

## 種目 (特定研究)

# 高齢者疾患または予防先制医療に有効な和漢薬の網羅的精密分析

|         |        |                  |       |
|---------|--------|------------------|-------|
| 申請代表者   | 丸山 卓郎  | 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 | 第一室長  |
| 所外共同研究者 | 後藤 佑斗  | 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 | 派遣研究員 |
| 所外共同研究者 | 内山 奈穂子 | 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 | 第二室長  |
| 研究統括者   | 小松 かつ子 | 資源開発研究部門生薬資源科学分野 | 教授    |
| 所内共同研究者 | 當銘 一文  | 資源開発研究部門生薬資源科学分野 | 准教授   |
| 所内共同研究者 | 朱 姝    | 資源開発研究部門生薬資源科学分野 | 助教    |

## ■背景・目的

超高齢化社会を迎えた我が国にとって、国民医療費の増大への対応は喫緊の課題となっており、健康寿命の延伸が求められている。従来の平均余命に着目した研究では、死因の上位を占める悪性新生物、脳血管疾患、循環器系疾患が主な研究対象となるが、健康寿命の延伸のためには、糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病の予防・治療に加え、認知症やサルコペニア、運動器症候群 (ロコモティブシンドローム) などに対する改善策が求められる。これまでの研究により、認知症に対する抑肝散や釣藤散、サルコペニアに対するニクジュヨウなど、生薬、漢方薬に、これらの疾患に対する治療効果が見出されている。これらの天然薬物は、開発コストが低い分、化学合成医薬品よりも薬価が低い場合が多いことから、国民医療費の抑制効果も高く、今後、更なる利用促進が望まれる。その一方で、天然薬物は、基原植物や品種、栽培/野生の別、産地の違いなどにより、含有成分の量や組成が異なる場合が多い。このため、各疾患の治療に適した品質 (成分組成) のものを選択することが天然薬物を用いた治療の最適化につながる。

このような背景から、本研究では、高齢者疾患の治療に用いられる生薬の遺伝子型、成分組成を網羅的に解析し、各疾患に適した品質の生薬を継続的に供給するための基礎的知見を収集、蓄積することを目的とした。

対象生薬としては、ボウフウ、ニクジュヨウ及びカノコソウを取り上げ、ボウフウについては、モンゴル産の試料について、HPLC-DAD 法による指標成分の定量分析を行い、各産地由来の試料との比較分析を行った。ニクジュヨウについては、塩基配列解析による基原種鑑別の検討を、カノコソウについては、産地別試料及び類縁植物の GC/MS メタボロームによる精油プロファイルの解析を行った。

## ■結果・考察

### 1. ボウフウ

ボウフウは、JP17 においてセリ科植物である *Saposhnikovia divaricata* の根及び根茎と規定されている。先行研究において、モンゴルにて採集した *S. divaricata* の根及び根茎について LC/MS によるメタボローム解析を行ったところ、中国産ボウフウと類似する成分プロファイルを示したことから、モンゴル産 *S. divaricata* の根及び根茎は新たなボウフウの資源となることが期待された<sup>1)</sup>。一方で、採集地によりクロモン類の含量及び組成の変動が認められ、クロモン類は地域差を判別するマーカー化合物として利用できる可能性が示唆された。本研究では、これまでの研究で未達成であったモンゴル産ボウフウのクロモン成分 9 種及びクマリン成分 4 種の HPLC-DAD 法による定量分析法の確立を行った。その結果、prim-O-glucosylcimifugin (**1**) 及び 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisamminol (**2**)は、すべてのモンゴル産試料において存在することがわかった。**2** は JP17 において確認試験の指標成分であることから、試験したモンゴル産試料は JP17 の規定を満たしていた。また、**1** 及び **2** の総含量は 0.49-2.50% であり、中国薬典の下限值 0.24% を上回っていたことから、中国薬典の規定も満たしていることがわかった。このことからモンゴル産の *S. divaricata* はボウフウの資源として有用であることがわかった。特に、北東部の Norovlin と Bayan-Uul 産においては **1** 及び **2** の含量が高く、ボウフウの栽培地として期待された。

## 種目 (特定研究)

次に HPLC クロマトグラムのピーク面積に基づく地域間の成分の違いを多変量解析により検討した。7 地域にて採集した 39 試料について解析した結果、クロモン類の含量は地域間差に大きく寄与することが判明した。研究の過程で見出した未同定のマーカー化合物については、単離精製及び NMR などの機器分析による構造解析を行い、新規のマロニル化 *hamaudol* 配糖体であることがわかった。続いて、モンゴル産の 24 試料を選択し、<sup>1</sup>H NMR 法による成分プロファイリングについても検討を行った。すでに単離しているクロモン類及びクマリン類、シヨ糖、*panaxynol* の <sup>1</sup>H NMR スペクトルと、モンゴル産 *S. divaricata* の 70% メタノール抽出物を比較し、抽出物に含まれるこれら化合物シグナルを帰属した。1 及び 2 などのジヒドロピラノクロモン類に由来するシグナルは、他の化合物のシグナルとの重複が少なく比較的明瞭に観測されたことから、NMR 法による定量が可能であることが示唆された。また、中国産のものと比較してモンゴル産の試料は、シヨ糖のシグナルが低いことがわかった。

## 2. ニクジュヨウ

ニクジュヨウは、JP17 において、ハマウツボ科に属する寄生植物、*Cistanche salsa* G. Beck, *C. deserticola* Y. C. Ma, *C. tubulosa* Wight の肉質茎と規定されており、各基原植物により成分プロファイルが異なることが知られている。ニクジュヨウの基原植物の遺伝子鑑別については、葉緑体 DNA の *rps2* 遺伝子及び *rpl16-rpl14* 遺伝子間領域の塩基配列解析による鑑別が報告されている<sup>2)</sup>が、*C. salsa* と *C. deserticola* については、共通の遺伝子型が見出されるなど、分子系統解析について未解決な部分がある。その要因として、1) 葉緑体 DNA が母系遺伝であるため、雑種を検出できていないこと、2) *Cistanche* 属は寄生植物であるため、光合成を行っておらず、葉緑体 DNA 上の遺伝子が機能していないことによる変異速度の著しい変化及び遺伝子の消失、3) 宿主植物由来遺伝子の水平伝播による取り込みが考えられる (2), 3) は、既に *C. deserticola* の葉緑体ゲノムの解析により示唆されている<sup>3)</sup>。このため、本研究では、核 DNA の ITS2 領域の塩基配列による分子系統解析を行った。本領域は、植物の DNA バーコーディングにおいて、葉緑体ゲノムの *psbA-trnH* 遺伝子間領域の補完目的での使用が推奨されている。

ニクジュヨウ試料は、Tomari ら<sup>2)</sup>の先行研究に用いられた 25 検体を譲り受け使用した。その内訳は、*C. salsa*, 8 検体；*C. deserticola*, 10 検体；*C. tubulosa*, 4 検体；*C. sinensis*, 3 検体で、採集地は、中国、19 検体；カザフスタン、4 検体；トルコ及びパキスタン、各 1 検体である。これまでに得られている 11 検体の塩基配列から分子系統樹を作成したところ、Tomari らの報告と同様に、*C. tubulosa* 及び *C. sinensis* は、*C. salsa* 及び *C. deserticola* の配列と明確に区別された。また、*C. salsa* と *C. deserticola* は、複数のクレードに跨って分類された。内モンゴル自治区産の *C. deserticola* 1 検体 (CH-1) 及び寧夏回族自治区産の *C. salsa* 1 検体 (CH-15) では 2 種の配列の混合物と推定されたことから、サブクローニングによりそれぞれの配列に分離した上で解析を行った。その結果、CH-15 の 2 つの配列は、別々のクレードに分類され、一方は、同じ寧夏回族自治区産の *C. salsa* である CH-16, 17 の配列と一致した。他方は、トルコ由来の *C. salsa* である CH-24 と同じクレードに分類され、さらに Blast search による相同性検索では、*C. redgiwayana* の配列 10 種と最も高い相同性 (98.2-99.6%) を示し、*C. salsa* の配列とは、最も高いものでも 95.0% の相同性にとどまった。*C. salsa* 及び *C. deserticola* 由来の配列は、複数のクレードに分布しており、また、CH-24 の配列と同じクレードに分布していることから、直ちに *C. salsa* であることを否定することはできないが、雑種の可能性も含めて、今後、慎重に検討が必要である。また、カザフスタン産の *C. deserticola* 3 検体 (CH-8-10) は、ダイレクトシーケンシング上、同一のパターンを示し、2 種の配列の混合物と推定されている。今後、これらのサブクローニングも含めて、未解析の試料の解析を進める予定である。また、LC/MS による成分プロファイリングと多変量解析を行う予定である。

