、北方系、南方系の違いは、見出されたものの、PCA 解析の結果と一致する結果は得られておらず、上記の産地による成分パターンの違いは、気候条件の差異によるものと推察される。

4. カンゾウの $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いた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つ

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、これらの情報と相関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、後者で 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。

5. 芍薬甘草湯の $^1\text{H-NMR}$ メタボローム解析

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 (3H) の、ペオニフロリンはフェニル基 (1H) 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。

E. 結論

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として、塩基配列解析による原料植物の系統分類及び¹H-NMR スペクトルデータを用いた多変量解析をシャクヤク、カンゾウ及びこの2種のみからなる漢方処方である芍薬甘草湯の品質評価を行った。

シャクヤクに関しては、産地情報と成分プロファイルとの間に相関関係を見出し、各産地に特徴的な成分として、ペオニフロリンなど、8化合物が同定された。

カンゾウでは、産地情報及び遺伝子情報と成分プロファイルとの間に相関関係が認められた。特に、遺伝子型との関連では、今回の研究に使用した試料の大部分を占めたT-4型を示す試料が、高いグリチルリチン及びリクイリチン含量を示し、日本薬局方における含量規格値の設定により、特定の遺伝的形質を有する試料が自ずと選択されていることがうかがえた。

芍薬甘草湯の品質評価では、原料に用いたカンゾウの成分プロファイルが、シャクヤクのそれよりも寄与率が高いことを示す結果を得た。この要因として、他のピークと良好な分離を示したカンゾウ由来のグリチルリチンのメチル基が、3個分の水素核により、高い積分値を示したことが影響していると考えられた。

成分組成がより複雑になる漢方処方へ、¹H-NMR メタボローム解析を適用するには、ピーク分離の改善、特に含量の高い一次代謝産物由来のピークに埋もれる成分の情報を抽出することが課題であると考えら

れた。芍薬甘草湯の場合は、こむら返りなど、標的とする疾病状態が明確な処方であるため、抗痙攣作用の強度を目的変数とした回帰分析により、ピーク抽出を行うなどの解決策が挙げられる。漢方処方全般への適用に対する解決策としては、エタノール沈殿、固相抽出による糖類の除去などの前処理を施した上で、解析に供することなどが、考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

1) 若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 神谷洋, 川崎武志, 山本豊, 林茂樹, 柴田敏郎, 合田幸広, メタボローム解析によるシャクヤクの品質評価 (第2報), 日本生薬学会第58回年会 (2011.09, 東京)

2) 若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 山本豊, 合田幸広, ¹H-NMR スペクトルを用いた甘草のメタボローム解析, 日本薬学会第132年会 (2012.03, 札幌)

3) 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

シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性に関する研究

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

研究要旨 シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性を調べるため、前者については、核 rDNA ITS 領域を、後者については、同領域及び葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、両生薬は、それぞれ、*Paeonia lactiflora* 及び *Glycyrrhiza uralensis* を基原とし、前者は、ITS 配列から南方系 (I 型) と北方系 (II 型) に大別され、後者は、*trnH-psbA* IGS 配列から、3 つのタイプに分類された。また、東北甘草と西北甘草の比較では、西北甘草の方が、遺伝的多様性は大きいと考えられる結果が得られた。

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。

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た。

本報告書では、芍薬甘草湯の原料植物であるシャクヤク及びカンゾウの遺伝的背景の解析結果について報告する。

B. 研究方法

1. 実験材料

国内の生薬メーカー及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シャクヤク 13 ロット及びカンゾウ 21 ロット (東北甘草 13 ロット (Ka-1 ~ -13), 西北甘草 8 ロット (Ka-21 ~ -28)) を用いた。

2. 実験方法

試料 20 mg を液体窒素下, MM-300 (Qiagen) を用いて粉碎し, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) により, genomic DNA を抽出, 精製した. このものを鋳型に用いた PCR を行う事により, 目的の遺伝子領域を含む DNA 断片を増幅した. 各生薬における標的遺伝子領域は, シャクヤクが核 rDNA ITS 領域, カンゾウが核 rDNA ITS 領域並びに葉緑体 DNA *trnH-psbA* IGS 領域とした. シャクヤク ITS 領域の増幅は, 酵素に KOD FX DNA polymerase (Toyobo) を用い, 以下の温度プログラムに従って行った: 94°C 2 min; 98°C 10 sec, 50°C 30 sec, 68°C 30 sec, 40 cycle; 68°C 2 min. カンゾウの ITS 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域 (部分配列) の増幅は, 酵素に Taq NT DNA polymerase (Nippon Gene) を用い, 以下の温度プログラムに従って行った: 94°C 4 min; 94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 40 cycle; 72°C 4 min. 各領域の増幅に用いられたプライマーの配列は, Table 4 に示した. 得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit

(Qiagen) により精製した後, ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した. ダイレクトシーケンスにおける PCR 産物の蛍光ラベル化は, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い, 解析は, ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) により行った. 得られた塩基配列の多重整列解析は, Clustal W プログラムにより行った.

カンゾウについては, ロット内においても品質のバラツキが大きい事が知られている事から, 東北及び西北甘草, それぞれのロット内のバラツキを調べる目的で, 東北甘草及び西北甘草の各 1 ロット (Ka-1, Ka-21) について, 10 個体を解析し, その他のロットについては, 3 個体ずつを解析した.

C. 結果

1. シャクヤク

シャクヤクの核 rDNA ITS 領域の塩基配列は, 全 13 検体が 652 bp の長さを持ち, ITS1 領域が, 267 bp, 5.8S rDNA の領域が 164 bp, ITS2 領域が 221 bp であった (小松らの報告では, ITS2 領域を 222 bp としているが, これは, 448 番目の塩基 (cytosine or adenine) の挿入に基づくもので, 本研究では, この位置の塩基は, 欠失したもののみであった). *Paeonia* 属植物の同領域の塩基配列は, 既に Sangらにより詳細な解析がなされており¹⁾, その結果と比較した結果, 今回, 塩基配列解

析した試料は、全て日本薬局方で規定されている通り、*P. lactiflora* であると確認された。

さらに、小松らは、日本産芍薬、中国産白芍、赤芍の市場品並びに主に園芸用の *P. lactiflora* の栽培品種の ITS 配列の解析結果から、*P. lactiflora* は、北方系と南方系の 2 種に大別する事が出来、その判別には、69 番目、458 番目及び 523 番目の塩基が重要であることを示している²⁾。すなわち、上記 3 箇所の塩基が、TAT である場合、南方系 (I 型)、YMY である場合、北方系 (II 型) であるとしている。

今回の解析結果を、この知見にあてはめると、日本産のシャクヤクは、北海道のものを除くと、奈良産の 1 検体以外、全て II 型のパターンを示した。一方、中国産の 2 検体は、いずれも I 型を示した。

2. カンゾウ

カンゾウ市場品の核 rDNA ITS 領域、*trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列に関しては、Kondo らにより、既に詳細な解析がなされており³⁾、それによると ITS 領域は、I-1 ~ I-3 型までの 3 タイプ及び I-2 と I-3 の雑種に分類され、*Glycyrrhiza glabra* 及び *G. inflata* は、I-2 型の配列を、*G. uralensis* は、I-3 型の配列を持つ事が示されている。一方、*trnH-psbA* IGS 領域では、T-1 ~ T-4 型の 4 タイプに分類され、*G. glabra* は、T-1, 2 を、*G. uralensis* は、T-1, 2, 4 型の配列を持つ事が示されている。

今回、塩基配列解析を行った東北甘草 13 ロット、46 個体、西北甘草 8 ロット、31 個体の結果を上記の知見に当てはめたところ、ITS 配列については、いずれの検体も I-3 型の配列を示し、*G. uralensis* を基原とするものである事が明らかになった。

一方、*trnH-psbA* 配列では、東北甘草のほとんどが、T-4 型の配列を示し、その他の遺伝子型としては、Ka-1 の 10 個体中の 1 個体及び Ka-4, -13 の 3 個体中の 1 個体でそれぞれ、T-2, T-2, T-1 型の配列が見出されたのみだった。西北甘草では、8 ロット、31 個体中、T-4 型が最も多く、19 個体検出され、次いで、T-1 型が、7 個体、T-2 型が、5 個体認められた。

D. 考察

シャクヤクは、解析した全 13 検体において、ヘテロ型 (塩基の重なり) の配列が検出され、品種改良目的に、盛んに交配が行われてきた事が示唆された。

小松らの報告に基づく、北方系、南方系の分類では、中国産シャクヤク 2 検体及び北海道産の 3 検体 (このうち、北海道研究部より譲り受けたべにせずかと北宰相は市場品ではない) がいずれも I 型に、日本産の他の産地のもの 8 検体中、奈良産の 1 検体を除き、II 型に分類された。小松らは、中国及び日本産市場品の解析を行い、中国産の 10/11 検体が I 型、日本産の 3/4 検体が II であったと報告している²⁾ が、今回の解析結果は、同報告とよく一致していた。

一方、カンゾウの解析では、ITS 配列の解析結果から、全検体の基原種が、*G. uralensis* であると判断された。この結果は、昨年度、カンゾウ市場品の遺伝子情報調査の結果から、現在、流通するカンゾウ 16 市場品のほとんどが *G. uralensis* を基原とするものであったとの報告⁴⁾と一致する。また、今回の結果から、上記の状況は、1990 年代から見られるものであることが、明らかになった。

TrnH-psbA 領域の解析結果から、東北甘草の大多数は、T-4 の遺伝子型を持ち、T-2, T-1 型は、わずかに認められる程度だった。今回の研究に用いた東北甘草は、吉林省産の 1 ロットを除き全て内モンゴル産であるが、Kondo らの報告では、内モンゴル産カンゾウ 50 検体の 7 割が T-4 型を持ち、次いで T-1, T-2 型が、2 割、1 割と続く（ただし、東北、西北甘草の区別は無い）。今回の研究結果は、概ね、Kondo らの報告と一致する。

一方、西北甘草では、T-4 型が最も多いものの、T-1, T-2 型も、それぞれ、3 割前後認められ、東北甘草に比べ、遺伝子型は多様であった。このことは、今回の研究に使用された西北甘草の産地が、多様であることが原因であると、一見、考えられるが、その一方で、各 3 個体の解析を行った Ka-22 ~ Ka-28 の 7 ロット中、全個体が同じ遺伝子型を示しているものが、Ka-24 のみであることを考えると、少なくとも今回の研究材料については、産地の多様性を抜きにしても、西北甘草の遺伝的多様性は、

東北甘草のそれに比べて大きいと考えるのが妥当である。

E. 結論

シクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性を調べた結果、シクヤクは、南方系、北方系の 2 種に大別され、カンゾウは、3 つの遺伝子型に分類された。また、西北甘草は、東北甘草に比べ遺伝的多様性が大きいことが示唆された。今後は、他の遺伝子領域についても検討を行うとともに、今回の研究で見出された遺伝子型と成分情報との関連を調べる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

1) 若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 山本豊, 合田幸広, ¹H-NMR スペクトルを用いた甘草のメタボローム解析, 日本薬学会第 132 年会 (2012. 03, 札幌)

2) 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)

3. 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) Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F., Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6813-6817 (1995).
- 2) 小松かつ子ら, 漢方薬に用いられる薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推

進研究事業), 漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究, 平成 23 年度総括・分担研究報告書 (2012).

- 3) Kondo K., Shiba M., Yamaji H., Morota T., Zhengmin C., Huixia P., Shoyama Y., Species identification of licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1497-1502 (2007).
- 4) 小松かつ子ら, 漢方薬に用いられる薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業), 漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究, 平成 22 年度総括・分担研究報告書 (2011).

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

生薬のメタボローム研究における 試料調製法及びデータ処理に関する研究

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生薬のメタボローム解析を適正に行うため、シャクヤクを実験材料に用い、抽出溶媒及び $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定・解析方法の検討を行った。その結果、リン酸緩衝液を用いる事で抽出量が多く、かつ pH の違いによるケミカルシフトのずれを防ぐことが可能だった。測定方法は測定範囲を広くとる事でベースラインの歪みを減少させた。また、パケット積分を 0.05 ppm 単位で行うことで、一定以上のピーク面積を持つ部分に関しては積分値と抽出濃度間で良い直線性が得られた。

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シャクヤクを材料に、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたメタボローム解析を行った。

$^1\text{H-NMR}$ 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、 $^1\text{H-NMR}$ 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、 $^1\text{H-NMR}$ 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。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

シャクヤクは株式会社栃本天海堂より 17 ロット、株式会社ウチダ和漢薬より 13 ロット、医薬基盤研・薬用植物資源センター北海道研究部より 2 ロットを譲り受けた。

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

シャクヤクの粉末化は MM-300 型ボールミル (Qiagen) を用い、1 分間、 30 sec^{-1} 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、 300 min^{-1} 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-500 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. パケット積分単位及びダイナミックレンジの検討

試料粉末, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 及び 250 mg をそれぞれ正確に量り取り, 抽出溶媒 1 mL を加え, 各濃度の試験溶液を調製し, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。得られたスペクトルデータは Alice2 for metabolome (Jeol) を用いパケット積分を実行した。

<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. 測定試料調製法の検討

測定試料作製は大きく分けて 3 段階に分けられる。一つ目として, 試料の裁断と粉末化, 二つ目は抽出操作, 三つ目として NMR チューブへの充填が挙げられる。これらの操作は測定データの均一性に大きくかわるため, まず, 試料調製法に関して検討を行った。

1-1. シャクヤクの粉末化

シャクヤク試料は, 各個体を 4 分割し,

それぞれについて, メタボローム解析を行うことにより, 個体内のばらつき及び抽出・測定時の誤差を確認する事とした。また, 粉末化及び次項の抽出操作は, ボールミル及び震とう抽出機を用い, 一定の条件下で行う事により, 操作時のヒューマンエラーの影響を排除した。30 sec^{-1} の条件下時に 30 秒では一部粉末化されていないのが見られたため, 粉碎時間を 1 分に変更した所, 良好な粉末が得られた。

1-2. 抽出方法の検討

$^1\text{H-NMR}$ を用いたシャクヤク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, 重クロロホルム抽出時には脂肪酸のピークのみが確認され, 含有成分を包括的に解析するには不向きと考えられた。重メタノール抽出時には第 16 改正日本薬局方において, シャクヤクの確認試験及び定量規格における指標成分に規定されているペオニフロリンをはじめ, 複数の成分由来と考えられるピークが確認できた。重水抽出時にもペオニフロリン由来のピークは観測され, その他のピークも重メタノール抽出時と比較すると高濃度で抽出されていた。しかし, 高磁場側に重メタノール抽出時のみ観測されるピークが存在する事から, 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, 試料間におけるケミカルシフトのずれが観測された。これは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解消された。以上のことか