

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790125

研究課題名(和文)メタボローム解析を用いた甘草の品質評価法の開発

研究課題名(英文)Development of quality evaluation method of licorice by metabolomics

研究代表者

原田 和生 (Harada, Kazuo)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50397741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：日本における最重要生薬であるカンゾウについて、抽出エキスがもつ一酸化窒素産生抑制などの生物活性を予測するためには、日本薬局方で規定値が定められているグリチルリチン含量のみを指標とするのでは不十分であり、エキス成分を網羅したメタボロームデータを用いると精度良く予測できることを示唆した。したがって生薬の品質評価にエキス成分の網羅的データの活用が有効であると言える。

研究成果の概要(英文)：Quality evaluation and control of herbal medicines are important but difficult issues. Licorice is the one of the most important herb in Japan, and regulated by glycyrrhizine content according to Pharmacopeia of Japan. However, biological activities of licorice extracts, such as suppression of nitric oxide generation in macrophage cell, could not be estimated by just only glycyrrhizine content of licorice. However, those could be estimated by metabolome data which possesses comprehensive component data accurately. We suggested that metabolome data in herbal extract is quite useful for quality evaluation of herbal medicines.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 環境系薬学

キーワード：薬用資源学 メタボローム カンゾウ

1. 研究開始当初の背景

近年生薬の価値が見直され、生薬材料の需要が世界的に拡大している。この影響で生薬産出国における野生品の乱獲が進み、資源枯渇、環境破壊が問題となっている。このような生薬産出国では採取、輸出を規制し始めており、特に国内消費量の大部分を輸入に依存している日本では良質生薬の安定確保が困難になりつつある。日本において処方される漢方薬で最も使用頻度の高いカンゾウは特にこの問題が深刻である。対応策として、製薬企業を中心として代替産出地の探索や栽培生産体制の整備が進められているが、代替産地の野生品や栽培品は日本薬局方の規定を満足し、かつ従来の流通生薬と同等であることが証明されなければ医薬品としての使用が難しい。

また、生薬は植物をはじめ生物資源を活用しているため、含有成分組成の個体差あるいは産地や収穫期の違いにより生じるロット差が化学合成医薬品に比べはるかに大きく、そのため安定した薬効が得にくい、つまり品質管理が困難として使用を避ける医療従事者も少なからず存在する。

以上のような背景から生薬の品質評価・管理は、特に我が国において喫緊の極めて重要な課題となっている。

従来、生薬の品質評価方法としては、外部・内部形態による基原植物の鑑定、日本薬局方規定単一成分の定量、TLC パターンの解析などが採用されてきた。しかし、当該手法では複雑な成分組成を定量的に取り扱うことは困難であり、また、最も重要な薬効を直接評価できているわけではなく、生薬品質評価法として十分とは言えない。

申請者は上述の問題を解決するために、生薬エキス成分を網羅的に解析するメタボローム解析、および生薬が有する薬効に関連の深い生物活性について簡便に評価可能な培養細胞アッセイ法を活用し、それらの相関を精査し、データを蓄積していくことで、メタボロームデータからの生薬の薬効を予測することが可能ではないかと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は生薬エキスをメタボローム解析および培養細胞アッセイに供し、それらの相関を解析し、予測モデルを構築することにより、メタボロームデータを活用した生薬品質評価法を確立することを目的とした。

さらに申請者らが栽培したものをはじめとする栽培品、代替産地の野生品および日本市場に流通するカンゾウの同等性について上述の解析を行うことにより評価を行った。

3. 研究の方法

本研究で用いたカンゾウは全てウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) である。中国東北、西北地域で採取されたカンゾウ野生品で日本市場品 (以下中国産市場品)、モンゴルで採取されたカンゾウ野生品、栽培品として中国・内蒙古自治区で栽培されたカンゾウ、北海道温室、大阪大学大学院薬学研究科にて栽培したカンゾウを用いた。グリチルリチン含量は日本薬局方に準じた方法で定量した。また、熱水により抽出したエキスを凍結乾燥で水分を留去し、PBS で溶解した試料も調製した。当該熱水抽出エキスを用いて、マウスマクロファージ RAW264.7 細胞における一酸化窒素産生抑制活性試験、液体クロマトグラフィー/フォトダイオードアレイ/質量分析 (LC/PDA/MS) を用いたメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

