

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
所外共同研究者	南 基泰	中部大学 応用生物学部	教授
研究統括者	小松 かつ子	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	教授
所内共同研究者	當銘 一文	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	准教授
所内共同研究者	朱 姝	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	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。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、化学合成医薬品よりも薬価が低い場合が多いため、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た。このうち、ボウフウについては、昨年度までに、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結果、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を明らかにし、検討を終了した。ニクジュヨウについては、昨年度に引き続き、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、昨年度に明らかになった各産地の精油型について、主成分を単離し、同定した。また、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域の塩基配列に基づく基原種鑑別を行うとともに、精油型と遺伝子型の相関性を調査した。

■結果・考察

1. 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

種目 (特定研究)

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¹⁾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²⁾。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ている。今年度は、昨年度に引き続き、ITS2 領域の配列解析を継続した。

ニクジュヨウ試料は、Tomari ら¹⁾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 14 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、種別ではなく産地別にクレードを形成する点も、Tomari らの報告と一致した。内モンゴル自治区産の *C. deserticola* 1 検体 (CH-1)、カザフスタン産の *C. deserticola* 3 検体 (CH-8, 9, 10) 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. ridgewayana* 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% の相同性とどまった。*C. ridgewayana* は、主に中東地域に分布する種であり、トルコ由来の *C. salsa* に近い配列を示したことは、産地別にクレードを形成する傾向を支持するが、一方で、同種は、中国に分布しないこと、また、*C. salsa* と混同されることがある種であることから、本結果の解釈は、成分情報や他の試料の結果と併せて、慎重に検討が必要である。

CH-8, 9, 10 は、互いによく似た 2 つの遺伝子型からなり、マイナーな配列は、CH-7 の配列と一致した。Tomari らの葉緑体 DNA 領域での検討においても、CH-7 と CH-8, 9, 10 は、2 つの遺伝子型が認められており、その結果と一致する結果と解釈された。

以上のことから、ニクジュヨウの基原種は寄生植物であるものの、葉緑体 DNA の遺伝子領域による遺伝子鑑別結果は、核ゲノム上の塩基配列である ITS2 を対象としたものと、特に変わらない結果であることが明らかになった。

系統樹上、種としての近縁関係よりも産地の類似性の方が優位に作用する要因については、なお、不明である。近年、次世代シーケンサーを使用した分子系統解析手法として、MIG-Seq 法が考案され、多くの報告がなされている³⁾。特定の遺伝子領域を用いた系統解析は、終了したことから、今後、MIG-Seq 法を用いたゲノム全体を対象とした解析を行い、これまでの知見と比較することが、上記の要因の解明の一助となりうる。また、成分分析結果と統合することで、各基原植物で認められる成分多様性の理解に繋がることが期待される。

既報⁴⁾の成分分析法では、ニクジュヨウの粉末を 50%メタノールで振とう抽出し、減圧乾固した後、溶媒に再溶解し HPLC 解析を行っている。より簡便な分析法の確立を目指し、50%メタノールで超音波抽出したものを直接分析することを試みた。その結果、抽出後の遠心分離が 1 回の場合、カラムの目詰まりが確認されたが、遠心分離を 2 回行ったところ、目詰まりすることなく分析が可能であった。この手法を用いて各種 1 検体及び *C. tubulosa* 由来の市場品について LC/MS 解析を行ったところ、6 種の主要なフェニルエタノイド類が検出され、基原により成分パターンが異なることが確認された。また、骨格筋機能改善作用が報告されている echinacoside と verbascoside (=acteoside)⁵⁾は、*C. tubulosa* 及び *C. salsa* において含量が高いことが示唆された。今後、検体数を増やし、主要化合物の定量分析を行い、遺伝子鑑別による基原植物の違い及び産地の違いと、成分パターンの多様性との関連について解析を進める予定である。

種目 (特定研究)

2. 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 に記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 より記載されており、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⁶⁾。カノコソウには、これまで、いくつかの品種が栽培されており、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⁷⁾。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⁸⁾、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った。

各生薬メーカーより分与されたカノコソウ市場品、38 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、カメバキソウ由来カノコソウ 1 検体の計 45 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 分析を行い、多変量解析を行った結果、5 つの精油型が見出された。1) **J₁ 型**及び2) **J₂ 型**: どちらも保持時間、約 7.9 分に、bornyl acetate (BA)、12.7 分に kessyl glycol diacetate (KGD) のピークを認めたが、9.7 分、10.5 分の未同定ピークが、J₁ 型では、顕著に大きかった。日本産のカノコソウ市場品は、いずれもどちらかの精油型を示した。3) **K 型**: BA のピークを認める点は、J₁, J₂ 型と共通するが、KGD のピークをほとんど認めず、代わりに、kessyl acetate (KA) のピークを主ピークとして認めた。カメバキソウ由来のカノコソウがこのタイプに分類された。4) **C 型**: BA のピークを認める点は、日本産のものと共通するが、KGD, KA のピークを認めず、主ピークは、1-O-acetyl-2, 10-bisaboladiene-1, 6-diol であった。中国及び韓国産のカノコソウ市場品が、この精油型を示した。5) **O 型**: テルペノイド類を分析する今回の分析条件では、ほとんどピークを認めなかった。セイヨウカノコソウ及び蜘蛛香が、このタイプに分類された。

次に、塩基配列解析により、これらの試料の基原種鑑別を行った。*Valeriana* 属植物の遺伝子鑑別については、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域を利用した Minami らの先行研究⁹⁾があり、それによれば、*V. fauriei* は、同領域において AH-1～AH-5 の 5 つの遺伝子型を持ち、国産 (AH-1～AH-4) と中国産 (AH-5) も区別される。J₁, J₂, C, K 型の成分型を示した試料の同領域の塩基配列解析を行ったところ、AH-1, 2, 5 の配列を示し、いずれも *V. fauriei* と同定された (解析不能 4 検体)。さらに、精油成分型と遺伝子型には、相関性が認められた。すなわち、J₁ 型の成分組成を持つ 11 検体は、解析不能だった 2 検体を除き、全て AH-1 の遺伝子型であった。また、J₂ 型の成分組成を持つ 20 検体は、解析不能だった 2 検体を除き、全て AH-2 の遺伝子型であった。さらに、C 型の成分組成を持つ 5 検体では、韓国産の 1 検体が AH-3 の遺伝子型であったことを除き、全て AH-5 の遺伝子型であった。一方、K 型の成分組成を持つカメバキソウは、AH-1 の遺伝子型を示し、上記の相関性とは逸脱していた。以上の結果から、現在のカノコソウ市場品の主流であるホッカイキソウにおける J₁, J₂ 型の違いは、産地等の環境要因ではなく、遺伝的背景の違いに起因していると推定された。

カノコソウは、前述の通り、漢方処方用薬ではなく、主に鎮静作用を目的に、種々の生薬製剤に配合される生薬である。先行研究では、バルビツレート誘導睡眠に対する延長作用やロコモーターアッセイによる自発運動量の変化を指標にしたカノコソウ類の鎮静作用の評価が行われている。Takamura ら¹⁰⁾は、北海道産、中国産、欧州産の吉草根 (基原植物は、いずれも未記載) に対して、上記の睡眠延長作用を調べた結果、北海道産 > 中国産 > 欧州産の順で強い活性を示し、北海道産の活性成分として KGD を同定している。また、Yoshitomi ら¹¹⁾は、カメバキソウとホッカイキソウについて、上記 2 種の試験を行い、睡眠延長作用は、ホッカイキソウがやや強く、自発運動抑制作用は、ほぼ同等であったと報告している。

種目（特定研究）

本研究で、成分型が明らかになった各種のカノコソウについて、同様の比較を行うことにより、各成分型、特にC型の成分組成を持つカノコソウの薬用価値を明らかにすることで、適切な薬用資源管理に繋がると期待される。

■結論

ニクジュヨウについては、昨年度に引き続き、核 rDNA の ITS2 配列の解析を行うとともに、複数の配列の混合物と推定された試料について、サブクローニングにより、個別の配列を解析し、葉緑体 DNA の遺伝子領域による系統解析と齟齬がないことを確認した。今後、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、昨年度に実施した GC/MS 分析で明らかになった各精油成分型について、主ピークを単離し、NMR 及び LC/MS の情報に基づき、同定した。また、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域の塩基配列解析を行い、中国産の市場品も国内のものとは異なる遺伝子型を持つ *V. fauriei* であることを確認した。また、同配列と精油成分型には相関性が見出されたことから、精油成分の多様性は、環境要因より遺伝的背景の違いの寄与が大きいと推測された。

以上、遺伝子解析と成分情報を組み合わせた解析を行うことにより、品質に影響を与える因子を理解するための基礎的知見を得た。

参考文献

- 1) N. Tomari *et al.*, *Nat. Med.*, **57**, 233-237 (2003).
- 2) X. Li *et al.*, *PLOS One*, **8**, e58747 (2013).
- 3) Y. Suyama *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 16963 (2015).
- 4) 花岡信義ら, *生薬学雑誌*, **69**, 1-9 (2015).
- 5) A. Kodani *et al.*, *J. Neurotrauma*, **36**, 1935-1948 (2019).
- 6) K. Yanagisawa, *薬史学雑誌*, **48**, 63-74 (2013).
- 7) The committee of Japanese Pharmacopoeia Guide Book, ed., “The Guide Book of Japanese Pharmacopoeia 14th Ed.”, p. D208-210.
- 8) M. Takeuchi *et al.*, *Nat. Med.*, **55**, 225-230 (2001).
- 9) T. Fujii *et al.*, *J. Nat. Med.*, *in press* (2021).
- 10) K. Takamura *et al.*, *Yakugaku Zasshi*, **93**, 599-606 (1973).
- 11) S. Yoshitomi *et al.*, *Nat. Med.*, **54**, 55-60 (2000).