

令和元年6月12日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18895

研究課題名（和文）メタボローム解析とPK-PDモデルを活用した大黄甘草湯エキス品質評価法の開発

研究課題名（英文）Quality evaluation method of Daio-Kanzo-To extract by metabolomics

研究代表者

原田 和生（HARADA, Kazuo）

大阪大学・医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：50397741

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：漢方薬エキスに含まれる成分の網羅的情報であるメタボロームデータを用い、そのエキスが持つ薬効の強さを予測する手法の開発を目指し、本研究では、様々な基原種、産地のダイオウ、カンゾウから調製した大黄甘草湯エキスについて、腸内細菌によって生成する瀉下活性成分レインアンスロン(RA)量を、エキスのメタボロームデータから予測するモデルの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、漢方処方エキス成分の網羅的情報であるメタボロームデータを利用することにより、腸管内における活性成分生成量の精度の良い予測が可能であること、代謝におけるエキス成分間の相互作用の検出が可能であることを示唆している。本手法により、より客観的な漢方薬エキスの品質評価法が構築できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of my study is to develop a method to predict the strength of pharmaceutical effects of Kampo medicine extracts using metabolomic data which is comprehensive information of the ingredients contained in the extracts. In this study, a model that predicts the amount of the active ingredient for swallowing, rheinanthrone, produced by microbiota from the Daio-Kanzo-to extract's metabolome data was constructed.

研究分野：分析化学

キーワード：漢方薬 メタボローム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

漢方薬は西洋医薬で対応できない様々な疾患に有用であることなどから、世界的に需要が拡大している。その為、漢方薬製剤の品質評価・管理の重要性が高まっている。漢方薬製剤の生産の現場において、品質評価は熟練者の経験的鑑定や日本薬局方規定指標成分の含量などを基本として行われているが、最も重要な品質である「薬効の強さ」を、これらの情報から「予測」することは現状困難である。したがって、漢方薬製剤、およびその原材料である生薬について、「薬効の強さ」を高精度に「予測」できる品質指標が求められている。

ダイオウとカンゾウが構成生薬である大黃甘草湯は、便秘やその周辺症状を目標とする漢方処方であり、その瀉下活性はダイオウの指標成分 sennoside A およびその異性体 sennoside B が腸内細菌により代謝され生成する rheinanthrone に起因することが知られている。しかし、このように薬理活性の発現機構が明らかになっている漢方処方であっても、生薬材料、もしくは調製された漢方製剤の鑑定や指標成分の評価によって、薬効の強さを正確に予測することは困難である。

2. 研究の目的

申請者は生薬・漢方薬エキスに含まれる成分を網羅的に解析するメタボローム解析の技術を生薬、さらには漢方処方の品質評価に活用することを目指し、エキスのメタボロームデータから生物活性を予測する手法、および数式モデルの構築に取り組んできた。

本研究では、異なった基原種、産地から調製した大黃甘草湯エキスについて腸管内で生成する rheinanthrone 量をメタボロームデータから予測するモデルを構築し、漢方薬品質評価技術としての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で用いたダイオウは富山大学和漢医薬学総合研究所 小松かつ子教授より譲渡いただいた、中国青海省産の *Rheum palmatum* L. に由来する市場品、同じく中国青海省産の *R. tanguticum* Maxim. に由来する市場品、および長野県で栽培している *R. palmatum* の栽培5年目の根茎または根を使用した。また、カンゾウは中国内蒙古産および寧夏産の市場品、モンゴル産野生品、日本栽培品の根を使用した。使用したカンゾウは全て *Glycyrrhiza uralensis* Fisher である。大黃甘草湯エキスは、第16改正日本薬局方の大黃甘草湯エキスの処方²⁾に従って材料を混合し、調製した。上述のダイオウとカンゾウの材料について、全ての組み合わせでエキスを調製し、全24種類の大黃甘草湯エキスを作製した。

調製した大黃甘草湯エキスのメタボローム解析は、液体クロマトグラフィー / 質量分析 (liquid chromatography / mass spectrometry, LC/MS) を用いて行った。カラムは内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 1.7 μm の Acquity UPLC BEH C18 (Waters) を用いた。溶離液は 0.1% ギ酸を含む蒸留水とアセトニトリルの混合液とし、グラジエント溶出を行った。イオン化は electrospray ionization (ESI) で行い、極性は負イオンモードとした。m/z 100 - 1,000 の範囲をスキャン時間 0.95 sec でスキャンすることにより、データを取得した。データの前処理はフリーソフトである MZ mine 2.10 を用いて行った。また、多変量解析は SIMCA13 (Umetrics社)を使用した。

各大黃甘草湯エキスから生成する rheinanthrone 量の評価は以下のように行った。マウス糞便を採取し、即座に懸濁液を調製、大黃甘草湯エキスを添加し、嫌気条件下でインキュベートし、懸濁液中の rheinanthrone 量を LC/MS により経時的に測定した。

4. 研究成果

大黃甘草湯エキスの LC/MS メタボロームデータには、ダイオウの指標成分である sennoside A, sennoside B, rhein, emodin, aloe-emodin, カンゾウの指標成分である glycyrrhizinic acid, カンゾウに含まれる代表的なフラボノイド配糖体である liquiritin とそのアグリコンである liquiritigenin が検出されていた。また、rhein 8-O-β-D-glucopyranoside や catechin, スチルベン類の resveratrol 4'-O-β-D-glucopyranoside と推定されるピークも見出された。(Fig. 1) さらに LC/MS メタボ

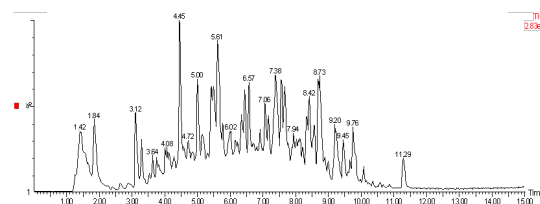


Fig. 1 大黃甘草湯エキスの代表的な MS クロマトグラム

ロームデータを主成分分析 (principle component analysis, PCA) に供した結果, ダイオウの材料ごとにクラスターが形成されており, 第一主成分で市場品と栽培品の違い, 第二主成分で *R. tanguticum* と *R. palmatum* の違いが反映されていた. また, これらの大黄甘草湯エキス間で, カンゾウの材料による成分含量の違いは, ダイオウの材料による違いに比べて小さいことが示唆された. (Fig. 2)

続いて, 上述の大黄甘草湯エキスをマウス糞便懸濁液に添加し, 嫌氣的条件下でインキュベートし, rheinanthrone 量を継時的に測定した. 予備実験として, 中国青海省産 *R. tanguticum* 由来ダイオウ市場品のエキス, および当該エキスに含まれる sennoside A, sennoside B に含量を揃えた sennoside A, sennoside B 標準混合溶液を, それぞれマウス糞便懸濁液に添加し, 生成する rheinanthrone 含量を測定した. その結果, 標準混合溶液を添加した場合とエキスを添加した場合のどちらにおいても sennoside 代謝が確認されたが, rheinanthrone の最大到達濃度は, sennoside A, sennoside B 標準混合溶液を添加した場合に比べ, ダイオウエキスを添加した場合, 32 倍高い値となった. このことから, ダイオウエキス中の何らかの成分が rheinanthrone に変換したか, もしくは sennoside から rheinanthrone への代謝が促進された可能性が示唆された.

続いて調製した全 24 種類の大黄甘草湯エキスそれぞれについて, マウス糞便懸濁液により代謝を行い, rheinanthrone 生成量を継時的に測定し, 最高到達濃度 Cmax の値を算出した. この値を目的変数とし, 各エキスの LC/MS プロファイルデータを説明変数として, 部分最小二乗法 (projection to latent structure by means of partial least square, PLS) を行った. 得られたモデルの rheinanthrone Cmax 予測値と実測値の相関係数は 0.99 であった. (Fig. 3) この値は sennoside A ピーク面積と rheinanthrone Cmax の相関より高い結果となった.

また, このモデルの VIP (variable importance in the projection) 値を確認したところ, モデル構築に寄与しているとみなすことができる 1 以上の値を示す成分が多数検出されていた. (Fig. 4) そこで, モデル構築に寄与した成分を推定したところ, sennoside A や sennoside B のみならず, rhein, emodin などのアントラキノン, それらの配糖体がリストアップされていた. 一方, 保持時間と *m/z* だけでは構造の推定できない成分も検出されていた. 以上の結果は, 大黄甘草湯の薬効の評価を行う上で, 指標成分とされる sennoside A のみの評価ではなく, 腸管内における rheinanthrone 生成代謝反応に影響を及ぼす可能性のあるエキス成分中の他の成分の含量も考慮しなければならないことを示している. また, 他の多成分の情報を一括して評価に用いるためにメタボロームデータを活用した本解析手法は非常に有用であることが示唆された.

本研究では, 大黄甘草湯エキスの薬効を予想可能な新たな品質評価法の開発を目指し, エクス成分のメタボロームデータから, 腸管内で生成する rheinanthrone 量を予測するモデルの構築に取り組んだ. 様々なダイオウ, カンゾウの材料の組み合わせで調製した大黄甘草湯エキスを糞便懸濁液に添加し, 生成する rheinanthrone 量を継時的に測定, 得られた rheinanthrone Cmax データを目的変数, 大黄甘草湯エキスのメタボロームデータを説明変数として PLS に供

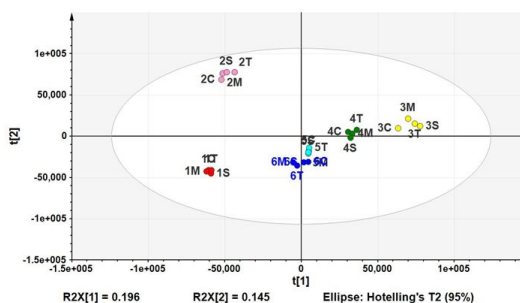


Fig. 2 LC/MS メタボロームデータを用いた大黄甘草湯エキスのスコアプロット
プロットに付したラベルは, 各エキスの構成材料の産地, 基原種の違いを表しており, 数字はダイオウ, アルファベットはカンゾウの材料の番号を示す.

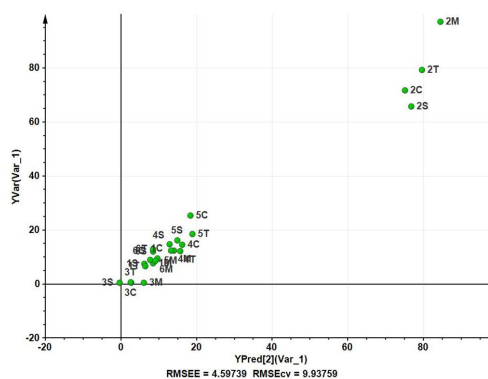


Fig. 3 PLS を用いた大黄甘草湯エキスの rheinanthrone Cmax 予測
横軸は LC/MS メタボロームデータを用いて予測した rheinanthrone Cmax 値, 縦軸は実測値を示す.

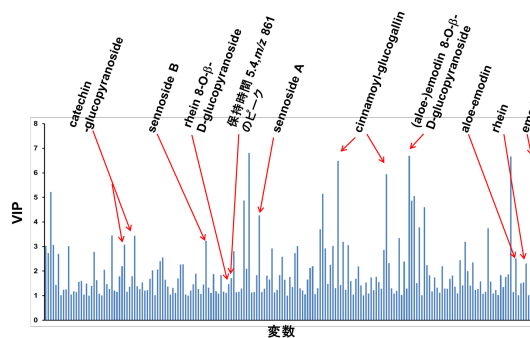


Fig. 4 大黄甘草湯エキスの rheinanthrone Cmax 予測 PLS モデルの VIP 値

し、エキスのメタボロームデータから rheinanthrone Cmax を予測するモデルを構築した。その結果、sennoside A 含量との相関に比べ、高い相関関係が得られるモデルを構築することに成功した。本成果は、漢方処方エキス成分のメタボロームデータを利用することにより、腸管内における活性本体生成量の精度の良い予測が可能であること、代謝におけるエキス成分間の相互作用の検出が可能であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

原田 和生, メタボロミクスによる生薬・漢方薬エキスの生物活性との相関解析, 日本薬学会第138年会, 2018年3月26日, 金沢

原田 和生, 上野 菜摘, 小松 かつ子, 平田 收正, メタボローム解析による大黄甘草湯エキス中の sennoside 代謝活性の予測, 日本生薬学会第63回年会, 2016年9月25日, 富山国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 小松 かつ子

ローマ字氏名: KOMATSU Katsuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。