まずカンゾウの主要な薬効である抗炎症作用に着目し、その評価方法の一つであるマウスマクロファージ RAW 264.7 細胞を用いた一酸化窒素 (NO) の産生抑制活性試験の結果を生物活性の指標とした。試験の結果、使用したカンゾウサンプルによって NO 産生抑制活性に大きなばらつきがみられた。本活性は日本薬局方で規定値が定められているグリチルリチン含量との間に緩やかな正の相関が確認された。しかしながら、グリチルリチン含量 2.5%以上のサンプルでも低い NO 産生抑制率を示すものが存在し、グリチルリチン含量のみでの生物活性の予測、評価は困難であることが示唆された。

続いてカンゾウ熱水抽出エキスのメタボロームデータを LC/PDA/MS を用いて取得し、MS プロファイルに含まれる各 MS ピークを説

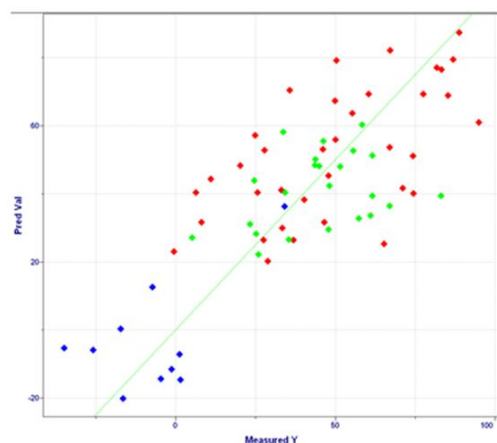


Fig. 1 MS プロファイルデータを用いた PLS による NO 産生抑制率予測結果

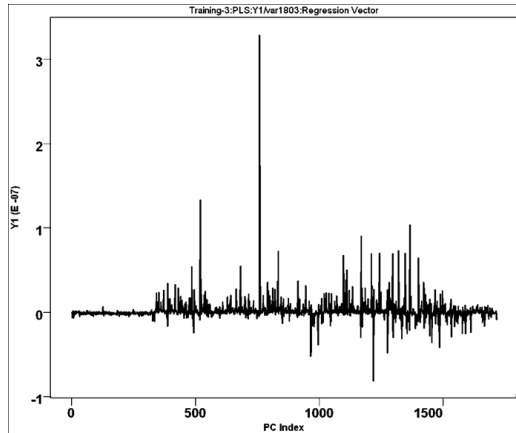
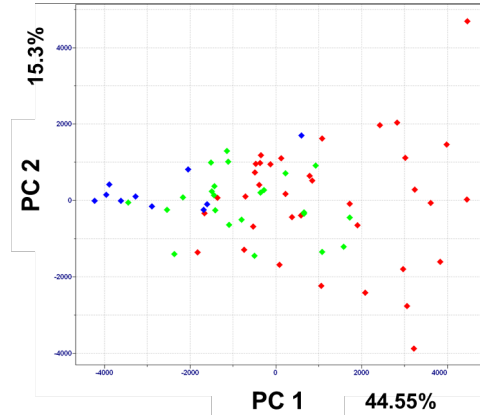


Fig. 2 PLS の予測に寄与した成分を示すリグレッションベクトル

明変数, NO 産生抑制率を目的変数として多変量解析の一つである Projections to Latent Structures by means of Partial Least Squares (PLS) を行った. Fig. 1 は NO 産生抑制率に関して, PLS モデルから予測された値を縦軸, 実際の実験で得られた測定値を横軸とし, 各サンプルの両者の関係を示した結果である. Fig. 1 に示す通り構築した PLS モデルにおける予測値と実測値を示したプロットは対角線の近くにプロットされており, 両者の相関が高いことが示された. この関係はグリチルリチン含量と NO 産生実測値との相関よりも高いものであった.

さらに説明変数の予測への寄与度を示したリグレッションベクトルを確認したところ, Fig.2 に示した通り, 多数のピークの絶対値が 0 よりも大きな値を示し, これらが予測に重要であることが示唆された. 有意な寄与を示したピークの中にグリチルリチンも含まれていたが, 当化合物よりも大きなリグレッションベクトルを示すピークも確認された. 本結果はカンゾウエキスが有する生物活性を予測するためには, グリチルリチン含量のみの評価ではなく, 様々な生理活性を持つ他成分の含量も考慮しなければならないことを示唆している.

