

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07104

研究課題名（和文）NMRメタボロミクスによる生薬原料の成分マッピング法の確立

研究課題名（英文）The constituents mapping for natural medicines with NMR metabolomics

研究代表者

鈴木 龍一郎（Suzuki, Ryuichiro）

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：20415201

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：NMRメタボロミクスの手法を用いることで、生薬として用いる部位と生薬として用いない部位とで含有成分がどのように異なっているかを明らかにする手法が確立できた。通常、成分の分析に使用するHPLCでの分析では検出できなかった含有成分の違いを、NMRメタボロミクスは検出できた。このことから、本手法を用いることでこれまで生薬として使用してこなかった部位についても、生薬として使用することの可能性を検討できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生薬は日本薬局方で、生薬として使用できる部位（葉や根など）が規定されており、それ以外の部位は使用することができない。しかし、生薬として使用する部位と、しない部位でどれ程成分が異なっているのかが明らかとなっていないケースも多い。ただ、通常の分析方法では、その違いを確認することが困難な場合もあるため、本研究では生薬として使用する部位としない部位とで、成分がどれほど異なっているかを明らかにする手法を確立したものである。本手法を用いることによって、含有成分の違いを明らかにできたり、場合によってはこれまで生薬として使用しなかった部位を生薬として使用することも検討できると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, I established a new method to detect the differences in ingredients between parts that are used as natural medicines and those that are not. Although HPLC analysis, which is used to confirm the ingredients of natural medicines, could not detect these differences, NMR metabolomics could. NMR metabolomics is a useful tool for evaluating the quality of natural crude drugs. These results indicated that this method can confirm to the possibility of using parts of the plant that have not been used as crude drugs.

研究分野：天然物化学

キーワード：NMRメタボロミクス キハダ ビワヨウ ショウガ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

漢方薬に認知症など治療法が見つかっていない疾患に対する有効性が認められ、その需要が高まっているが、漢方薬を構成する生薬の供給には、中国の輸出規制などの不安がある。そこで生薬の国内栽培が検討されているが、これまでわが国では生薬の栽培をほとんど実施してこなかったため、生薬の原料植物に関する知見が意外にも乏しい。原料植物のうち、生薬として使用する部位と使用しない部位とで含有成分がどれほど異なるのか、使用する部位では成分がどのように分布しているのかを分析する手段がないため、その理解は進んでいない。そこで本研究では NMR メタボロミクスを応用し、キハダなどを用いて本手法(成分マッピング法)の確立を行う。

2. 研究の目的

生薬原料植物の成分に関する知見を充実させることが、本研究の目的である。生薬原料植物に含まれる成分に着目し、生薬として使用する部位と生薬として使用しない部位との成分の違いを比較する。また、生薬として使用する部位において、成分がどのように分布しているかを解析できる分析手法を確立する。なお、解析には NMR メタボロミクスの手法を応用する。通常、含有成分の比較をする際は、HPLC を用いて実施する。特定の成分に着目し、その含有成分が含まれているか、それらがどのように分布しているかを判断する場合は、HPLC の利用が有利であるが、生薬のようにどのような成分がどれだけ含まれているかが明らかではない場合、分析対象物をこれと定められない NMR メタボロミクスの手法が有利である。

3. 研究の方法

本研究では、モデル植物としてキハダ、ビワの葉、ショウガの根茎を使用した。

2020 年度は生薬オウバクの基原であるキハダを用いて、生薬として用いる部位(外皮を取り除いた樹皮)とそれ以外の部位の含有成分の違いを分析した。宮城県亶理郡山元町で入手した輪切りのキハダの幹から、中心から 1~2 cm 幅の板状の材を切り出し、更にその板状の材の中心から周皮に向かって 1 cm 幅で短冊状にサンプルを 6 個切り出した。次にそのサンプル(No.1~6)と生薬として用いるキハダの樹皮をミルでそれぞれ別々に粉末とした。それらのサンプルから 10 g を量り取り、150 mL の MeOH で 1 時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出エキスは減圧下で溶媒留去し、乾燥させた。乾燥させたサンプルはそれぞれ 10 mg 程度秤取し、NMR 測定用重 dimethylsulfoxide- d_6 で 10 mg/mL となるように溶解させた。なお、各サンプル(No.1~6 及び樹皮)はそれぞれ 3 つずつ調製した。次にそれらの ^1H NMR スペクトルを測定し、得られたデータは Alice2 for metabolome でバケット積分と主成分分析を行った。

2021 年度はビワの葉(ビワヨウ)を用いて、一枚の葉で代謝産物がどのように分布しているかを NMR メタボロミクスの手法で確認した。埼玉県川越市で入手した同一サイズ(幅 70 mm、長さ 230 mm)のビワの葉(幅 70 mm、長さ 230 mm)をミルで粉碎後、メタノールで還流抽出し、メタノールエキスを調製した。なお、ビワの葉は短軸に沿って上下に切断し、さらに切断したそれぞれの葉は葉の主脈部分と周縁部とに分けて抽出した(1. 葉下部周縁部、2. 葉下部主脈部、3. 葉上部周縁部、4. 葉上部主脈部)。抽出により得たメタノールエキスを減圧乾燥後、10 mg 程度を秤取し NMR 測定用重 dimethylsulfoxide- d_6 に 10 mg/mL となるように溶解した。なお、部位別のサンプル 1~4 はそれぞれ 3 つずつ調製した。次にそれらの溶液サンプルの ^1H NMR スペクトルを測定し、得られたデータは Alice2 for metabolome でバケット積分と主成分分析に供した。

2022 年度はショウガの根茎について、NMR メタボロミクスの手法を用いて「成分の分布」を確認した。入手したショウガの根茎を 5 mm 幅でスライスし、乾燥後周縁部分と中心部分とに分け、それぞれの部分をミルを用いて粉末にした。それぞれの粉末 50 mg を秤取し、重メタノール 1.2 mL に溶解し、ボルテックスミキサーを用いて 5 分間攪拌させた。その後、綿栓濾過により不溶物を除去し、濾液を NMR チューブに入れ NMR 測定サンプルとした。なお、周縁部分と中心部分それぞれについて、3 セットずつの抽出を行った。NMR 測定においては、通常の測定を行い、 ^1H NMR スペクトル測定において十分なシグナル強度が得られなかった場合は、シゲミ社製の対称型マイクロサンプルチューブを使用する予定であったが、測定サンプルのシグナルは十分な強度を示したため、通常のチューブにて測定を行った。測定により得られた ^1H NMR スペクトルは Alice2 for metabolome(JEOL)でバケット積分を行い、引き続き主成分分析を行った。

4. 研究成果

キハダに関して、各サンプル(No.1~6 及び樹皮)の主成分分析のスコアプロットを確認すると、樹皮は明らかに他と異なる場所にプロットされた。一方、No.4-6 はそれぞれ近いところにプロットされたことから、幹の心の部分は成分差があまりないことが明らかになった。それに対して No.1、2、3 はそれぞれ別々にグループを形成したことから、キハダの成分は樹皮に向かうにつれ、成分プロファイルが異なっていくことが明らかになった。

ビワの葉(ビワヨウ)に関して、サンプル#1(葉下部周縁部)、サンプル#2(葉下部主脈部)

サンプル#3（葉上部周縁部）、サンプル#4（葉上部主脈部）の主成分分析のスコアプロットを確認すると、#2はPC1軸上で他の#1、#3及び#4と離れてプロットされ、ローディングプロットの結果から#2が他と離れてプロットされたのは3.46及び3.50 ppmのシグナルに依ることが推定された。¹H NMRスペクトル上では配糖体に由来するシグナルが主に検出されているため、恐らく#2には他と糖の種類が異なる配糖体が含まれている可能性が示唆された。

ショウガに関して、周縁部分と中心部分は明らかに成分が異なっていた。また、これらのサンプルをODSカラムを用いたHPLC分析を行ったが、測定結果に差は認められなかった。このことから、NMRメタボロミクスは感度良くショウガの根茎の部位による成分の違いを検出できることが明らかとなった。

本研究の目的は、生薬として使用する部位と使用しない部位との差を、また、一つの部位に関して含有成分のバラツキをNMRメタボロミクスの手法で検出できるかを確認することであった。本研究を実施した結果、NMRメタボロミクスはいずれの場合において含有成分の違いを検出することができた。研究当初はNMRの検出感度が低いことが懸念されたが、得られたNMRスペクトルを多変量解析することで含有成分のわずかな違いを際立たせることが可能であったと推定される。特筆すべきは、通常含有成分の違いを確認するHPLCでは検出できなかった差異を、NMRメタボロミクスで検出できたことである。HPLCで含有成分を分析する場合は、分析対象物に適した条件（カラムや移動相の選択）を適応する必要があるが、NMR測定の場合サンプルが測定溶媒に溶解すれば詳細な測定条件の設定が不要なため、分析対象物の検出レンジが広いことが特徴である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木龍一郎、佐野愛子
2. 発表標題 NMRメタボロミクスによる成分マッピング法のキハダへの適用
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木龍一郎、佐野愛子
2. 発表標題 成分マッピング法によるピワの葉の成分解析
3. 学会等名 日本生薬学会第68年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------