

植物性医薬品開発のための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	主任研究官
所外共同研究者	政田 さやか	国立医薬品食品衛生研究所	生薬部	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
研究統括者	當銘 一文	富山大学和漢医薬学総合研究所	薬用資源管理部門	准教授
所内共同研究者	小松 かつ子	富山大学和漢医薬学総合研究所	神経機能学領域	研究員

■背景・目的

天然物医薬品は、天然由来であるがゆえに、含有成分の組成、含量にバラツキが生じ、品質を一定に保つことが難しいという不安定な要素を持っている。生薬の品質に大きな影響を与える因子としては、原料植物の遺伝的背景の違い、栽培／野生の別、産地などの生育条件の違い、加工調製法の違いなどが挙げられる。このため、天然物医薬品の開発には、薬効成分の同定や臨床研究の他に、上記の因子を理解し、効果的なレギュレーションを課すことにより、一定した成分組成、量を有する生薬を確保することが重要である。

本研究では、検討対象品目として、ニクジュヨウ、バクモンドウ及びショウブコンを選択し、これらの生薬について、遺伝的多様性と LC/MS, GC/MS 分析の結果を結び付けた解析を実施し、各標的疾患に適した、あるいは、安全性の高い成分組成を持つ生薬資源の探索、特定を目指した。

■結果・考察

ニクジュヨウ（肉蓯蓉）は、古来、腎陽を補い、精血を増し、腸を潤し、便を通ずるなどの効能で応用されており、神農本草経の上品に収載されてきた。日本薬局方¹においてその基原は、ハマウツボ科（Orobanchaceae）の *Cistanche salsa* (C. A. Meyer) G. Beck, *C. deserticola* Y. C. Ma, 又は *C. tubulosa* (Schrenk) Wight の肉質茎であると規定されている。これらの内、*C. deserticola* 及び *C. tubulosa* は中華人民共和国薬典²にも基原として規定されている。東田らは、ニクジュヨウに含まれる acteoside (= verbascoside) が骨格筋機能改善作用をもつこと、さらに本化合物の投与により、骨格筋から pyruvate kinase M2 (PKM2) が分泌され、中枢神経系へ移行し軸索伸展促進作用と骨格筋増加作用を示すことを明らかにしている³。さらに、acteoside にグルコースが1分子追加された echinacoside についても活性化化合物である可能性を検討している。本研究では、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにし、それらに含まれる2つの活性化化合物及びそれらの関連化合物の含量を調べることを目的とした。昨年度までにニクジュヨウ抽出物に含まれる成分の¹H NMRによる定量法（qHNMR法）及び、HPLCによる定量法の開発を行っており、今年度は、これらを応用しニクジュヨウ抽出物に含まれる acteoside 関連化合物の定量を行った。

Cistanche 属肉質茎の80%メタノール抽出物について、ODSカラムを用いたHPLC法で echinacoside, acteoside, tubuloside A, isoacteoside の定量を行った。その結果、echinacoside の含量が最も高く、次いで acteoside, tubuloside A, isoacteoside の順であった。これら成分の含量は、サンプルにより大きくばらついており、基原や産地の違いより、個体差による影響が大きいことがわかった。個体差が大きい

種目（特定研究）

原因として、サンプリングを行った際の部位が統一できていなかった可能性が考えられた。今後は、複数の検体を用いて、肉質茎全体を細かく分けてサンプリングし、それぞれの抽出物の成分含量を定量することで、部位による含量の違いを検討したい。

昨年度の検討で、ニクジュヨウの代表的な成分である echinacoside, acteoside, isoacteoside の qHNMR 法による定量法を開発しており、今回本法を適用した定量を行った。echinacoside, acteoside の定量に用いるシグナルとして caffeic acid ユニットの 7 位のプロトンに由来するシグナル (δ_{H7} 7.9 ppm) を用いた。化学構造の類似性から、定量に用いたシグナルは両化合物で近いケミカルシフト値を示すことから区別が難しく、両者を合わせた量として定量を行った。qHNMR では、含量はモル濃度として算出されるため、得られた両化合物を合わせたモル濃度を acteoside のモル濃度として換算し、acteoside 換算の濃度として算出した。qHNMR と HPLC での echinacoside, acteoside の定量結果を acteoside 換算の濃度として比較したところ、定量値は完全に一致しているわけではなかったが、定量値の大小の傾向および、およその定量値は一致しており、qHNMR による定量は HPLC と比較し、定量性は少し劣るものの、簡便に echinacoside, acteoside の含量を見積もることができると考えられた。また、いくつかの検体において、HPLC での定量結果より、qHNMR の定量値が大きいものが確認された。この原因として、echinacoside, acteoside と構造が類似しているフェニルエタノイド類の含量が高く、今回 qHNMR で定量対象としたシグナルと重なってしまったことが考えられ、その結果、qHNMR での定量値が高かったことが推測された。

今回の検討では、個体差が大きく、産地や基原による成分含量の違いを見出すことはできなかつた。今後は、検体数を増やし分析を進めるとともに、できるだけ個体差が出ないようなサンプリング法の確立に向けた検討を行い、優良なニクジュヨウの基原種及び産地を明らかにしたい。さらにその結果をもとに、高い有効性が期待できるニクジュヨウの品質に関する知見を蓄積し、高品質のニクジュヨウの選別及びその加工調製法の確立に応用したい。

2. バクモンドウ

バクモンドウは、日本薬局方収載生薬の 1 つであり、鎮咳目的に汎用される麦門冬湯など、多数の漢方処方用いられる重要生薬である。第 18 改正日本薬局方では、バクモンドウの基原をジャノヒゲ *Ophiopogon japonicus* の根の膨大部と規定しているが、原植物であるジャノヒゲには、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲなど、分類学者によっては、ジャノヒゲとは、別種あるいは変種として扱われる植物がある⁴。

これらの植物は、狭義のジャノヒゲとは、葉身の形状や地下茎の有無などに違いがあるが、薬用部位である根の膨大部の成分とこれらの狭義の分類との相関関係については、明らかにされていない。そこで本研究では、バクモンドウの品質標準化を目的に、同一条件で栽培されたジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲから調製したバクモンドウ及び国内市場品について、核 rDNA の internal transcribed spacer (ITS) 配列による基原種鑑別と LC/MS メタボロームによる成分組成解析を行った。

その結果、上記 3 系統は、いずれも ITS 配列に基づいて鑑別可能であり、現在の国内市場品は、ジャノヒゲを基原とすることが確認された。次に、各試料のメタノールエキスについて、LC-HRMS 分析を行い、得られたデータを主成分分析により比較した結果、ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ及びセッコウリュウノヒゲ由来のバクモンドウは、それぞれ、独自の成分パターンを持つものとして、3つのグループに分離した。一方、各社より購入したバクモンドウ市場品は、ジャノヒゲを基原とするにも関わらず、セッコウリュウノヒゲに近い成分組成を示した。

これらの結果から、ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲは、独自の遺伝子配列、成分組成を示すことが判明した。また、このことから、含有成分組成には、遺伝的背景の違いが寄与するものと推定された。一方で、国内市場品との成分比較の結果から、その寄与の程度は、それほど大きくないと考えられた。従って、成分組成の面からは、日局が規定するジャノヒゲ *O. japonicus* は、広義の意味として、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲを含むものと考えて問題ないものと考えられた。

種目 (特定研究)

続いて、それぞれのグループの分離に寄与する成分、すなわち、各グループを特徴付けている成分の推定を行った。Negative ion mode, positive ion mode のデータの主成分分析におけるローディングプロットを基に、各グループの分離に寄与していると推定された変数の精密質量値から推定された化合物は、以下の通りである。

ジャノヒゲ: ophiopogonin A, B, C'

ナガバジャノヒゲ: spirost-5-ene-1,3-diol glycoside, ophiojaponin E, borneol 7-O-glycoside, ophiopogonone E

セッコウリュウノヒゲ: ophiopogonin A, P, Q, ophiopogonin D, H, ophiofurospiside F

上記の化合物のうち、borneol 7-O-glycoside は、モノテルペン配糖体、ophiopogonone E は、ホモイソフラボンであり、その他は、全てステロイドサポニン類である。Ophiopogon 属植物の主二次代謝成分には、ステロイドサポニン類の他に、ホモイソフラボン類があるが、今回の主成分分析では、成分パターンの違いに寄与する化合物として、主にステロイドサポニン類が検出され、ホモイソフラボン類については、ナガバジャノヒゲにおいて、2化合物が検出されるのみであった。その背景として、ステロイドサポニン類とホモイソフラボン類の含量差があることが疑われた。そこで、今回の研究に使用した試料のメタノールエキスを調製し、混合物のまま ¹H-NMR スペクトルを測定した結果、ステロイドサポニン類に由来するメチレン水素のシグナルに比べて、ホモイソフラボン類に由来する芳香族水素のシグナルはわずかであった。このことから、全データを用いた主成分分析では、量的に多いステロイドサポニンの寄与が大きく見積もられたため、各グループの特徴成分として優位に検出されたものと推定された。

そこで次に、検索条件を変更し、分類に寄与するホモイソフラボン類の探索を行った。Ophiopogon 属植物から報告されているホモイソフラボン類の分子量は、大きいものでも 450 程度であり、分子量 600 を超えるステロイドサポニン類とは差があることから、この差を利用し、主成分分析に利用する LC/MS データから、質量数 450 を超えるものを削除して解析を行った。その結果、ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲの各グループに分離する点は、全データによる主成分分析の結果と変わらなかったが、ステロイドサポニン類の影響を排除した解析では、市場品も独立のグループを形成した。それぞれのグループの分離に寄与している成分をローディングプロットから推定した結果、以下に示す通り、多くのホモイソフラボン類が認められた。

ジャノヒゲ: ophiogonone F, ophiogonone C

ナガバジャノヒゲ: ophiogonone A, ophiopogonone E

セッコウリュウノヒゲ: ophiogonone C, 8-methylphiopogonone A

このことから、ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲは、ステロイドサポニン類だけでなく、ホモイソフラボン類の組成も異なっていることが明らかになった。

3. ショウブコン

ショウブコンは、ショウブ *Acorus calamus* の根茎を基原とする生薬であり、類似生薬であるセキショウコンとともに、一般用医薬品製造販売承認基準の胃腸薬基準に掲載されている。両者は、よく似た外観を有することから、しばしば誤用されるものの、ショウブコンには、公的規格がない。また、Sugimoto ら⁵は、ショウブコンに複数の精油型が存在することを報告している。そこで、本研究では、ショウブコンの品質標準化を目的に、ショウブコン及びセキショウコン市場品の遺伝子解析及び GC/MS 分析を行った。

昨年度、ショウブコン市場品 9 検体 (安徽省, 広西産, 各 3 ロット, 江西省, 浙江省, 湖北省産, 各 1 ロット), セキショウコン市場品 3 検体 (安徽省産 2 ロット及び四川省産) について、5S rDNA IGS 領域, 核 rDNA の ITS1 領域及び葉緑体 DNA の *psbA-trnH* IGS 領域の塩基配列解析を行い、5S rDNA IGS 領域及び ITS1 領域が、ショウブコン及びセキショウコンの鑑別に適していることを見出した。また、Sugimoto らは、国内で収集した *A. calamus* について、5S rDNA IGS 領域の塩基配列解析を行い、3つの遺伝子型に分かれることを報告しているが、本研究の試料においては、このうちの2つと、両者の混合物が認められた。

種目（特定研究）

同じ試料について、GC/MSによる精油成分の分析を行った。Sugimotoらの報告通り、ほぼアサロンのみからなる chemotype A、アサロンは僅かで、セスキテルペン類と推定される多数の成分を含む chemotype B、両者の中間型である chemotype M の全てが認められたが、それらに属さない chemotype として、アサロンとメチルオイゲノールと推定される成分（chemotype C とする）が、同程度含まれるものが検出された。一方、セキショウコン市場品は、全て chemotype A であった。

それぞれの精油型を持つショウブコン試料及びセキショウコンを用いて TLC 分析を行った結果、いずれの試料にも、アサロンに相当するスポットは認められるが、その他のスポットのパターンに若干の差異が認められた。今後、展開条件を変えて検討を行い、アサロンの他に特徴となるスポットを見出し、セキショウコンとの鑑別が可能な確認試験の設定を行う。

■結論

ニクジュヨウについては、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにすること、活性成分の定量を目的として、HPLC法、qHNMR法による検討を行い、フェニルエタノイド類の定量を行った。活性成分であるフェニルエタノイド類の高いサンプルの存在を確認した一方で、成分含量はサンプルにより大きくばらついており、基原や産地の違いより、個体差による影響が大きいことがわかった。本生薬については入手した材料ごとに成分含量をしっかりと評価する必要があると考えられた。

バクモンドウについては、広義のジャノヒゲに包含されるナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲとの含有成分比較を行った結果、狭義のジャノヒゲも含めて、それぞれ、独自の成分組成を示したが、ジャノヒゲを基原とする中国産の国内市場品は、セッコウリュウノヒゲに近い成分組成を示したことから、含有成分に対する遺伝的な背景の寄与は大きくないと推察された。また、日局が規定するバクモンドウの基原植物 *Ophiopogon japonicus* は、成分化学的な面からは、広義のジャノヒゲと捉えて問題ないと考えられた。

ショウブコンについても、精油成分組成に多様性が確認され、既報の情報との比較から、主産地である中国では、国内産のものよりも、多様性が大きいことが示唆された。毒性物質であるアサロンの含量が低い個体も見出されていることから、今後、アサロン含量の低い個体に特徴的な成分を指標とした確認試験を設定することで、より安全性の高いショウブコンの流通を促すことができると考えている。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 2021年. 第十八改正日本薬局方, pp. 2017-2018.
- 2) 国家薬典委員会編, 2015年. 中華人民共和国薬典 2015版, 第一部, p. 135, 中国医薬科技出版社, 北京.
- 3) Kodani A., Kikuchi T., Tohda C., *J. Neurotrauma.*, **36**, 1935-1948 (2019).
- 4) Fukuda T., *J. Jap. Bot.*, **94**, 306-317 (2019).
- 5) Sugimoto N., Kiuchi F., Mikage M., Mori M., Mizukami H., Tsuda Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 481-485 (1999).