次に中国産市場品, モンゴル野生採取品, 栽培品の特徴を解析するために LC/PDA/MS により得られたデータを用いて多変量解析の一つである主成分分析 (Principle Component Analysis, PCA) を行った. その結果, スコアプロットでは中国産市場品, モンゴル野生採取品, 栽培品のプロット位置が第一主成分に沿って明確に区分されていた. さらに栽培品, モンゴル野生採取品, 中国産市場品の順で相対的にプロットのばらつく範囲が大きくなっており, この順で同じグループ内でのプロファイルパターンが大きく異なっていることが示唆されている. (Fig. 3)



赤:中国野生市場品, 緑:モンゴル野生品, 青:栽培品

Fig. 3 PDA データを用いた主成分分析スコアプロット

この PCA により得られたローディングプロットにおいて, PC1 の寄与が大きいピークは保持時間の情報からカンゾウの主要成分であるグリチルリチン, リクイリチン, リクイリチゲニンであることが示唆された. つまり, 当該成分は栽培品, モンゴル野生採取品, 中国産市場品の順序で含量が大きくなっていることを示している. また, リクイリチンとリクイリチゲニンは PC2 に対して正負反対の値を示しており, 同一グループ内のサンプル間で配糖体化の程度が異なることが示唆された.

PLS によるメタボロームデータを用いた生物活性予測モデルと PCA によるプロファイル解析の結果をまとめると, カンゾウ材料の産地や生産ロットの違いによって生物活性が大きく変動し, その変動には日局方に規定のあるグリチルリチン含量のみならず, 他成分の含量の変動も寄与していることが示された. 特にリクイリチン, リクイリチゲニン含量の影響が大きいことが推測される.

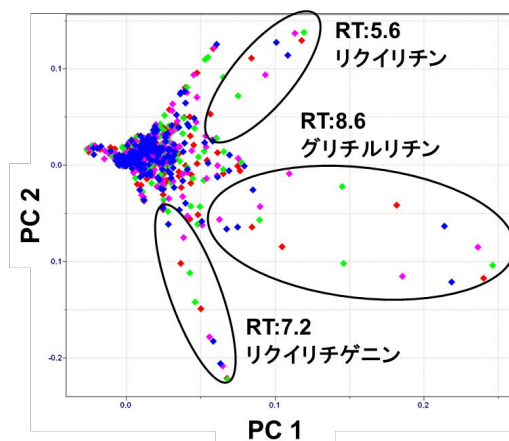


Fig. 4 PDA データを用いた主成分分析ローディングプロット

本研究では抗炎症作用の一評価法である NO 産生抑制活性を評価したが、本活性のみでカンゾウの薬効全てを評価することはできず、また薬物動態など *in vivo* の実験に基づく薬物動態が考慮されていないなどの課題も残っている。生薬の最も重要な品質は薬効であるが、それを予測、評価するためには、NO 産生抑制活性以外の生物活性試験データや薬物動態力学パラメータデータを集積し、それらとメタボロームデータとの相関関係を明らかにしていく必要がある。

このように残された課題も多いが、本研究では生物活性を予測、評価するためにはエキス成分の網羅的データであるメタボロームデータの活用が有効であることが示唆された。前述のような課題を克服することで、今後、生薬の「薬効」評価が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) 原田和生, 小田知佳, 角明香里, 高上馬希重, 山本豊, Shu ZHU, 小松かつ子, 平田收正, カンゾウの品質評価に向けたメタボローム解析の活用, 甘草研究最前線 2013, 71-72, 査読無

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 原田和生, 小田知佳, 角明香里, 高上馬希重, 山本豊, Shu ZHU, 小松かつ子, 平田收正, カンゾウの品質評価に向けたメタボローム解析の活用, 第8回メタボロームシンポジウム, 2013年10月3日~4日, 九州大学

- (2) 原田和生, 小田知佳, 角明香里, 高上馬希重, 山本豊, Shu ZHU, 小松かつ子, 平田收正, カンゾウの品質評価に向けたメタボローム解析の活用, 日本生薬学会第60回年会, 2013年9月7~8日, 北海道医療大学

- (3) 原田和生, 小田知佳, 角明香里, 高上馬希重, 山本豊, Shu ZHU, 小松かつ子, 平田收正, カンゾウの品質評価・管理に向けたメタボローム解析の活用, 第6回甘草に関するシンポジウム, 2013年7月6日, 北海道医療大学

- (4) 小田知佳, 原田和生, Shu ZHU, 山本豊, 小松かつ子, 平田收正, カンゾウエキス薬効評価のためのメタボローム解析の活用, 第62回日本薬学会近畿支部大会 2012年10月12日, 武庫川女子大学浜甲子園キャンパス

- (5) 小田知佳, 原田和生, 平田收正, Shu

ZHU, 小松かつ子, 山本豊, カンゾウエキスの薬効評価のためのメタボローム解析の活用, 日本生薬学会第59回年会, 2012年9月17~18日, かずさアカデミアパーク

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 和生 (HARADA, Kazuo)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 50397741

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし