

ル

- ▶ グラジエント B = 5 – 40% (8 min) – 95% (9 min)
- ▶ 流速 0.4 mL/min
- ▶ 注入量 5  $\mu$ L
- ▶ カラム温度 40°C

MS 部: Synapt G2-S (Waters)

- ▶ イオン化モード ESI+ and ESI-
- ▶ 測定モード Resolution Mode
- ▶ キャピラリー電圧 0.5 kV
- ▶ イオン源ヒーター 120°C
- ▶ コーンガス 50 L/hr
- ▶ 脱溶媒ガス 800L/hr (300°C)
- ▶ IMS Wave Velocity 650 m/s
- ▶ スキャンm/z範囲 50 – 1200
- ▶ スキャン時間 0.5 sec

測定データをMassLynx v4.1 (Waters) を用いて分析し、ピークの保持時間、m/z およびドリフトタイムを得た。

### 衝突断面積の測定

衝突断面積が既知である標準化合物

Poly-Alanineを、0.1%ギ酸含有50%アセトニトリル水溶液に溶解し、終濃度1 mg/mLに調製した後、ESIポジティブおよびネガティブモード下でIMS-MSインフュージョン測定を行った。得られたドリフトタイム ( $T_D$ ) をモビリティデータ処理ソフトウェアDriftScope v2.4 (Waters) で解析し、TOF補正したドリフトタイム ( $T_C$ ) と窒素ガス中でのPoly-Alanineの衝突断面積 ( $\Omega_C$ ) から検量線を算出した。ドリフトタイムの補正式と検量線の数式は下記の通り。

$$T_C = T_D - \frac{c\sqrt{m/z}}{1000}$$

(c: Enhanced Duty Cycle (EDC) delay coefficient)

$$\Omega_C = A * T_C^x$$

サンプル中の各ピークの衝突断面積の実測値

( $\Omega_D$ ) は、検量線から得られたパラメーターを用い、以下の計算式に従って算出した。

$$\begin{aligned}\Omega_D &= \Omega_C * e * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{M_G}} \\ &= A * e * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{M_G}} * \left(TD - \frac{c\sqrt{m/z}}{1000}\right)^x\end{aligned}$$

(e: Charge, m: mass of ion,  $M_G$ : mass of mobility gas)

### 分子モデリングソフトによる構造最適化

アントラキノン配糖体の立体構造の描画と構造最適化には、Chem 3D Pro v 12.0.2 (CambridgeSoft), Avogadro v 1.1.0 (Avogadro.openmolecules.net) あるいは Molby v 0.6.4 (molby.sourceforge.jp) を用い、それぞれ、Molecular Mechanics program 2 (MM2), Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94), Assisted Model Building and Energy Refinement (AMBER) の分子力場における安定構造を得た。PDB形式で出力したデータをMFJ形式に変換し、衝突断面積計算用の入力データとした。

### 衝突断面積の理論値の算出

分子モデリングにより得られた候補化合物の原子座標を基に、MOBCAL (www.indiana.edu/~nano) を用いて衝突断面積の理論値 ( $\Omega$ ) を算出した。計算法として、Projection Approximation (PA), Exact Hard Sphere Scattering (EHSS), Trajectory Method (TM) のアルゴリズムを使用した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び実験動物を使用しておらず、該当する事由はない。

### C. 研究結果

#### LC-MS/MS分析によるアントラキノン配糖体探

## 索

9種類のダイオウ試料をLC-MS/MSにより分析し、異性体成分を複数含有する試料を選出した。精密質量とMS/MSスペクトルを基に、クリソファンール配糖体と推定される $C_{21}H_{20}O_9$ に相当するピークと、エモジンあるいはアロエエモジン配糖体と推定される $C_{21}H_{20}O_{10}$ に相当するピークを探索した結果、Daio-134にこれらのピークを複数見出した。(表2)

このうち、ピーク1, 2, 3, および7は、LC保持時間やMSスペクトル情報から、それぞれ chrysophanol 1-*O*-glucosid, chrysophanol 8-*O*-glucoside, aloe-emodin 1-*O*-glucoside, emodin 8-*O*-glucoside であり、残りのピーク4~6は、aloe-emodin 8-*O*-glucoside, aloe-emodin  $\omega$ -*O*-glucoside, emodin 1-*O*-glucoside のいずれかと予測された<sup>3,4,5,6</sup>。なお, emodin 6-*O*-glucoside は Rheum 属植物からの単離報告がないため、Daio-134中の7つのピークには該当しないと考えられたが、イオンモビリティによる異性体識別の有用性を評価するため、候補化合物には加えることとした。

## LC-IMS-MS デモ分析

Daio-134中に含まれるアントラキノン配糖体の衝突断面積を測定するため、LC-IMS-MSによるデモ分析を日本ウォーターズ社に依頼した。結果を図2に示す。ESIネガティブモードにおいて $m/z$  415.1を有するピークaとb, ESIポジティブモードにおいて $m/z$  433.1のcとd, ネガティブモードにおいて $m/z$  431.1のeとfとgを検出し、各ピークのドリフトタイムから化合物の衝突断面積の実測値(実測CCS)を得た。なお、LC-MS/MSの分析結果とLC-IMS-MSの分析結果の比較から、ピークa=1, b=2, c=3, およびg=7は、それぞれ chrysophanol 1-*O*-glucoside, chrysophanol 8-*O*-glucoside, aloe-emodin 1-*O*-glucoside, emodin 8-*O*-glucoside と推測された。

## 候補化合物の衝突断面積の算出

コンピュータシミュレーションによって得られる化合物の衝突断面積の理論値は、コンフォメーションの違いにより変化するため、候補化合物の立体モデルの作製は慎重に行う必要がある。そこで、複数の立体構造について衝突断面積を算出、比較し、最適なモデルを選択することとした。

はじめに、アントラキノン配糖体の候補化合物に対し、MM2, MMFF94, AMBERの分子力場を用いてそれぞれ最適な立体構造を作製した。次に、各立体モデルの衝突断面積を算出した。計算のアルゴリズムはMOBCALにパッケージされているPA, EHSS, TMのアルゴリズムを用いた。結果を表3に示す。分子力場の比較では、MM2 < MMFF94 < AMBERの順に衝突断面積が大きくなり、計算アルゴリズムの比較では、PAとTMが同程度の値だったのに対し、EHSSは比較的大きな値を示した。また、分子シミュレーションで得られた chrysophanol 1-*O*-glucoside, chrysophanol 8-*O*-glucoside, aloe-emodin 1-*O*-glucoside, emodin 8-*O*-glucoside の衝突断面積の理論値(表3; 理論CCS)と、LC-IMS-MS分析で得られたピークa, b, c, gの衝突断面積の実測値(図2; 実測CCS)を比較した結果、chrysophanol 1-*O*-glucoside と emodin 8-*O*-glucoside ではMMFF94とTM, aloe-emodin 1-*O*-glucoside ではMM2とPA, chrysophanol 8-*O*-glucoside ではAMBERとPAの組み合わせから得た理論値が、最も実測値に近かった。

今回分子モデリングに用いた分子力場のうち、MM2は簡便であるものの精度が低く、AMBERはタンパク質の構造計算に特化しており、低分子化合物に対しては、MMFF94が最も優れた分子力場であると考えられた<sup>7)</sup>。さらに、MOBCALパッケージのアルゴリズムの中では、TMが最も信頼性が高く、多くの論文で採用されている<sup>8,9)</sup>ことから、以後はMMFF94で構造最適化した立体モデルの衝突断面積をTMのA