## 3. カノコソウ

カノコソウは、JP17 において、カノコソウ *Valeriana fauriei* Briquet の根及び根茎と規定されている。本生薬は、元々、JP1~JP3 に収載されていた欧州産カノコソウ (ワレリアナ根；*V. officinalis* L.) の代用または併用できる本邦産生薬の収載方針に基づき、JP2 より収載されており、JP2~JP8 までは、*V. officinalis* L. var. *latifolia* Miquel を基原植物学名として記載しているが、植物分類学上の扱いの変化に伴い、JP9 以降、現在の *V. fauriei* が学名として採用されている<sup>4)</sup>。カノコソウには、これまで、いくつかの品種が栽培されてきており、以前、盛んに栽培されたカメバキソウや、現在の市場品の主流であるホッカイキソウがある。ホッカイキソウは、さらにボタン、タコの 2 品種がある<sup>5)</sup>。これらは、精油量及びセスキテルペンの組成が異なることが知られており<sup>6)</sup>、また、近年では、需要の高まりに伴い、中国産も使用されている。本研究では、これらの試料について、遺伝子型と成分型の相関を探り、より薬用価値の高いものを、再現性よく供給するための基盤整備を行う。

## 種目 (特定研究)

試料には、各生薬メーカーより分与されたカノコソウ市場品, 19 検体; セイヨウカノコソウ市場品, 2 検体; 蜘蛛香 (*V. jatamansii*), 3 検体; *Valeriana* 属の不明種, 1 検体の計 24 検体を用いた。このものについて、ジクロロメタンエキスを調製し、GC/MS 分析を行った。日本産及び中国産カノコソウは、保持時間、約 7.9 分に、*bomyl acetate* のピークを検出した他、12.7 分 (日本産) 及び 11.7 分 (中国産) に、セスキテルペンのもので推定される大きなピークを検出した。また、中国産カノコソウの中には、ピークの乏しい試料があった。セイヨウカノコソウ及び蜘蛛香は、いずれも分量に乏しかった。7.9 分以前及び 11.7 分以降のピークを除き、8.0-11.5 分の範囲のデータを用いて主成分分析 (PCA) 及び階層的クラスター分析 (HCA) を行った結果、大きく 3 つのグループに分離し、それぞれのグループには、1) 日本産カノコソウ, 2) 中国産カノコソウ, 3) ピークの乏しい中国産カノコソウ試料, セイヨウカノコソウ, 蜘蛛香の試料が帰属された。また、日本産カノコソウは、さらに、2 つのグループに分かれた。この分離に寄与しているピークは、ローディングプロットから、10.5 分及び 11.3 分のピークと推定され、これらのピーク強度が高いものは、いずれも北海道産であった。また、中国産を特徴付けている成分も、11.3 分のピークと推定された。なお、日本産と中国産の 11.3 分のピークは、そのマススペクトルから、別成分であることが確認された。今後は、これらの試料の遺伝子解析を行い、種 (品種) と成分型との相関を調べる。また、国内産カノコソウでは、北海道産が本州産と異なる成分組成を示していることから、検体数を増やし、この点についても継続検討する。

## ■ 結論

ボウフウについては、HPLC-DAD 法による 13 成分の定量法を確立し、モンゴル産 *S. divaricata* の根及び根茎について解析を行った。その結果 **1** 及び **2** はすべての試料において検出され、JP17 及び中国薬典の規格を満たしていることがわかった。多変量解析により地域差を検討したところ、クロモン類の含量は地域間差に大きく寄与することがわかった。特にモンゴルの北東部において **1** 及び **2** の含量は高いことがわかり、栽培地として期待された。

ニクジュヨウでは、核ゲノム上の配列解析を行うことにより、複数の遺伝子型からなる個体が多数存在することを見出した。また、*C. deserticola* 及び *C. salsa* は複数のクレードに分かれ、どちらも、少なくとも 2 系統の遺伝子型が存在すると推定された。今後、未解析試料の結果及び成分情報と合わせることで、ニクジュヨウの品質多様性の要因が明らかになると期待される。

カノコソウについては、GC/MS メタボローム解析により、日本産と中国産カノコソウ市場品の成分多様性が確認された。これらの違いと、カメバキソウ、ホッカイキソウなど、各品種間の違いが相関するののかも含め、検体数を増やし、検討を継続する。また、塩基配列解析により、各品種を鑑別可能な遺伝子領域を探索する。

## 参考文献

- 1) Z. Batsukh *et al.*, *J. Nat. Med.*, **74**, 170-188 (2020).
- 2) N. Tomari *et al.*, *Nat. Med.*, **57**, 233-237 (2003).
- 3) X. Li *et al.*, *PLOS One*, **8**, e58747 (2013).
- 4) K. Yanagisawa, *薬史学雑誌*, **48**, 63-74 (2013).
- 5) The committee of Japanese Pharmacopoeia Guide Book, ed., "The Guide Book of Japanese Pharmacopoeia 14<sup>th</sup> Ed.", p. D208-210.
- 6) M. Takeuchi *et al.*, *Nat. Med.*, **55**, 225-230 (2001).