

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 混液を用いる事とした。

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事とした。基準物質を添加するタイミングは抽出時及び抽出後が考えられるが、抽出時に加える場合は操作数が増え、人的誤差が生じる恐れがあるため、測定溶媒に添加することとした。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。

1-3. 抽出エキスの NMR チューブへの充填

NMR を測定する際、不溶物が存在するとピーク形状が悪化するため、抽出エキス中の生薬粉末をできるだけ除去することで良好なスペクトルが得られる。そのための手法としてろ過、もしくは遠沈が考えられる。しかし、メタボローム解析を行う際にはサンプル数が多量になるため、全サンプルについてろ過操作を行う事は多大な労力を要する。そこで、遠沈による不溶物の除去を試みた。遠心分離の条件として回転数は 1000 rpm, 2000 rpm 及び 3000 rpm を、遠心時間は 5 分もしくは 10 分を検討した。1000 rpm 及び 2000 rpm の時、10 分間遠心分離を行っても微細な不溶物が目視で確認できた。しかし、3000 rpm で 10 分の場合は不溶物を確認できなかったため、この条件で遠沈を行う事とした。また、NMR チューブにはここで得られた上清 600 μ L を充填する事とした。

2. $^1\text{H-NMR}$ 測定法の検討

$^1\text{H-NMR}$ 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⁴⁾。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。緩和時間は、より長くとることにより、折り返しピークの発生を防止し、良好なベースラインが得られるが、今回の抽出方法ではサンプル濃度が薄いため、積算回数を多くとる必要がある。このため、一つの試料に要する総測定時間も考慮し、緩和時間を 5 秒、積算回数を 64 回とした。

3. データ処理方法の検討

3-1. バケット積分範囲の検討

多変量解析を行う際には $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを表の形にまとめたデータマトリックスが必要になる。これにはピークごとに積分値を測定する方法と単位範囲ごとの積分値を計測する方法がある。前者の場合、ピークが重なり合うことがあるため、自動でピークごとに分離する事は難しく、手動ではピークを選択が恣意的になってしまうおそれがある。そのため、目的成分が決定されていない場合は、後者の方法が一般的である。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、積分範囲が広いほど抽出濃度と積分値の直線性は良い結果を示した。しかし、0.01 単位の場合と 0.05 ppm 単位の場合では、直線性の指標で

ある相関係数が 0.9 以上を示す割合が 51.5% から 65.0 % へと大きく上昇するのに対し, 0.1 ppm 単位では 69.4% と顕著な改善は見られなかった. 積分範囲を広くすると複数のピークを同一範囲としてしまう可能性が高くなるので, 0.05 ppm 単位が適当と判断した.

3-2. ダイナミックレンジの検討

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. どのようなものにおいて相関が強いかわ確認するため, 100 mg/mL で調製した際の積分値と相関係数の関係を観察した. その結果, 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.

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及び $^1\text{H-NMR}$ の測定法に関する研究を行った. ここで作製した実験条件をそのままあるいは, 一部改変して用いる事により, 生薬のメタボローム解析に最適なデータが得られると考えられる.

以下に方法を記す.

- ①試料を 4 分割し, ボールミルを用い 1 min, 30 sec^{-1} の条件で粉碎する.
- ②重メタノールと重水で調製したリン酸緩衝液に $d_4\text{-TMS}$ を 0.025% 添加し抽出溶媒とする. 試料の粉末 100 mg に抽出溶媒 1 mL を加え, 30 min, 300 min^{-1} で振とう抽出する.

③ 10 分間, 300 rpm で遠心分離をし, その上清 600 μL を NMR チューブに充填する.

④ $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを xsweep 30 ppm, scan 64 times, auto filter off の条件で測定する.

⑤スペクトルデータを 0.05 ppm 単位でバケット積分する.

⑥多変量解析を行う.