ルゴリズムで算出した値を理論値として、実測値と比較することとした。

#### アントラキノン配糖体の衝突断面積の理論値と実測値の比較

分子シミュレーションにより算出された候補化合物の衝突断面積の理論値を昇順に並べ、同様に並べた Daio-134 中のアントラキノン配糖体の衝突断面積の実測値と比較した (表 4)。その結果, chrysophanol 1-*O*-glucoside, chrysophanol 8-*O*-glucoside, aloe-emodin 1-*O*-glucoside, emodin 8-*O*-glucoside は, LC-MS/MS 分析から推定したピークと候補化合物が一致し, その他のピークも emodin 6-*O*-glucoside 以外のエモジンあるいはアロエエモジン配糖体として識別することができた。さらに, これらの化合物の衝突断面積の理論値と実測値の誤差は 0.3 ~ 1.4% であり, 文献等で報告されている 0.0 ~ 2.6% <sup>9)</sup> と同程度の値であった。

#### Emodin 6-*O*-glucoside の LC-IMS-MS 分析

デモ分析と同一条件下での LC-IMS-MS 分析により, emodin 6-*O*-glucoside の保持時間, 質量数, マススペクトル, ドリフトタイムを測定し, 衝突断面積の実測値 134.42 Å<sup>2</sup> を得た (表 5)。Daio-134 では, emodin 6-*O*-glucoside と同じ保持時間に相当するピークは検出されていなかったことから, 予想通り, Daio-134 には emodin 6-*O*-glucoside が含まれないことが確認できた。また, 分子シミュレーションによる emodin 6-*O*-glucoside の衝突断面積の理論値は 136.58 Å<sup>2</sup> であったことから (表 4), emodin 6-*O*-glucoside の衝突断面積の理論値と実測値の誤差は 1.59% と算出された。この値も文献等で報告されている誤差の値と同程度であったことから, タンパク質や糖鎖などの高分子だけでなく, 天然由来の低分子化合物に対しても, 衝突断面積による構造推定は有用であることが示唆された。

#### D. 考察

イオンモビリティによって得られたドリフトタイムから衝突断面積を算出し, 分子シミュレーションから得られた候補化合物の衝突断面積と比較して照合するという構造推定法は, 近年, タンパク質や金属錯体, 医薬品代謝物等を中心に利用が広がっているが, 低分子化合物を対象とした衝突断面積の比較実験は今回が初めての報告である。本実験により得られたアントラキノン配糖体の衝突断面積の理論値と実測値の誤差は, 結果の信頼性を保証するに足る値であり, イオンモビリティ分離技術を利用した構造推定は低分子化合物に対しても有用であることが示唆された。

一方で, 衝突断面積の理論値は立体モデルや計算アルゴリズムによって大きく異なることも明らかになった (表 3)。今回は, 最も精度が高いとされる MMFF94 と TM 法の組み合わせを採用したが, emodin 6-*O*-glucoside の実測値は AMBER と PA 法の組み合わせによる理論値に近かったことから, 衝突断面積の値から立体構造を正しく推定するためには, 分子モデリングのエネルギー最小化法と衝突断面積の計算アルゴリズムを慎重に選択する必要があると考えられた。今後, アントラキノン配糖体以外の天然化合物についても衝突断面積の測定を進めるとともに, 分子動力学法や分子軌道法によるモデルの構築も望まれる。

#### E. 結論

今回, LC/MS によるメタボローム分析による多様性確認を指向し, 生薬中の異性体成分の新しい識別法の確立を目的として, LC-IMS-MS を利用した構造推定法の有用性を検討するため, 大黃に含まれるアントラキノン配糖体の構造推定を試みた結果, 低分子化合物に対しても生体高分子と同程度の精度で化合物の推定が可能であることが確認でき, イオンモビリティ分離技術が生薬中の異性体成分の構造推定

に有用であることが示唆された。

本研究は、生薬の多様性を異性体成分の識別という従来とは異なる観点から評価し、新しい品質評価法の基礎となり得るレギュラトリーサイエンス研究である。今後、構造推定の精度を高めるため、対象とする生薬や異性体成分を増やし、衝突断面積の測定データや分子シミュレーションデータを蓄積していく必要があると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

渥美さやか, 高橋 豊, 渕野裕之, 寺坂和祥, 水上 元, 橋井則貴, 川崎ナナ, 袴塚高志, 川原信夫, 合田幸広「イオンモビリティ分離技術を利用した生薬中の異性体成分の構造推定法に関する研究: 大黄中のアントラキノン配糖体について」日本薬学会第 133 年会 (2013. 03, 横浜)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 参考文献

- 1) D. Roberts, "Profiling of Flavonoid Isomers in Highly Complex Citrus Juice Samples using UPLC Ion Mobility Time of Flight MS", AOAC Europe International Workshop, 10-12 October 2011, University Erlangen-Nuremberg
- 2) A. Shimizu, T. Ohe, M. Chiba, A novel method for determination of the site of glucuronidation by ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1456-1459 (2012)
- 3) M. Ye, J. Han, H. Chen, J. Zheng, D. Guo, Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with

electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 82-91 (2007).

- 4) J. Koyama, I. Morita, N. Kobayashi, Simultaneous determination of anthraquinones in rhubarb by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1145**, 183-189 (2007).
- 5) H. Okabe, K. Matsuo, I. Nishioka, Studies on rhubarb (*Rhei Rhizoma*). II. Anthraquinone glycosides, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1254-1260 (1973).
- 6) H. Matsuda, T. Morikawa, I. Toguchida, J-Y. Park, S. Harima, M. Yoshikawa, Antioxidant constituents from rhubarb: structural requirements of stilbenes for the activity and structures of two new anthraquinone glucosides, *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 41-50 (2001).
- 7) 日本化学会編『第 5 版 実験化学講座 12 計算化学』丸善 pp. 247-314, (2004).
- 8) G. J. Dear, J. Munoz-Muriedas, C. Beaumont, A. Roberts, J. Kirk, J. P. Williams, I. Campuzano, Sites of metabolic substitution: investigating metabolite structures utilising ion mobility and molecular modeling, *Rapid Comm Mass Spectrom.*, **24**, 3157-3162 (2010).
- 9) C. Laphorn, F. Pullen, B. Z. Chowdhry, Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions, *Mass Spectrom. Rev.*, **32**, 43-71 (2013).

## 謝辞

LC-IMS-MS 分析に御協力頂きました日本ウォーターズ株式会社の皆様に、心より御礼申し上げます。

押方基二 様 (Asia Pacific Market Development)

横田直彦 様 (Customer Success)

佐藤 太 様 (Customer Success)

寺崎真樹 様 (Market Development)

廣瀬賢治 様 (Market Development)

菊地 敏 様 (Business Development Senior  
manager)

高柳雅治 様 (Business Development)

表1 大黃市場流通品モデル試料

ID	入手年	産地	形態	規格など
Daio-028	2010年	中国四川省	原形	
Daio-049	2009年	中国四川省	原形	
Daio-101	2008年	中国青海省	刻み	
Daio-134	2009年	中国四川省	刻み	野生品・雅黄(主に使用)
Daio-135	2004年	中国青海省	原形	野生品・錦紋大黄(箱黄)
Daio-161	2009年	中国四川省	原形	3~4等級
Daio-201	2009年	中国青海省	原形	包黄
Daio-202	2008年	中国四川省	原形	雅黄・1級
Daio-223	不明	中国青海省	原形	

表2 LC-MS/MS分析によって得られたDaio-134中のアントラキノン配糖体と推定される化合物ピーク

ピーク	極性	保持時間 (min)	m/z	推定組成	MS <sup>2</sup>	推定化合物
1	Neg	15.98	415.1016	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	416.1051, 295.0605, 277.0499, <b>253.0499</b> (100),	Chrysophanole 1-O-galactoside
2	Neg	16.46	415.1021	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	397.0915, 295.0915, 295.0605, 267.0656, <b>253.0499</b> (100)	Chrysophanole 8-O-galactoside
3	Pos	8.88	433.1130	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433.1128, 415.1025, 271.0598,	Aloe-emodin 1-O-galactoside
4	Pos	9.88	433.1129	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433.1130, 415.1028, 271.0600,	エモジン/アロエーエモジン配糖体
5	Neg	12.18	431.0977	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	432.1024, 311.0561, 283.0610, 270, <b>269.0454</b> (100), 253.0507,	エモジン/アロエーエモジン配糖体
6	Neg	13.69	431.0980	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	432.1005, <b>269.0448</b> (100),	エモジン/アロエーエモジン配糖体
7	Neg	16.25	431.0978	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	432.1019, 311.0564, 293.0458, <b>269.0456</b> (100), 268,	Emodin 8-O-galactoside

表3 分子シミュレーションにより算出した候補化合物の衝突断面積の理論値

Chrysophanol 1-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )				Chrysophanol 8-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )			
	MM2	MMFF94	AMBER		MM2	MMFF94	AMBER
PA	123.73	126.45	128.61	PA	121.34	127.04	126.09
EHSS	132.15	135.32	138.08	EHSS	129.66	135.78	135.06
TM	122.64	125.44	128.51	TM	123.4	128.01	127.93

Emodin 1-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )				Emodin 8-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )			
	MM2	MMFF94	AMBER		MM2	MMFF94	AMBER
PA	125.19	128.69	130.67	PA	119.05	129.56	133.87
EHSS	134.5	138.64	140.98	EHSS	125.96	139.61	144.57
TM	124.71	127.87	131.52	TM	117.64	130.17	137.14

Aloe-emodin 1-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )				Aloe-emodin 8-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )			
	MM2	MMFF94	AMBER		MM2	MMFF94	AMBER
PA	126.58	129.39	132.07	PA	125.53	128.78	131.67
EHSS	135.65	138.71	142.33	EHSS	134.87	138.56	142
TM	125.94	129.14	133.21	TM	126.87	130.01	133.23

Aloe-emodin ω-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )				Emodin 6-O-glucosideの理論CCS (Å <sup>2</sup> )			
	MM2	MMFF94	AMBER		MM2	MMFF94	AMBER
PA	131.87	134.31	135.43	PA	128.2	131.48	133.38
EHSS	140.39	142.94	144.11	EHSS	136.96	140.84	142.86
TM	131.04	133.03	133.99	TM	132.26	136.58	138.33

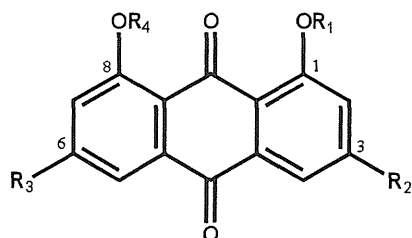
表4 衝突断面積の理論値と実測値の比較

候補化合物	理論CCS (Å <sup>2</sup> )	実測CCS (Å <sup>2</sup> )	ピーク	推定化合物	誤差 (%)
Chrysophanole 1-O-gulcoside	125.44	125.9	a	Chrysophanole 1-O-gulcoside	0.36
Chrysophanole 8-O-gulcoside	128.01	126.3	b	Chrysophanole 8-O-gulcoside	1.33
Emodin 1-O-glucoside	127.87	126.8	d		0.83
Aloe-emodin 1-O-glucoside	129.14	127.6	c	Aloe-emodin 1-O-glucoside	1.19
Aloe-emodin 8-O-glucoside	130.01	129.3	e		0.54
Emodin 8-O-glucoside	130.17	131.8	g	Emodin 8-O-glucoside	1.25
Aloe-emodin ω-O-glucoside	133.03	132.2	f		0.62
Emodin 6-O-glucoside	136.58				

表5 Emodin 6-O-glucosideの衝突断面積の理論値と実測値の比較

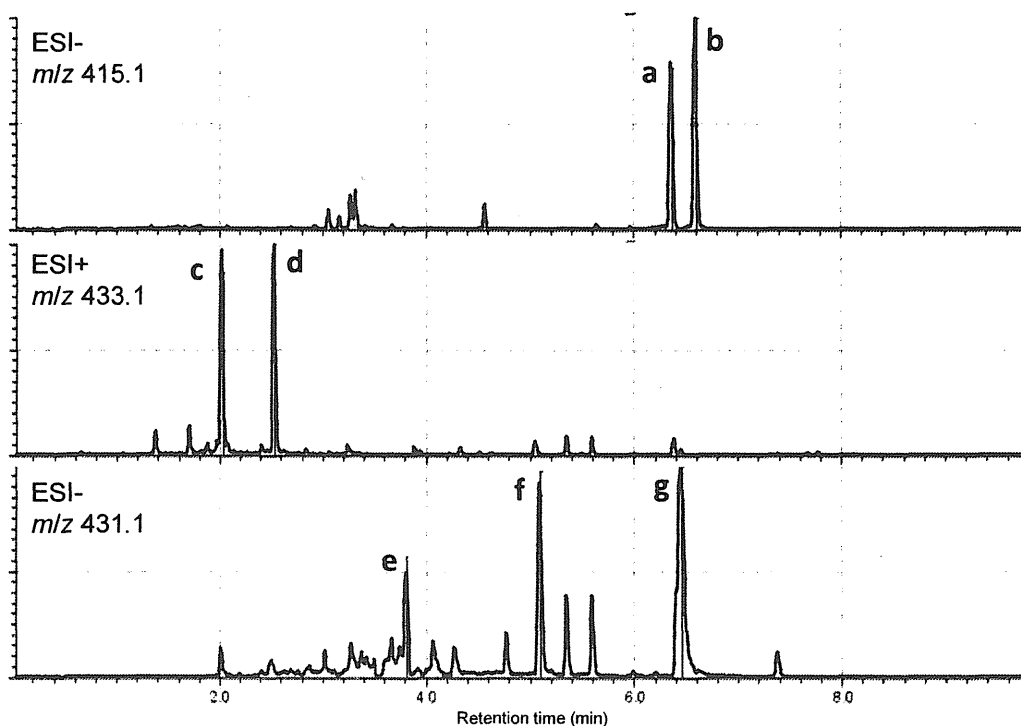
化合物	極性	保持時間 (min)	ドリフトタイム (bin)	実測 CCS (Å <sup>2</sup> )	理論 CCS (Å <sup>2</sup> )	誤差 (%)
Emodin 6-O-glucoside	Neg	8.56	78.23	134.4	136.58	1.59

図 1 大黃中に含まれる主なアントラキノン類



Aglycone	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	組成式	Monoisotopic mass	Glycosides
Rhein	H	COOH	H	H	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	284.032074	1-O-gulcoside, 8-O-gulcoside, 11-O-glucoside (ester)
Emodin	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.236908	1-O-gulcoside, 8-O-gulcoside
Aloe-emodin	H	CH <sub>2</sub> OH	H	H	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.236908	1-O-gulcoside, 8-O-gulcoside, ω-O-glucoside (ether)
Chrysophanol	H	CH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	254.057907	1-O-gulcoside, 8-O-gulcoside
Physcion	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284.068481	1-O-gulcoside, 8-O-gulcoside

図 2 Daio-134 の LC-IMS-MS 分析結果



ピーク	極性	保持時間 (min)	m/z	ドリフトタイム (bin)	実測 CCS (Å <sup>2</sup> )	推定化合物
a	Neg	6.35	415.1	72.40	125.9	Chrysophanole 1-O-gulcoside
b	Neg	6.59	415.1	72.68	126.3	Chrysophanole 8-O-gulcoside
c	Pos	2.02	433.1	73.89	127.6	Aloe-emodin 1-O-gulcoside
d	Pos	2.53	433.1	73.28	126.8	エモジン/アロエ-エモジン配糖体
e	Neg	3.78	431.1	75.22	129.3	エモジン/アロエ-エモジン配糖体
f	Neg	5.08	431.1	77.78	132.2	エモジン/アロエ-エモジン配糖体
g	Neg	6.45	431.1	77.46	131.8	Emodin 8-O-gulcoside



分担研究課題 生薬及び生薬製剤の品質確保と安全性・有効性等に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

腸内細菌の増殖に影響を及ぼす漢方処方に関する研究

漢方処方の腸内細菌の生育に対する影響を検討するため、これまでに、ヒト腸内常在菌である *Lactobacillus reuteri* の生育に影響を与える漢方処方のスクリーニングを行い、茯苓飲や六君子湯などを含むいくつかの処方に菌増殖促進活性があることを見出している。本研究では、これらの処方のうち茯苓飲に含有される活性成分について検討を進め、構成生薬のうち陳皮に濃度依存的な活性があることを見出した。更に、陳皮に含有させる活性成分の分離を試みたところ、オリゴ糖画分のうち、2糖化合物に活性があることが確認された。

研究協力者

糸田幸恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

A. 研究目的

腸内細菌叢の適切なバランスは、宿主の健康を維持する上で極めて重要である。腸内細菌の多くは生育と共に酢酸、乳酸、酪酸等の有機酸を産生し、腸内の pH を下げて腸内環境を整える。また、生産された有機酸は宿主の腸管細胞よりエネルギー源として利用される。このため、腸内細菌叢の組成解明に関する研究やプロバイオティクス、プレバイオティクスを用いて腸内細菌叢や短鎖脂肪酸含量をコントロールする試み等が、ヒトを含む多くの動物を対象として盛んに行われている。漢方処方の作用発現における腸内細菌の関与も古くから論じられ、腸内細菌に代謝されることにより漢方処方成分の有効性に変化が生じる例はよく調べられている。一方、漢方処方の服用が腸内細菌叢のバランス、腸内細菌の増殖及び短鎖脂肪酸の生産に与える影響に関しては、十分に検討されているとは言い難い。

さて、社会構造及び疾病構造の変化に加えて、自らの健康に強い関心を持つ国民が増え、軽度な疾病の予防や生活の質の改善、向上等を目標とした一般用医薬品によるセルフメディケーションの考え方が普及しつつあることを受けて、厚生労働省では、国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品の育成を考え、一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、その中間報告として、「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」を平成 14 年に発表している。そして、その具体的な方策の一つとして、一般用漢方処方の見直しとその積極的な活用が提言されている。我々は、これに対して厚生労働科学研究費補助金による研究班報告書として「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」（平成 20 年 3 月）を公表したが、この手引き案（改訂版）を基盤とした厚生労働省一般用医薬品部会において、一般用漢方処方承認内規の約 30 年振りの見直しと新規処方の承認基準収載が検討され、その結果、平成 20 年 9 月 30 日に薬食審査発第 0930001 号通知、平成 22 年薬食審査発 0401 第 2 号通知、平成 23 年 4 月 15 日薬食審査発 0415 第 1

号通知及び平成 24 年 8 月 30 日薬食審査発第 0830 第 1 号通知として、一般用漢方製剤承認基準が発出されている。「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」において承認基準への追加収載を提案された 85 処方のうち、現時点で 80 処方が収載されている。

一般用漢方処方承認基準に収載された処方は、長年の臨床使用経験により有効性・安全性を担保されているが、この経験的な保証に加え、現代科学的視点による評価を付与することが必要と思われる。我々はこれに対して、漢方処方の腸内環境への関与という新たな視点で考察を進め、これまでに、ヒト腸内常在菌である *Lactobacillus reuteri* の生育に影響を与える漢方処方のスクリーニングを行い、茯苓飲や六君子湯などを含むいくつかの処方に菌増殖促進活性があることを見出した。本研究では、これらの処方のうち茯苓飲に含有される活性成分について検討をしたので報告する。

## B. 研究方法

### 試薬及び器具

生薬はウチダ和漢薬より日本薬局方規格品を購入して用いた。嫌気ジャーは BD の GasPak 100 Holding Jar を、アネロパックは三菱ガスケミカルの製品を用いた。96 穴マイクロプレートは AGC テクノグラス (IWAKI) の製品を用いた。0.22  $\mu\text{m}$  孔あるいは 0.45  $\mu\text{m}$  孔のメンブランフィルターは Millipore 社の Millex (PVDF) を用いた。顕微鏡観察用の細胞計数盤は、ワンセル社のワンセルカウンターを用いた。糖鎖標品としてのマルトトリオース (Bc-G3)、マルトペンタオース (BC-G5)、マルトヘプタオース (BC-G7) 及び G1~G10 mix (BC-GM) はセンシュー科学より購入した。

固相抽出カラムは Waters 社の Oasis HLB (60 mg/1cc) を用いた。HPLC による分析分離には、逆相カラムとして Luna C18(2) 100A (4.6 $\times$ 150 mm、Phenomenex)、配位子交換+サイズ排除モードのカラムとして SUGAR KS-802 (8.0 $\times$ 300 mm、Shodex)

を用いた。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーには、エコノカラム (1.0 $\times$ 100 cm, Bio rad) に Bio-gel P2 (Bio rad) を充填させたカラムを使用した。

### 腸内細菌

*Lactobacillus reuteri* JCM 1112 を理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より購入して用いた。

### 設備及び機器

生薬を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥は FREEZE DRYER FDU-830 (東京理化学器械) を用いて行った。オートクレーブには MAC-601 (東京理化) を用いた。菌体の観察・撮影は、Olympus の位相差顕微鏡 IX51 及びデジタルカメラ DP20 を用い、画像処理・画像解析には WinROOF (MITANI) を用いた。NMR スペクトルは、ECA-800 型核磁気共鳴装置 (Jeol) で測定した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの際には、低圧クロマトグラフィー装置として BioLogic LP system (Bio rad) を用いた。

### 漢方処方及び生薬のエキス調製

茯苓飲のエキス調製は、茯苓 (5)、白朮 (4)、人参 (3)、生姜 (1)、陳皮 (3)、枳実 (1.5) の配合比で構成生薬をポット (らくらく煎) に取り、生薬総重量の 20 倍量の水を入れ、半量になるまで煎じた。この煎出液をナス型フラスコに入れ、-45 $^{\circ}\text{C}$  で予備凍結させた後、凍結乾燥させて漢方処方エキスを調製した。単味生薬エキスは生薬 20g に関して上記と同様の方法で調製した。

### 腸内細菌の培地調製

MRS broth (Oxoid) を定法の通り 52 g/L で用い、蒸留水で溶解後、L-cysteine を最終濃度 0.05% で加え、pH を 5.5 に合わせた。そして、121 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間オートクレーブ滅菌を施した後に用いた。

### 腸内細菌の培養

-80℃凍結保存した *L. reuteri* グリセロールストックを 3 mL MRS 培地に 1 白金耳接種し、アネロパックを入れた嫌気ジャーで 37℃、15 時間、静置培養した。

### 細菌生育試験

試料溶液は、漢方処方エキス及び生薬エキスを細菌培養用培地に 100 mg/mL の濃度で溶解したものとし、0.22 μm 孔あるいは 0.45 μm 孔のメンブランフィルターでろ過した後に用いた。96 穴マイクロプレートの 1 穴に終濃度 OD<sub>600</sub>=0.01 となるよう菌を加えた 80 μL の培地と 20 μL の試料溶液を加え、37℃で 5 時間培養した。

### 顕微鏡画像解析

培養終了後、培養液の一部を取り、位相差顕微鏡にて観察・撮影した。位相差用対物レンズは UPlanFLN 4×Ph を、位相差用光学素子には PhL を用いた。得られた画像は、WinROOF ソフトにより 2 値化処理を施して細胞と背景に分離し、細胞に相当する部分の面積を計測することにより、細菌増殖度を数値化した。また、得られた数値は検量線グラフを元に OD 値へ変換し、増殖度を求めた。

### 逆相担体による固相抽出

Oasis HLB カラム (60 mg/1cc) に MeOH 1 mL を流してコンディショニングし、水 1 mL を流し平衡化させた。20 mg/mL に調製したエキス水溶液を 1 mL ロードし、50% MeOH 水溶液及び 100% MeOH によりそれぞれ 1 mL で溶出させた。溶出画分は遠心エバポレーターで溶媒を完全に飛ばし、水に再溶解させたものを LC 分析及び菌増殖活性測定に用いた。

### 糖の粗分画 (EtOH 沈殿)

40 mg/mL に調製した陳皮エキスの固相抽出画分 (S34-1) 1 mL に対し、4 倍量の EtOH を加え、4℃で 1 時間静置後、5,000×g で 10 min 遠心し、沈殿と上清に分離した。沈殿は水に再溶解後、凍結乾

燥させて保存した。上清はエバポレーターで溶媒を完全に飛ばした後、デシケーターで乾燥させて保存した。

### 陳皮エキス固相抽出画分の LC-PDA-MS 分析

陳皮エキス及びその固相抽出画分をそれぞれ 1 mg/ml に調製し、10 μL を HPLC 分析に供した。分析条件は以下の通りである。

HPLC: Shimadzu Prominence

カラム: Luna C18(2) 100A (Phenomenex)

カラム温度: 40℃

移動相: (A) 0.1% ギ酸/水、(B) 0.1% ギ酸/アセトニトリル

グラジエント:

5% B→60% B (35 min)→100% B (45 min)  
→100% B (50 min)

流速: 0.2 mL/min

PDA: 190-800 nm

MS: ThermoFisher Scientific LTQ Orbitrap XL

ESI スプレー電圧: 4000 V

キャピラリー温度: 300℃

### 糖画分の LC-CAD 分析

S34-1 及びその EtOH 沈殿による分画画分を、それぞれ 5 mg/ml に調製し、5 μL を HPLC 分析に供した。分析条件は以下の通りである。

HPLC: Shimadzu Prominence

カラム: SUGAR KS-802 (Shodex)

カラム温度: 60℃

移動相: 水(isocratic)

流速: 0.4 mL/min

CAD: Corona CAD (ESA Biosciences, Inc)

### オリゴ糖画分のゲルろ過クロマトグラフィー

オリゴ糖画分 15 mg を 1 mL の水に溶解させたサンプルを、Bio-gel P2 カラム (1.0×100 cm) にのせ、脱気した水で溶出させた。溶出は 0.06 ml/min で行い、1.2 mL あるいは 0.6 mL ずつフラクションコレクターで集め、そのうち 20 μL をと

りフェノール硫酸法にて糖量を測定した。フェノール硫酸法は、Dubois らの報告<sup>1)</sup>を参考に、各フラクションに 20  $\mu$ l の 5% フェノール水溶液、100  $\mu$ L の濃硫酸を加え、40 分放置後 490 nm の波長の吸光度を測定することにより行った。また、フェノール硫酸法により糖が存在することが確認されたフラクションについては、20  $\mu$ L を上述と同様の条件で LC-CAD 分析に供し、同じ化合物を含有していると考えられたフラクションを集め、凍結乾燥して得られたサンプルをそれぞれ Fr. 1~4 とした。

#### (倫理面への配慮)

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用していない。

### C. 研究結果

#### 茯苓飲構成生薬(陳皮・枳実)における *L. reuteri* 増殖促進活性

*L. reuteri* の増殖を促進させる茯苓飲の活性について、どの構成生薬が寄与するのかを調べることとした。これまでの我々の研究において、陳皮が共通に配合されている六君子湯及び胃苓湯にも活性がみられたことから、陳皮を活性本体の候補として挙げ、陳皮及び同じミカン属植物を基原とする枳実について以下の検討を行った。

まず、陳皮と枳実の茯苓飲去一味及び去二味処方煎出エキスの *L. reuteri* 増殖に対する影響を観察したところ、茯苓飲去陳皮及び茯苓飲去枳実は、完全処方と同等の菌増殖促進活性がみられたが、去二味処方では、活性が消失した(図 1)。

次に、陳皮及び枳実の単味煎出エキスについて検討した結果、枳実単味は活性を示さなかったが、陳皮は濃度依存的な活性が確認された(図 2)。

陳皮が茯苓飲の菌増殖促進活性に寄与していることが明らかとなったため、陳皮の活性成分について更に検討を進めた。

#### 陳皮単味煎出エキスの逆相固相抽出カラムによる

#### 分画

陳皮に含有される菌増殖促進活性成分の分離を進めるため、逆相充填剤による分画を試みた。水で平衡化させた固相抽出カラム(Oasis HLB)に陳皮単味煎出エキスの水溶液を添加し、非保持画分(S34-1)、50% MeOH 及び 100% MeOH 溶出画分(それぞれ S34-2, S34-3)を得た後、それぞれの画分における菌増殖度を観察したところ、非保持画分(S34-1)に増殖促進活性が局在していた(図 3)。

それぞれの画分について逆相カラムにおける LC-PDA-MS 分析を行ったところ、活性の観察された画分 S34-1 については、TIC(トータルイオンクロマトグラム)では保持時間 0~5 分の極性の高い領域にピークがみられたものの、UV 254 nm の大きな吸収はみられなかったことから、糖鎖が含有されていると考えられた(図 4B)。一方、S34-2, S34-3 にみられた保持時間 17.3 min のピークは、標品との保持時間及び精密質量の一致により、陳皮の主要成分であるヘスペリジンと同定された。また、S34-2, S34-3 の主要ピークについて、柑橘類に含有されることが報告されているフラバノン配糖体やフラボン配糖体、ポリメトキシフラボン<sup>2)</sup>の精密質量と  $\pm 2$  mmu 以内の値を示したものを、それぞれ●, ▲, ■とした。S34-2 には主にフラバノン及びフラボン配糖体が、S34-3 にはフラバノン配糖体及びポリメトキシフラボンが含有されていることが明らかとなった(図 4 C, D)。

また、S34-1 については NMR 測定も行った。<sup>1</sup>H-NMR では、4.5~5.5 ppm(アノメリックプロトン)及び 3.0~4.5 ppm(非アノメリックプロトン)に、また <sup>13</sup>C-NMR では 95~110 ppm(アノメリック炭素)及び 60~85 ppm(非アノメリック炭素)に多数のスペクトルが観測された。これらは糖の一般的な化学シフトであることから、S34-1 には主に糖鎖が含有されていることが確認された(データ掲載せず)。

以上、LC-MS 及び NMR の結果から、S34-1 の構成成分は、フラボノイドではなく、糖鎖であることが確認された。

### 陳皮単味煎出エキス活性画分のエタノール沈殿による粗分画

活性画分である S34-1 の構成成分が糖であることが確認されたことから、エタノール沈殿による多糖（沈殿）とオリゴ糖・単糖（上清）の分離を試みた。S34-1 に 4 倍量の EtOH を加え、生じた沈殿と上清を分け、それぞれの画分について、配位子交換＋サイズ排除モードのカラムにおける LC-CAD 分析を行った結果、保持時間 10 min 付近の多糖画分（沈殿）と、それ以外のオリゴ糖・単糖画分（上清）に分離できていることが確認された（図 5）。

沈殿、上清画分における菌増殖促進活性を調べたところ、上清画分に活性が見られたことから、活性成分はオリゴ糖・単糖であることが示唆された（図 6）。

### 陳皮オリゴ糖画分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分画

陳皮オリゴ糖画分について、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分離を試みた。オリゴ糖画分 15 mg を 1 mL の水に溶解させたサンプルを、Bio-Gel P2 を充填したカラム（1.0×100 cm）に供し、4 つのフラクションに分けた（図 7）。配位子交換＋サイズ排除モードカラムを用いた HPLC 分析により、Fr. 1 (0.46 mg) は、10 糖以上の糖、Fr. 2 (1.60 mg) は 2 糖、Fr. 3 (3.11 mg) 及び Fr. 4 (3.19 mg) は単糖であると推測された。

得られた 4 つの画分における菌増殖促進活性を調べたところ、Fr. 2 に活性が見られたことから、活性成分は 2 糖であることが示唆された（図 8）。

#### D. 考察

乳酸菌 *L. reuteri* の増殖を促進させることが確認された茯苓飲の活性成分について検討を行い、茯苓飲の構成生薬のうち、陳皮に濃度依存的な菌増殖促進活性があることを見出した。陳皮と同じミカン属植物を基原とする枳実単味及び陳皮と枳

実の去二味処方には活性がみられなかったが、去陳皮処方に完全処方と同等の活性がみられたことから、枳実は単独では活性を示さないが、他の生薬の成分との相互作用により活性を発揮する可能性等が考えられた。

単味で活性が見出された陳皮について、活性成分の分離を進め、活性本体が 2 糖のオリゴ糖であることを確認した。陳皮は、日本薬局方において「ウンシュウミカン *Citrus unshiu* Markovich または *Citrus reticulate* Blanco の成熟した果皮」と規定されている。*Citrus* (ミカン) 属の果皮に共通した成分としては、テルペノイドなどの精油成分やフラボノイドの他、ペクチン性多糖について、薬理研究も含めた報告が多くされているが、オリゴ糖に関する報告は少ない。本研究により明らかとなった *L. reuteri* 増殖促進活性を持つ 2 糖が陳皮に特異的な化合物であるかどうか等にも興味を持たれ、今後、2 糖化合物の同定へ向けて更に検討を進める予定である。

#### E. 結論

一般用漢方処方の有効性及び安全性に関する研究の一環として、*in vitro* 培養した乳酸菌 *L. reuteri* の生育に影響を与える処方について研究を行い、茯苓飲及びその構成生薬である陳皮に菌増殖促進活性があることを見出した。陳皮中の活性成分について更に検討を行ったところ、オリゴ糖画分のうち、2 糖が活性本体であると考えられた。今後、2 糖化合物の同定に向けて検討を進める予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

糸田幸恵、勢ノ康代、若菜大悟、袴塚高志、合田幸広、新規漢方処方の品質規格に関する基礎的検討（14）腸内細菌 *Lactobacillus reuteri* の増殖を促進させる漢方処方エキスの成分について、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月（横浜）

2. 誌上発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

参考文献

- 1) Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K.,  
Rebers P.A., Smith F., Colorimetric method  
for determination of sugars and related  
substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1952)
- 2) Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi  
U., Caristi C., Flavonoid composition of  
*Citrus* juices. *Molecules*, **12**, 1641-1673  
(2007)

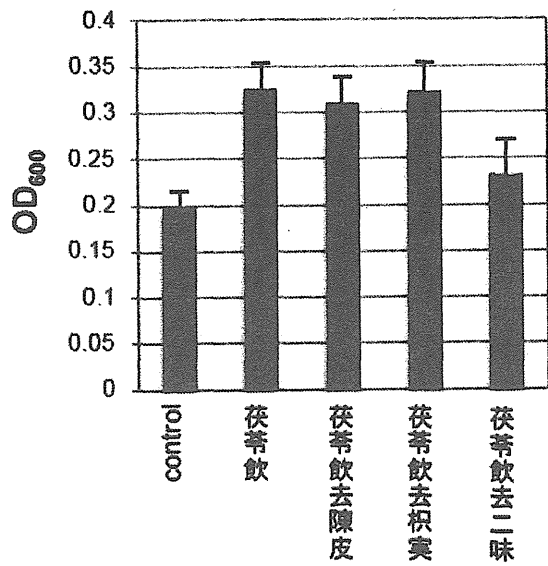


図1 茯苓飲及び去一味・二味処方エキス処理5時間後の *L. reuteri* 増殖度 (n=3)

煎出エキスの投与濃度 (mg/ml): 茯苓飲 (20)、茯苓飲去陳皮 (12)、茯苓飲去枳實 (18.1)、茯苓飲去二味 (10.1)

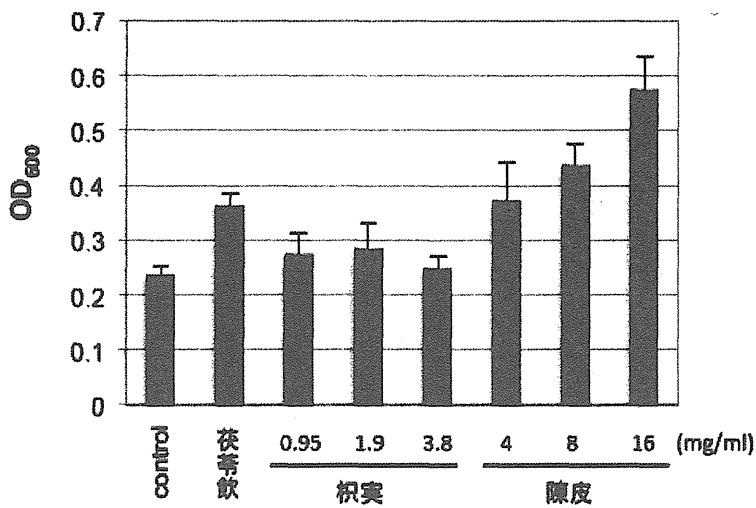


図2 枳實及び陳皮エキス処理5時間後の *L. reuteri* 増殖度 (n=3)

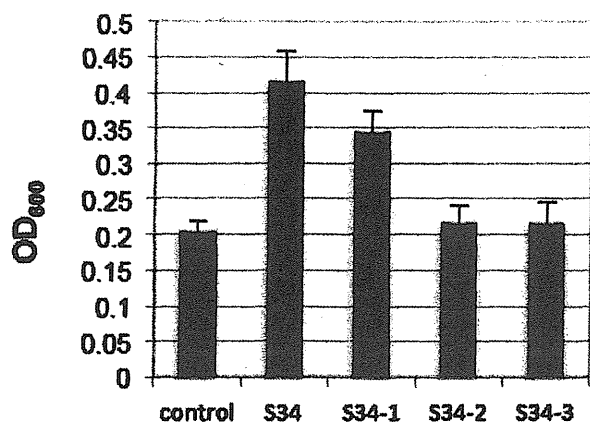


図3 陳皮エキス (S34) 固相抽出画分処理 5 時間後の *L. reuteri* の増殖度 (n=3)

投与濃度 (mg/ml) : S34 (8), S34-1 (非保持画分; 6.3), S34-2 (50%MeOH 溶出画分; 1.4),  
S34-3 (100% MeOH 溶出画分; 0.3)



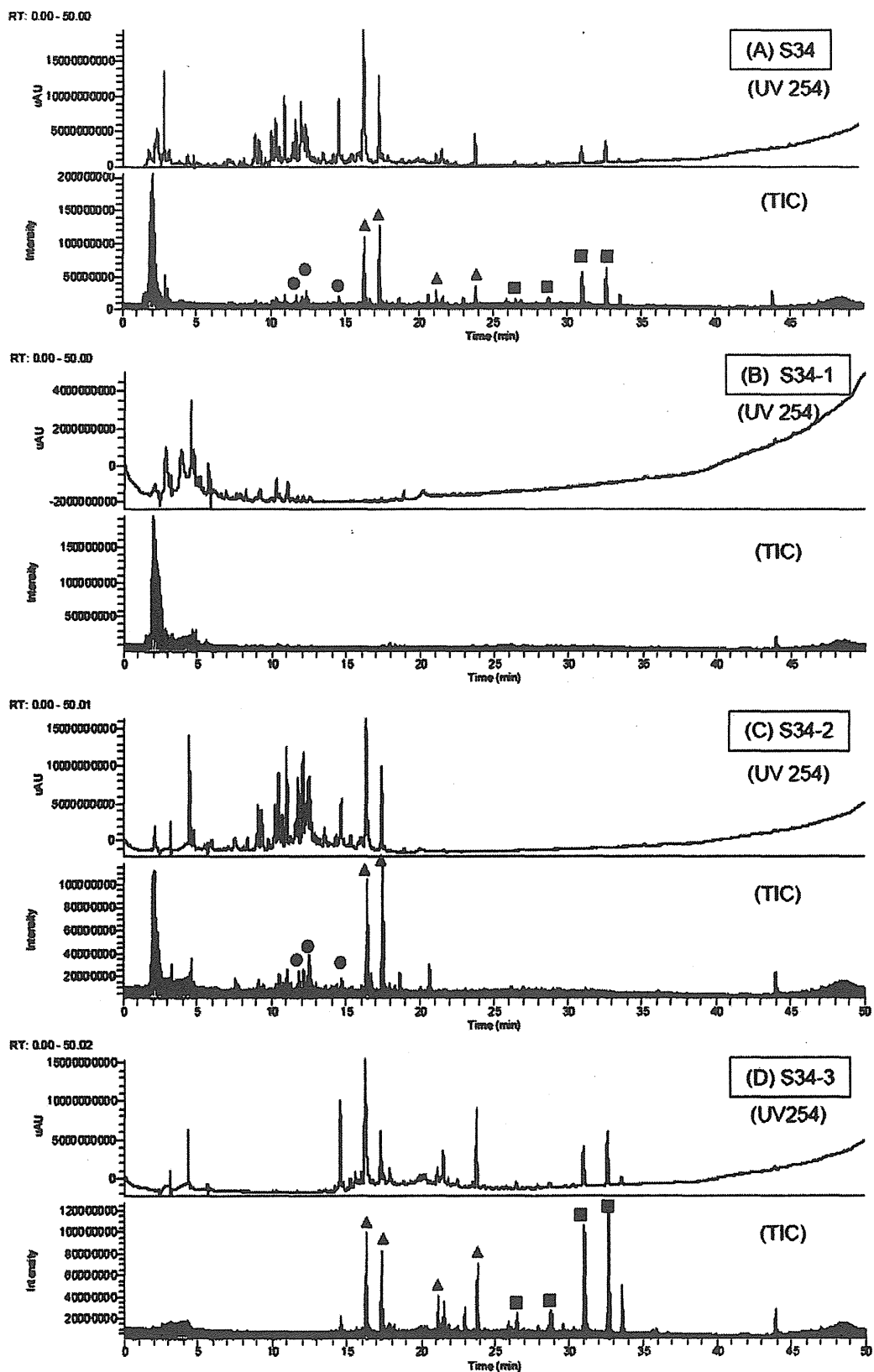


図4 逆相カラムによる陳皮エキスの固相抽出画分のLC-PDA-MS分析(上段はUV 254 nmでのクロマトグラム, 下段はトータルイオンクロマトグラム)

- (A) 陳皮(S34)エキス, (B) S34-1(非保持画分), (C) S34-2 (50%MeOH 溶出画分),  
 (D) S34-3 (100% MeOH 溶出画分)

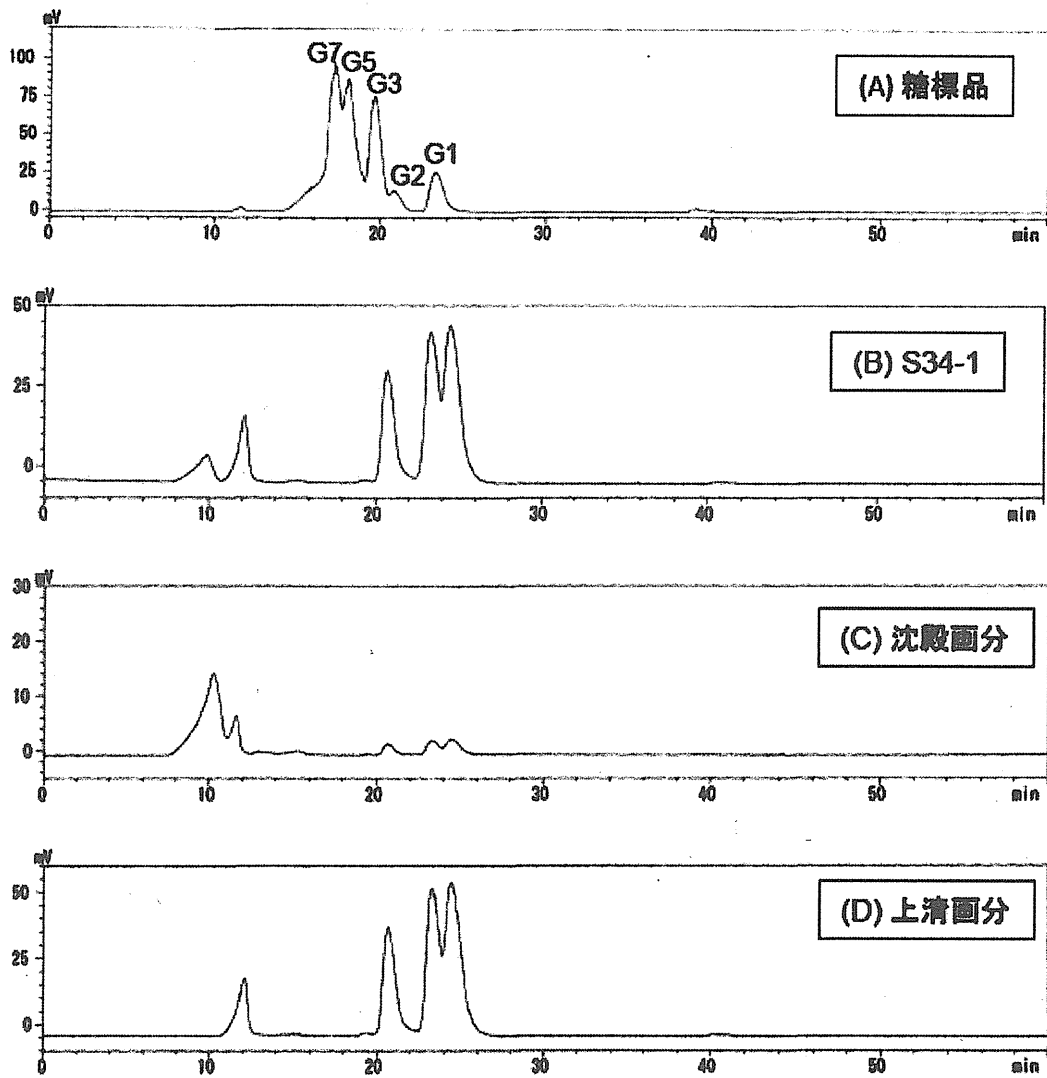


図5 配位子交換+サイズ排除モードのカラムによる糖画分のLC-CAD分析

(A) 糖標品 (オリゴマルトース), (B) S34-1, (C) S34-1 のエタノール沈殿による沈殿画分  
 (D) S34-1 のエタノール沈殿による上清画分

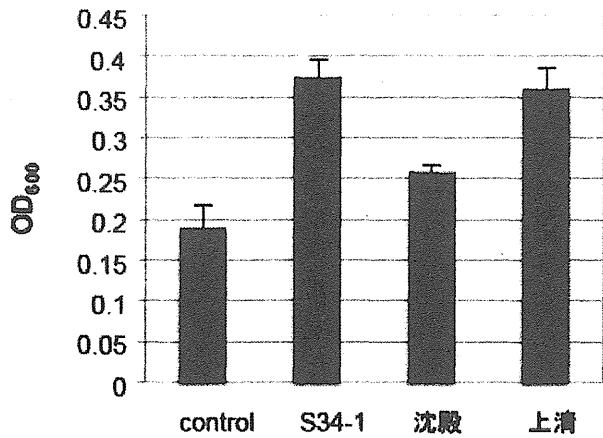


図6 S34-1 エタノール沈殿による沈殿 (多糖) 画分と上清 (オリゴ糖) 画分処理 5 時間後の *L. reteri* 増殖度 (n=3)  
 投与濃度 (mg/ml): S34-1 (6.3), 沈殿画分 (0.6), 上清画分 (5.7)

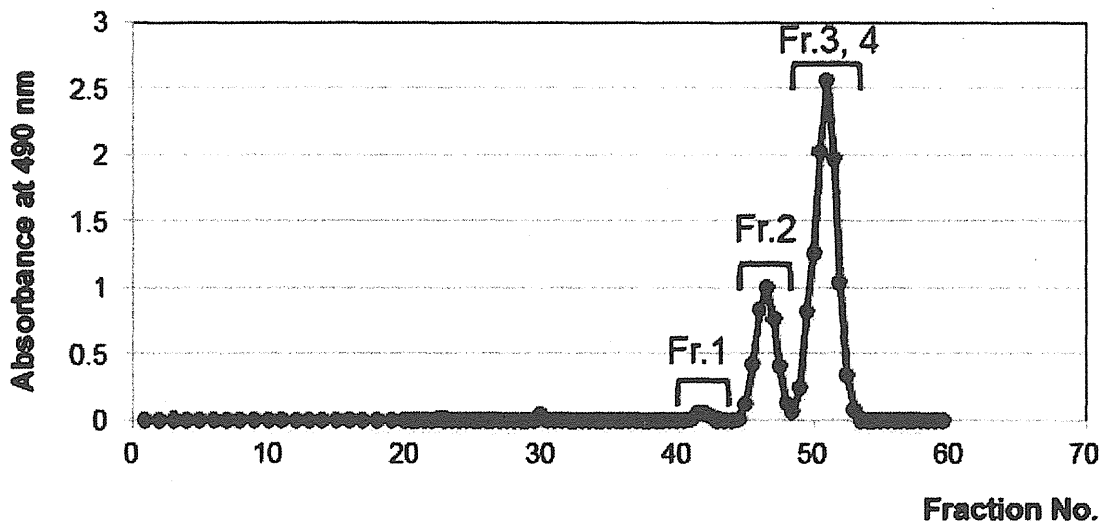


図7 陳皮オリゴ糖画分の Bio-gel P2 カラムによるゲルろ過クロマトグラム  
 各フラクションのモニター方法: フェノール硫酸法

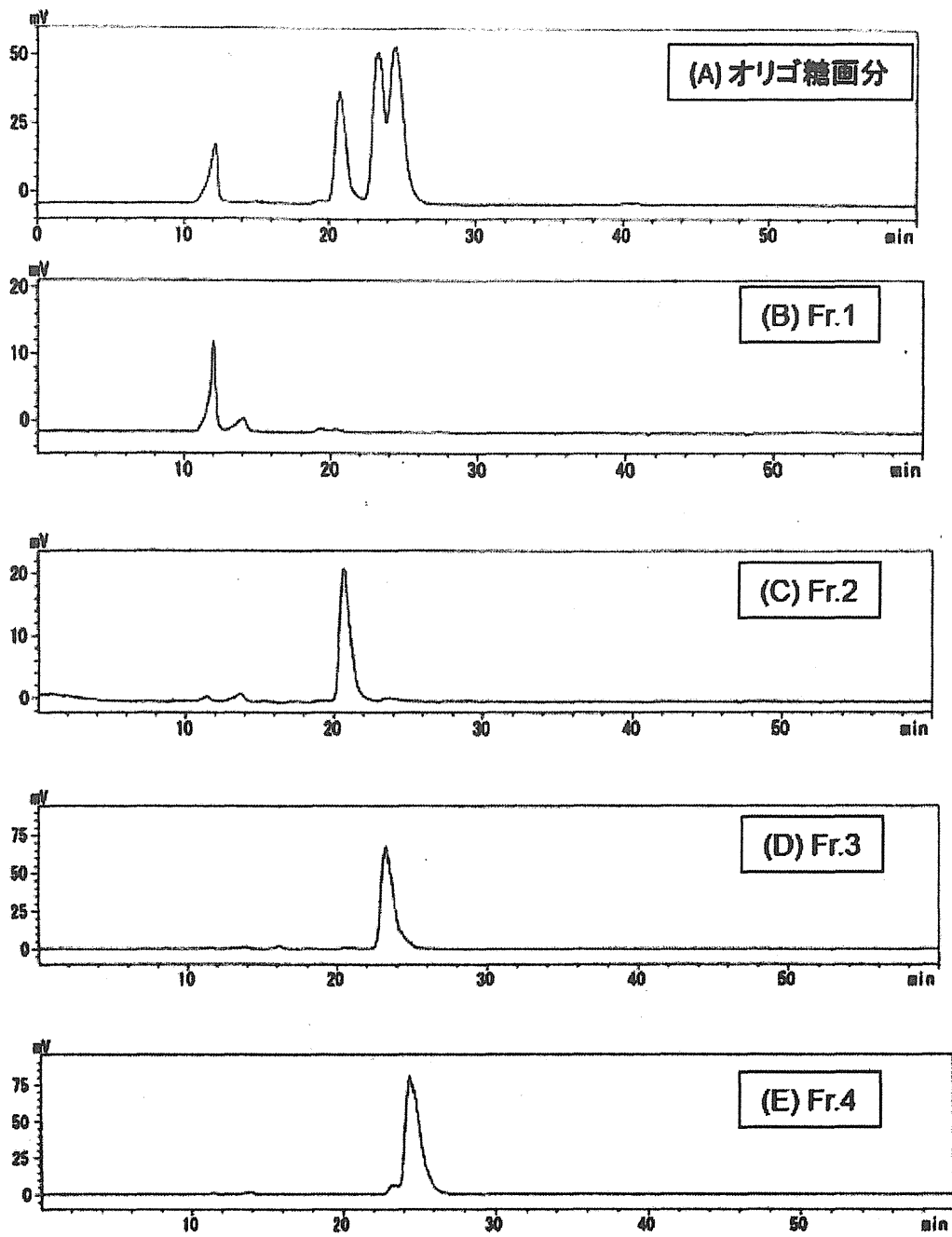


図8 ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したフラクションのLC-CAD分析  
 (A) 陳皮オリゴ糖画分 (分画前), (B)~(E) Fr.1~Fr. 4