E. 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, 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)

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)
- 4) M. Tahara, N. Sugimoto, T. Suematsu, K. Arifuku, T. Saitou, T. Ihara, Y. Yoshida, A. Tada, R. Kubota, K. Shimizu, T. Yamazaki, K. Tanamoto, H. Nakazawa, T. Nishijima, Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **16**(1), 28-33 (2009)

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

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

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 成分情報のオミクス解析を用いた生薬の品質評価及び標準化を検討するため、シャクヤク（ビャクシャク）及びセキシャクの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたメタボローム解析を試みた。その結果、主成分分析ではグルコース及びスクロースの含有量により 3 群に分類可能だった。この 3 群は、採集後の貯蔵期間・乾燥方法の違いが反映されている可能性がある。シャクヤクはほぼ全てが一つの群に属していたため、このシャクヤクに着目し、主成分解析を行ったところ、産地の違いにより群を形成した。この分類に関与する化合物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、グルコースなどが確認された。

研究目的 近年の急速な高齢化と疾病構造の変化に伴い、代替医療及びセルフメディケーションの担い手として漢方医学が注目を浴びている。漢方医学における治療の本体は数百種に及ぶ生薬であるが、これらは天産品であるため基原植物種、産地、気候条件、栽培年数、加工・調製法などの違いにより、品質にバラツキが生じるという欠点がある。本研究では、これまで限られた数の指標成分の分析により行われている生薬の品質管理の場に、近年、進歩の著しいケモメトリクス的手法を取り入れる事により、基原植物、生育環境、加工調製法など、品質の変化に寄与する因子を化学成分の総体として規格化することを目的とした。

実験材料には、シャクヤク類を取り上げ

た。シャクヤクは、トウキとともに代表的な補血薬として、主に婦人科系疾患を目標とした漢方処方に多く配合される汎用生薬の一つであり、その使用量は、年間 1000 トンを超え、カンゾウに次いで使用量の多い生薬である。この内、国内産は、40 トン程度であり、需要の大部分が中国からの輸入により賄われている。

第 16 改正日本薬局方等において、シャクヤク（ビャクシャク）及びセキシャクは、ボタン科（Paeoniaceae）植物を基原とし、シャクヤクは *Paeonia lactiflora*、セキシャクは、*P. lactiflora*、*P. obovata*、*P. veitchii* の根と規定されている。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

シヤ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 ロット譲り受けた (Table 1). D-グルコース (1) は関東化学, アルギニン (2) は味の素株式会社, 安息香酸 (3) は石津製薬株式会社から購入した. 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. 成分分画用シヤクヤクは栃本天海堂より購入した.

2. 実験方法

2-1. 試験溶液の調製

シヤクヤクを 4 分割し, ボールミルを用い 30 sec^{-1} , 1 min の条件で粉碎した. その粉末 100 mg を正確に測り取り, 抽出溶媒 1 mL を加え, 300 rpm, 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% 添加したものを用いた.

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)

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

2-3. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定には ECA-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.

2-4. データ解析

パケット積分は 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.

2-5. 成分分離

市販のシヤクヤク 200 g をメタノール 2 L で二回抽出し, 抽出エキス 62.5 g を得た. このエキスをヘキサン, クロロホルム, 酢酸エチル, 1-ブタノールで順次液々分配を行い, ヘキサン層 (1.1 g), クロロホルム層 (1.5 g), 酢酸エチル層 (3.6 g), ブタノール層 (20.2 g) 及び水層 (35.0 g) を得た. クロロホルム層を LPLC [SiO_2 , CHCl_3 -MeOH (100:1)] で分画後, HPLC で精製し, パルビノン (4: 10 mg) 及びペオニフロリゲノン (5: 14 mg) を単離した. 酢

酸エチル層をシリカゲルによるカラムクロマトグラフィー [CHCl₃-MeOH (10:1), (5:1), (3:1), (1:1), MeOH] で分画し, 12 画分を得た. 画分 8 (419 mg) を HPLC (ODS, 20% to 80% MeOH) で分画し, 画分 1-3 を得た. 画分 1 (41 mg) を HPLC (amino, MeOH) で精製し, 没食子酸 (6: 38 mg) を得た. 画分 2 (67 mg) を HPLC (ODS, 30% MeOH) で精製し, エピカテキン (7: 20 mg) を得た. 画分 3 (160 mg) は HPLC (ODS, 40% MeOH) で分画し, 画分 1-6 を得た. 画分 3 (7 mg) を HPLC (ODS, 30% CH₃CN) で精製し 3-ガロイルエピカテキン (8) と 5-ガロイルエピカテキン (9) の 3:5 混合物 (2 mg) を得た. 画分 4 (67 mg) を HPLC (ODS, 30% CH₃CN) で精製し, アルビフロリン (10: 5 mg) 及び ペオニフロリン (11: 30 mg) を得た. 画分 5 (12 mg) を HPLC (ODS, 50% MeOH, 25% CH₃CN) で順次精製し, 3''-ガロイルペオニフロリン (12: 2 mg) 及び 4''-ガロイルペオニフロリン (13: 1 mg) を得た. 画分 6 (65 mg) を HPLC (ODS, 30% CH₃CN) で精製し 6''-ガロイルペオニフロリン (14: 23 mg) を得た. 酢酸エチル層を分画した画分 10 (492 mg) を HPLC (ODS, 40% MeOH) で分画し, 画分 1-4 を得た. この画分 3 (186 mg) を HPLC (amino, 90% MeOH) で精製し, ペンタガロイルグルコース (15: 38 mg) を得た.

<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

1. 主成分分析の条件検討

多変量解析は適正な評価を行うため, データマトリックスを様々な前処理を行ってから計算を行う事が可能である. 前処理方法の差異により解析結果は変化するため, この点について検討を行った.

今回, 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. 無処理の場合, データマトリックスを線形で表現すると ¹H-NMR スペクトルとほぼ同じ形を示す. この時, 第一主成分のローディングベクトルはデータマトリックスとほぼ同じ形を示した. 平均化処理をした場合, データマトリックスのみの観察でサンプルごとの違いが見やすくなる場合がある. ローディングベクトルはデータマトリックスそのままではなく一部のピーク範囲が負の影響を与えていた. オートスケール処理は平均化後, 標準偏差で除す計算を行う. 今回のデータマトリックスは ¹H-NMR スペクトルのピークがない部分も含んでいるので, オートスケール処理をするとベースラインのばらつきが大きく表現されてしまう. そのため PCA の結果もばらつきが大きくなり, ピークが存在しない範囲に関してもローディングベクトルが存在していた. パレートスケールは平均化処理後, 標準偏差の平方根で除したもので, 平均化処理とオートスケール処理の中間にあたる計算方法である. この方法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範囲の影響を大きくする事が可能になる. 最後に平均化後, 全データを対数処理した場合を検討した. この方法もベースラインの影響が他の方法と比べ強く出るが, ローディングプロット

から、オートスケール処理時のようにピークのない部分の影響が強く見られる事はなかった。

2. 全サンプルの分析

入手した全サンプルについて PCA を行った。PCA を行う事で、含有化学成分をまとめて各サンプルの性状を表す主成分スコアが得られる。この主成分スコアを複数組み合わせグラフとして表現する事で、サンプル間の類似性を視覚的に表現する事ができる。つまり、グラフ上で近い位置に存在するサンプルは化学成分的に類似していることがわかる。このグラフをスコアプロットと呼ぶ。今回得られたスコアプロット上で同一個体由来のサンプルはそれぞれまとめて観測された事から、同一個体内では化学成分のバラツキは少なく、かつ、この実験方法により得られるデータにヒューマンエラーが介在していないことが確認された。次に全体的なバラツキを観測した結果、ファクター 1 がマイナス、ファクター 2 がプラスの値を示すグループ A、主にファクター 1 がプラスの値を示すグループ B そしてファクター 1, 2 共にマイナスの値を示すグループ C の 3 グループに分類可能だった。続いて、グループ分けがされた要因を検討した。これには PCA を行った際、スコアプロットと同時に得られるローディングプロットから検討を行った。主成分スコアは、パケット積分して得られた各範囲の積分値データについてそれぞれ重み付けし、足し合わせたもので、この時の重みをローディングベクトルと言う。ローディングスコアはこれをグラフで表現したもので、スコアプロットと同じ軸を用いる事ができ

る。つまり、スコアプロットで各サンプルの分類を行い、ローディングプロットでその分類の要因となる化合物を調べる事が可能になる。今回のローディングプロットからは、ファクター 1 に対して正の影響を与える物質としてスクロースが、ファクター 2 に正の影響を与える物質としてグルコースが確認された。以上のことから、グループ A はグルコースが多くスクロースが少ない、グループ B はスクロースが多い、グループ C は両者とも少ない事が判明した。

3. ビャクシャクの分析

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グループ B 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 を行った。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。すなわち、ファクター 1, 2 共にプラスの値を示す北海道産、ファクター 1 がプラス、ファクター 2 がマイナス側に偏る傾向を示す新潟県産、ファクター 1 がマイナス、ファクター 2 がプラスの中国産、ファクター 1, 2 共にマイナスを示す奈良県産に分類された。長野県産は今回用いたサンプル数が少なく明確なグループが確認できなかった。

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、糖やアミノ酸などの一次代謝産物だけではなく、二次代謝産物も影響を与えている事が分かった。一次代謝物に関しては NMR スペクトルのデータベースは充実しつつあるが、二次代謝物に関しては十分なものは存在しないため、ローディングプロットのみから

化合物同定を行うことは難しかった。そこで、実際に市販のシャクヤクから含有成分の単離を行い、各化合物のスペクトルデータと測定試料のものとを比較することで、ローディングプロットで見出された特徴的なピークの化合物同定を試みた。その結果、ファクター 1 に正の影響を与えている物質はアルビフロリン、ペオニフロリン及びカテキンであり、負の影響を与えている物質はアルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコース、安息香酸、グルコースと決定した。ファクター 2 に対してはアルビフロリン、ペオニフロリン、アルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコースが正の影響を、グルコース、カテキン類が負の影響を与えていた。すなわち、中国産は 没食子酸、アルギニン、ペンタガロイルグルコース、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。

D. 考察

今回の実験結果から、¹H-NMR スペクトルを用いた多変量解析の前処理法は平均化処理、パレートスケール、平均化処理+対数処理を使い分ける必要が考えられた。すなわち、含有化学成分量の差を多変量解析の結果に反映したい時は平均化処理、微量成分まで検討したい時には平均化処理+対数処理、パレートスケールはその中間の性質を持つため、第一選択として用いることが望ましい。

シャクヤクの全サンプルを用いた多変量解析の結果、グルコースとスクロースの含

量により 3 つのグループに分類可能だった。糖の含量は加工・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^{1,2)}、今回の分類もこれらの点による影響が考えられる。次に、シャクヤクの大部分がグループ B に含まれていたため、シャクヤクサンプルのみで解析を行った。その結果、産地毎に分類される傾向が見られた。この分類に関与する化合物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、グルコースなどが確認された。中国で白芍として用いられる *P. lactiflora* と *P. veitchii* の HPLC profile を用いた分類が Xu らにより報告されている³⁾。Xu らも同様の化合物により種の判別が可能だとしており、種の判別及び産地の判別が同じ化合物で判断できる可能性が示唆された。

今後はさらにサンプル数を増やして検討を行い、さらに遺伝子型と化学成分パターンの相関を確認する必要がある。

E. 結論

今回、シャクヤクのメタボローム解析を行い、糖の分布による分類及び産地による分類が確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表
特に無し

2. 学会発表

1) 若菜大悟, 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, 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)

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

1) 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎, シャク
ヤク・キバナオウギ・モッコウ生根の低温
処理による糖及び希エタノールエキス含
量の経時変化, *医薬品研究*, **40**(8), 497-504
(2009)

2) 林茂樹, 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎,
北海道北部地域におけるシャクヤク収穫
後の調製方法が生薬の品質へ及ぼす影
響, *生薬学雑誌*, **64**(2), 68-75 (2010)

3) S. Xu., L. Yang, R. Tian, Z. Wang, Z.
Liu, P. Xie, O. Feng, Species
differentiation and quality assessment
of radix Paeoniae Rubra (Chi-shao) by
means of high-performance liquid
chromatographic fingerprint, *J.
Chromatography A*, **1216**, 2163-2168
(2009)

参考文献

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

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、産地の異なるカンゾウ（西北カンゾウ及び東北カンゾウ）の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたメタボローム解析を試みた。その結果、主成分分析（PCA）では、最も累積寄与率の大きくなるファクター 1 と 2 の組み合わせでは産地の違いを表現できなかったものの、より寄与率の小さいファクター 2 と 3 の組み合わせでは西北カンゾウと東北カンゾウが分類される傾向が観測された。これらの分類モデルを作成するため、西北カンゾウと東北カンゾウの違いをクラス変数とした PLS-DA 分析を行った結果、西北カンゾウと東北カンゾウを分類可能となった。また、この分類に関与する化合物としてグリチルリチン及びスクロースが確認された。

研究目的 近年の急速な国民の高齢化と疾病構造の変化に伴い、代替医療及びセルフメディケーションの担い手として漢方医学が注目を浴びている。漢方医学における治療の本体は数百種に及ぶ生薬であるが、これらは天産品であるため基原植物種、産地、気候条件、栽培年数、加工・調製法などの違いにより、品質にバラツキが生じるという欠点がある。本研究では、これまで限られた数の指標成分の分析により行われている生薬の品質管理の場に、近年、進歩の著しいケモメトリクス的手法を取り入れる事により、基原植物、生育環境、加工調製法など、品質の変化に寄与する因子を化学成分の総体として規格化することを目的とした。

実験材料には、産地の異なるカンゾウを取り上げた。日本薬局方において、カンゾウは *Glycyrrhiza uralensis* 及び *G. glabra* の根及びストロンと規定されている生薬であり、一般用漢方処方承認審査基準に記載される漢方処方の約 7 割に使用される重要生薬である。カンゾウは産地により名称が異なり、黒龍江、吉林、遼寧、内モンゴル自治区の一部を産地とする東北カンゾウ、寧夏、陝西、甘肅の一部を産地とする西北カンゾウ、そして新疆ウイグル自治区を産地とする新疆カンゾウなどがある。今回、東北カンゾウ及び西北カンゾウに着目し、メタボローム解析による産地と成分プロファイルの比較を行った。

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 ロット譲り受けた。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 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- d_4 -propionic acid Na 塩を 0.025% 添加したものを用いた。

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。

<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

1. 東北カンゾウの主成分分析

同一ロット内におけるカンゾウのバラツキを確認するため東北カンゾウ 1 ロット (Ka-1) 中の 10 個体を用い、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定及び PCA を行った。その結果、第一主成分軸と第二主成分軸との間で、各試料は、3 群に分類された。各群に特徴的な化合物を検索するため、ローディングプロットをスペクトル形式で打ち出し、解析した結果、1 群は全体的にピーク強度が小さく、エキス含量が低い可能性が考えられた。また、別の 1 群はリクイリチン類及びグリチルリチン類のピーク強度が大きく、残る 1 群はスクロース由来のピーク強度が大きい傾向が観測された。

2. 西北カンゾウの主成分分析

東北カンゾウと同様に西北カンゾウにおいても同一ロット内でのバラツキを観測するため、1 ロット (Ka-21) 中の 10 個体について PCA を行った。その結果、第一主成分軸と第二主成分軸との間で、4 群に分類可能と示唆された。ローディングプロットをスペクトル形式で打ち出したところ、1 群は芳香族領域に他の試料には観測されないピークの存在が観測された。別の 1 群はスクロース由来のピーク強度が大きく、東北カンゾウで観察された 1 群と同様のパターンを示していた。その他の群では、リクイリチン類及びグリチルリ

チン類由来のピーク強度が大きく、東北カンゾウの別の 1 群と同様のパターンを示すもの、他の試料に比べ全体的にピーク強度が小さいものの、2.8 ppm 付近に特徴的なピークが観測される群が見出された。以上の結果から、東北カンゾウ、西北カンゾウ、共に同一ロット内でのバラツキが大きかったが、それぞれのロット内において、共通する成分プロファイルを持つ群も確認された。

3. Ka-1 及び Ka-21 の主成分分析

ka-1, ka-21 共に同一ロット内でのバラツキが大きかったが、それぞれを東北カンゾウ、もしくは西北カンゾウの総体と考え、ka-1 と ka-21 の計 20 個体を用い、PCA を行った。その結果、第二主成分軸と第五主成分軸との間で、東北カンゾウと西北カンゾウは互いに重なり合わずに分布することが確認された。

4. カンゾウ全試料での PCA

以上の解析結果から東北カンゾウと西北カンゾウが化学成分の観点から分類可能な傾向が示唆された。そこで今回入手した全試料を用い PCA を行った。まず最も累積寄与率の高い第 1 主成分と第 2 主成分の組み合わせに着目した場合、産地を含め、何らかの要因による分類は観測されなかった。しかし、第 2 主成分と第 3 主成分の組み合わせに着目した場合、東北カンゾウ由来の試料と西北カンゾウ由来の試料間にわずかに分布の偏在が観測された。

5. カンゾウの PLS-DA

PCA により東北カンゾウと西北カンゾウの偏在が確認されたため、より明確な分類を行う目的で、東北カンゾウと西北カンゾウとい

う産地の違いをクラス変数とした PLS-DA 解析を行うこととした。まず、直交成分補正 (OSC) を適用せずに計算した。その結果、主に第一主成分が正の部分に東北カンゾウが、負の部分に西北カンゾウが分布することが確認されたものの、中間領域に他方のものと混合している試料が観測された。これらの分布がなされた理由を検討したところ、カンゾウの遺伝子型の差異が表現されていることが判明した。カンゾウの遺伝子型は近藤らの方法¹⁾に順じ、測定した結果を平成 23 年度分担報告書にて報告した。結果として葉緑体 DNA *trnH-psbA* 領域において T-4 型を示す試料が大部分を占めていたが、今回、分類できなかった試料は T-1 型もしくは T-2 型を示していた。そこで、T-4 型の遺伝子型を持つ試料に限定し、再度 PLS-DA 解析を行った。結果として、他の群に分類される試料は観測されなかったものの 2 群に分類はされなかった。そこで、妨害成分の影響を除き、より良い分類を行うため、前処理法として、OSC を適用した PLS-DA を行った。その結果、第一主成分軸により、西北カンゾウと東北カンゾウの 2 群に分類可能だった。この分類に寄与する物質を同定するため、ローディングプロットの確認を行った。西北カンゾウにはグリチルリチン類の、東北カンゾウはスクロースの寄与が観測された。しかし、全試料の ¹H-NMR スペクトルを比較したところ、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。

D. 考察

今回、カンゾウの ¹H-NMR スペクトルを用いた多変量解析を行った。

東北カンゾウ、西北カンゾウについてそれ

ぞれ 1 ロットの PCA を行ったところ、両者ともロット内の成分プロファイルのバラツキが観測された。カンゾウはロット内のバラツキが大きいことが報告されており²⁾、本研究でもそれを裏付ける結果となった。

続いて、東北カンゾウと西北カンゾウの分類を試みた。PCA では成分変異の連続した集団が観測されたのみで、両者の分類は困難だった。そこで、妨害成分の影響を除去するために OSC を前処理として適用するとともに、クラス変数として、各試料に東北カンゾウ及び西北カンゾウの産地情報を加え、PLS-DA 分析を行ったところ、両者を分類することが可能であった。また、両者の分類には、カンゾウ試料の遺伝子情報を加えることが、より確度の高い分類に繋がることが明らかになった。さらに、本分類における因子負荷量を解析した結果、グリチルリチン類及びスクロースがこの分類に大きく寄与していることが明らかとなった。しかし、これら二成分のみでは東北カンゾウと西北カンゾウの分類を説明することはできず、今後より寄与率の低い物質の同定を試みる必要がある。

E. 結論

今回、カンゾウのメタボローム解析を行った結果、PLS-DA により西北カンゾウと東北カンゾウ分類可能となった。この分類に関与する化合物としてグリチルリチン及びスクロースが確認された。しかし、この二化合物のみの定量では両者の分類は困難であり、より寄与率の低い物質の同定が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

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)

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) K. Kondo, M. Shiba, H. Yamaji, T. Morota, C. Zhengmin, P. Huixia, Y. Shoyama: Species identification of Licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol, Pharm, Bull*, **30**(8), 1497-1502 (2007).

2) K. Tanaka, A. Ina, K. Hayashi, K. Komatsu: Comparison of chemical constituents in *Glycyrrhiza uralensis* from various sources using a multivariate statistical approach, *J. Trad. Med.*, **27**, 210-216 (2010).

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

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を検討するため、遺伝子型の異なるカンゾウ試料の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたメタボローム解析を試みた。PLS-DA 分析を行った結果、それぞれの遺伝子型と成分プロファイルの相関が確認された。この時、寄与の大きい化合物としてグリチルリチン類、リクイリチン類、グルタミン、グルコース及びスクロースが確認された。

研究目的 カンゾウの規格化、標準化を検討する目的で産地の異なるカンゾウ間の PLS-DA 分析を行った際、遺伝子型の異なる個体を除くことにより、両者の良い分離が確認された。このことから、遺伝子型が異なる個体間では成分プロファイルに差異が存在することが示唆されたため、遺伝子型の違いに着目した多変量解析を行うこととした。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

カンゾウは栃本天海堂株式会社より、東北カンゾウ 13 ロット、西北カンゾウ 18 ロット譲り受けた。

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 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- 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

パケット積分は Alice2 for metabolome (Jeol) を用い、0.08 ppm 単位で行った。PLS-DA 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。

<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

カンゾウの各個体の遺伝子型は近藤らの方法¹⁾に準じ、昨年度、解析した。東北カンゾウでは全 46 個体中 T-1 型の遺伝子型を持つものが 1 個体、T-2 型が 2 個体、T-4 型が 43 個体存在した。西北カンゾウでは全 31 個体中 T-1 型を示したものが 7 個体、T-2 型が 5 個体、T-4 型が 19 個体存在した。この遺伝子型の違いをクラス変数とした PLS-DA を行った。T-1 型に着目し PLS-DA を行った結果では、T-1 型と T-2 型及び T-4 型の 2 群が観測された。この分類に寄与する物質を同定するため、ローディングプロットを確認した。その結果、T-1 型に特徴的な化学成分として、スクロース、グルコース及びグルタミンが、T-2 型及び T-4 型に特徴的な成分としてグリチルリチン類が観測された。

次に T-2 型に着目し PLS-DA を行った。その結果、T-1 型に着目した時と同様に、T-2 型と T-1 型及び T-4 型の 2 群が観測された。この分類に寄与する物質を同定するため、ローディングプロットを確認した。その結果、

T-2 型に特徴的な化学成分は発見できなかったが、T-1 型及び T-4 型に特徴的な成分としてグリチルリチン類、リクイリチン類及びグルコースが観測された。

さらに T-4 型に着目し PLS-DA を行った。その結果、他の 2 つの型の際と同様に、T-4 型と T-1 及び T-2 型からなる 2 群が観測された。この分類に寄与する物質を同定するため、ローディングプロットを確認した。その結果、T-4 型に特徴的な化学成分として、グリチルリチン類、リクイリチン類及びグルコースが、T-1 型及び T-2 型に特徴的な成分としてグルタミン及びスクロースが観測された。以上の結果から、T-4 型は T-1 型及び T-2 型に対し、グリチルリチン類の含量が高い傾向が示唆された。そのため、カンゾウの各個体が含有するグリチルリチン含量を ¹H-NMR スペクトルの積分値から簡易的に定量した。その結果、T-4 型は他の遺伝子型のものに比べグリチルリチン含量が高いことが判明した。

D. 考察

カンゾウの ¹H-NMR スペクトルを用いた多変量解析を行った。

各遺伝子型をクラス変数とした PLS-DA 分析の結果、各遺伝子型の成分プロファイルに特徴が観測された。T-1 型はスクロースやグルコース、グルタミンなどの一次代謝産物の含量が多く、T-2 型はグリチルリチン類やリクイリチン類が少なく、T-4 型は逆にグリチルリチン類やリクイリチン類、グルコースの含量が多い結果となった。

Kojoma らは、同一条件下で栽培した実生苗由来 5 年生のカンゾウ、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、これ

らの化合物の含量の個体差が非常に大きいことを報告している²⁾。このことは、カンゾウのグリチルリチン及びリクイリチン含量のバラツキには、生育環境要因ばかりでなく、遺伝的形質の違いも大きく関与していることを示唆しており、本研究で得られた結果は、上記の報告と良く一致する。また、日本薬局方では、カンゾウの規格基準の一つとして、グリチルリチン 2.5% 以上の含有を定めている。今回、栃本天海堂より提供を受けた試料、全 77 個体中 62 個体を T-4 型の遺伝子型を持つ試料が占めた。今回の研究結果から、T-4 型の遺伝子型を持つ試料が、グリチルリチン含量の高いことが示されており、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。

E. 結論

カンゾウの遺伝子型と ¹H-NMR スペクトルデータを用いた多変量解析を行った結果、各遺伝子型に特徴的な成分パターンが見出された。

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)

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) K. Kondo, M. Shiba, H. Yamaji, T. Morota, C. Zhengmin, P. Huixia, Y. Shoyama, Species identification of Licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol. Pharm. Bull.*, **30** (8), 1497-1502 (2007).

2) M. Kojoma, S. Hayashi, T. Shibata, Y. Yamamoto, H. Sekizaki, Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions, *Biol. Pharm. Bull.*, **34** (8), 1334-1337 (2011).

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て、様々な成分組成を有する原料生薬の組合せによる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、最も単純な組成からな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一主成分および第二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。これらの試料について、全ての組合せで、芍薬甘草湯を調製し、解析に用いた。

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。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

カンゾウまたはシャクヤクを 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。

<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。得られたスコアプロットの内、第三主成分軸と第四主成分軸との間のプロットでは、各プロットが、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、第一主成分と第二主成分をプロットした場合、カンゾウ

ウのロットごとに分類される傾向が確認された。これらのことから、寄与率の高い第一主成分及び第二主成分によるスコアプロットが、原料として用いられたカンゾウの成分プロファイルをよく反映し、第三主成分及び第四主成分からなるスコアプロットが、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。

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 における第一主成分と第二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、第三主成分と第四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。本研究の最終目標は、漢方処方標準化であり、これは、品質のバラツキの大きい天然由来医薬品の同等性を担保することにより、漢方医学の再現性を確保する

とともに、漢方 EBM の実現に向けた研究支援体制の確保を目的としたものである。この目的に照らした時、本研究結果は、原料生薬の同等性評価への有用性は、示すことが出来たと考えられる。一方で、より成分組成が複雑になる漢方処方では、分解能に劣る NMR では、ピーク分離が充分ではなく、少数のピーク分離した成分の影響が強くなる出ることが、明らかになった。このため、今後の課題としては、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ィー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

クの成分プロフィールが直接的に反映されることが明らかとなった。今後、各成分プロフィー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

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

研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし