

には、3つのサブテーマを「メタボリックプロファイリング技術の開発」の1つに収束させて、研究成果の実用化に向けた研究に取り組んだ。

(3) 研究成果

ここでは本プロジェクトの5年間で得られた企業化を考慮した研究成果についてのみ記述する。

サブテーマ1-1「吉野クズ」では、クズ蔓アルコール抽出物に骨吸収マーカーを低下させることを確認したことより、クズ蔓抽出物の成分の同定、作用メカニズムおよび分子生物学的研究を踏まえ、ヒトに対する効果を試験するためにクズ蔓を安価、安全な抽出溶剤として水を用いて抽出、乾燥し、安全性、変異原性試験を経てヒト介入試験を行った。また、クズ葉は速効性および遅効性抗酸化物を高含有していることから機能性食材としての可能性が期待される。サブテーマ1-2「大和マナ」では、大和マナの成分に抗炎症作用が認められたことから、マナの機能性成分の同定、作用メカニズム研究と共に市場流通性に問題のある外葉の黄化と形状の不揃い等を、自家不和合性遺伝子を利用して高機能性F₁ハイブリッド品種を作出した。テーマ2「大和生薬」では、大和生薬の当帰（トウキ）、芍薬（シャクヤク）は市場で高値取引されているが、その理由を科学的に明らかにすると共に大和生薬を識別するための鑑定技術の開発を行ったが、大和トウキのみを識別する遺伝子マーカーを見出すことができた。品質評価ではメタボリックプロファイリングの利用により、一定の成果を挙げることができた。さらに、当帰芍薬散料のトウキの地域の違いによる薬効の差を確認できた。今回の結果は今後の漢方製剤を構成する生薬の品質評価と配合生薬の品質による薬効に一石を投じる成果と考える。テーマ3「大和茶」では、煎茶の品質は熟練した鑑定人によって評価されるが、今回、コア技術であるメタボリックプロファイリング手法をヒトの五感を科学的に再現することができた。さらに、この技術を用いて茶の栽培、製茶に適用した茶の生産技術の開発に取り組み大きな成果を挙げた。

サブテーマ1-1「吉野クズの骨粗鬆症予防機能の評価及び栽培・食品への活用」

高齢化に伴い生活習慣病の予防は極めて重要な研究課題である。骨粗鬆症は高齢化に伴い多くのヒトに認められ、中でも女性の閉経後の更年期障害や骨粗鬆症の改善は国家レベルの社会医療問題である。高齢人口の増加率が男性で全国一位、女性で四位である奈良県では生活の質に大きな影響を与える骨粗鬆症の予防や軽減、特に薬でなく食品による予防が望まれる。この様な状況下で、奈良県特産の吉野クズはその根を葛澱粉、生薬としての葛根に利用されるが、地上部が未利用であるのに着目した。蔓のアルコール抽出物が用量依存的に骨吸収マーカーの低下を認めたため、ヒトへの骨粗鬆症の予防食品としての利用を考慮して、蔓水抽出物で以下に示す企業化を目指した研究結果を得ることができた。さらに葉に含まれる機能性成分についても企業化を考慮して得られた研究結果を記述した。

＜クズ蔓の抽出物の骨吸収抑制作用を確認＞

クズ蔓の水抽出物 [0.22 mg/日 (大豆イソフラボン1日摂取制限 30mg (アグリコン換算) 相当量)] を、骨粗鬆症モデルマウス (卵巣を摘出して女性ホルモン作用を抑えたマウス) に90日間投与したところ、骨基質が分解されて産出されるI型コラーゲンがさらに分解されて尿中に排出されるデオキシピリジノリン (DPD) 量の減少が認められ、骨粗鬆症の予防効果を確認した (DPDおよびNTXは有効な骨吸収マーカーとして用いられている)。

次に、CRO (Contract Research Organization) に委託して、クズ蔓水抽出物 [552mg/日 (大豆イソフラボン1日摂取制限 30mg (アグリコン換算) 相当量)] を3ヶ月間、30人規模のヒト介入試験を実施した結果、投与終了2週後に被検食品を摂取した群で、NTX値の改善的変動が示され、腕の橈骨の骨密度も投与終了後に有意に上昇していることが認められた。

安全性については、機能性試験と同時に実施した試験中および終了後の被験者の血液および尿の検査結果から、肝機能等の異常は診られなかった。

＜クズ葉に多様な機能性成分を確認＞

クズ葉100g中には、抗酸化物質であるβ-カロテン (22.1mg)、α-トコフェロール (19.6mg)、ルテイン (17.0mg) が多く含まれ、遅効性抗酸化作用を示すフテロカルパン類 (Phaseollidin等) も含まれていることを確認した。また、クズ葉の水抽出物が、血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) を阻害する効果を、ラビットアイブルーベリーの葉やダイズと同等以上有していることを確認し (IC₅₀=38 μg/ml)、その主成分がゲニステイン配糖体を含むイソフラボノイドの配糖体であることが分かった。

サブテーマ1-2 「大和マナの抗炎症機能等の評価及び栽培・食品への活用」

アブラナ科植物の「大和マナ」は、その生理作用が不明であったが、フェネチルイソシアネート (PEITC) が新規機能性物質として同定され、培養細胞系で優れた抗炎症作用を有することが見出された。また、流通過程で下葉の黄化しやすいことと形状に個体差があることが問題となっていた。そこで、アブラナ科植物が持つ自家不和合性遺伝子を利用した優良種苗の効率的な育種技術の開発し、以下に示すような優良新品種を世に出すことができた。さらに含有成分の機能性評価についても企業化を考慮しながら得られた研究結果について記述した。

＜自家不和合性遺伝子を利用した育種技術の開発＞

大和マナは、これまで各農家で集団栽培されてきたため、草丈や葉の形状などの表現型でのバラツキや下葉の黄化等に問題があり、均一な優良品種が強く求められていた。そこで、本プログラムで自家不和合性遺伝子 (S 遺伝子) を利用して効率的な F₁ ハイブリッド採種に取り組んだ。

まず最初に、大和マナの各個体の自家不和合性遺伝子の型を網羅的に解析した。次に、自殖により S 遺伝子をホモに持つ F₁ 採種用の親系統の作出に取り組んだ。同時に表現型や黄化の程度、成長の速度等にも着目しながら個体を選抜し、それらの関連遺伝子についてもホモ化を進めた。

この方法によって得られる親系統群は、S 遺伝子の型が判明しているため、事前に互いの交配の可否がわかっており、従来より早く有望な品種を育成することができる。この方法により、冬用品種の「冬なら菜」、夏用品種の「夏なら菜」の2品種の育種に成功した。

＜抗炎症機能の評価＞

大和マナの抽出物に、マクロファージ (白血球の1種) における炎症性サイトカイン (IL-1 β) 産生抑制作用があること、並びに作用物質の1つがフェネチルイソチオシアネート (PEITC) であることを見出したことが研究の発端となった。

PEITC の生理活性を調べたところ、骨の炎症 (関節リウマチ) について 2mg/kg マウスに腹腔内投与で炎症スコアを有意に低下させた。また、血管壁の炎症 (動脈硬化)、粘膜の炎症 (潰瘍性大腸炎)、全身性炎症 (敗血症) などについても細胞や病態モデル動物を使って検討した結果、抑制傾向を示した。

＜体重抑制機能及び脂質吸収抑制機能の評価＞

食餌誘導性肥満モデルマウスに、大和マナの含有成分であるフェネチルグルコシノレート (PEGLS) およびブテニルグルコシノレート (BUGLS) を長期間混餌投与すると、マウスの体重増加および脂肪の蓄積が抑制される傾向を示すことを見出した。さらに、BUGLS は脂質吸収抑制作用を示すことを見出した。また、大和マナの熱水抽出物の高濃度投与 (2000mg/kg、抽出物 2000mg は新鮮重 92.6g 相当) により、糖 (でんぷん) 負荷後 30 分経過時のマウスの血糖値を有意に抑制することを見出した。

テーマ2 「大和優良生薬の鑑定技術及び増殖技術の開発」

大和生薬はその品質が高く評価されている。そこで奈良産生薬を他地域産 (中国産等) との差別化を明らかにし、近い将来の我が国生薬市場の活性化を目指した。ここでは、具体的に、DNA 鑑定技術を利用して優良な大和生薬を簡便に識別する方法を開発した。また、メタボローム解析により優良大和品種に特徴的な代謝産物プロファイルを特定した。同時に、優良な大和品種の大量増殖技術を確立した。さらに、大和トウキの品質等級差における当帰芍薬散の薬効評価を実施した。それら大和生薬について、大和トウキの遺伝子鑑定技術、鑑定等級の品質評価技術、および大和シャクヤクの大量増殖技術の開発と奈良産と他地域産大和トウキを配合した当帰芍薬散の薬効評価について記述した。

＜大和トウキの遺伝子鑑定技術の開発＞

トウキは、日本薬局方では大和トウキと北海トウキが生薬基原植物として認められているが、効用に差違があることも知られている。そこで、多数の RAPD マーカーにより検討した結果、両者を識別可能な、より特異性の高い DNA マーカーを開発した。

また、トウキは乾燥したキザミの状態では流通しているので、乾燥根から高純度のゲノム DNA の抽出・精製法を検討したところ、市販のゲノム DNA 抽出キットとクロロホルム抽出法を組み合わせた改良法により、遺伝子増幅を効率よく行えるゲノム DNA を抽出することに成功した。

＜鑑定等級の品質評価技術の開発＞

生薬鑑定人 (マイスター) は、生薬の外観、味、匂いなどについて人間の五感を駆使して評価している。そこで、人間の官能評価に対して機器分析で対応すべく、味覚については液体可溶性成分を ¹H-NMR (核磁気共鳴装

置)、UPLC/TOF-MS (超高速液体クロマトグラフィー / 質量分析装置)、嗅覚については揮発性成分を測定する GC-TOF MS (ガスクロマトグラフィー質量分析装置) を用いて分析し、得られたデータをメタボリックプロファイリングすることで品質評価できる技術の開発を行った。

トウキでは、揮発性成分であるピラジンに着目し、その含有量から官能評価による鑑定等級の推定式を策定することに成功した。また、水抽出成分を¹H-NMR で糖、アミノ酸、有機酸などに帰属する化合物のシグナルについて網羅的に解析した結果、等級予測モデルが得られた。また、液体可溶性成分から生産地を推定できることも分かった。

シャクヤクでも、揮発性成分の含有量から等級を推定する鑑定式を策定できた。また、メタノール抽出成分について UPLC/TOF-MS で分析し解析することで、品質等級を予測するモデルを開発することができた。

<大和シャクヤクの大量増殖技術の開発>

大和シャクヤクは雄性不稔であるため種子ができず、これまでは株分けによる増殖法に頼ってきた。そこで、効率的な増殖方法として、休眠打破を利用した株分け増殖法を検討した。その結果、4℃、4週間の処理で休眠状態を打破できることがわかった。また、低温処理した根茎をココブロック、園芸用培養土、ロックウール等の支持体を用いて人工栽培すると、ココブロックで良好な生育を示し、栽培5ヶ月目でココブロックでは約3倍、ロックウールおよび園芸用培養土では約2倍程度肥大した。

<奈良県産大和トウキの薬効による評価>

奈良県産の大和トウキを配合した当帰芍薬散を、女性に服用して貰い、その効果を中国産の大和トウキを配合した当帰芍薬散と比較した。服用者に自覚症状の問診を行って、服用前後の症状を調べた結果、奈良県産の大和トウキを配合した当帰芍薬散を服用した人が、冷えやむくみ、月経痛に効果があることがわかった。

テーマ3 「大和茶のメタボリックプロファイリング手法による最適栽培加工技術の開発」

奈良県は、茶製造工場の大規模合理化が進んでいる全国有数の茶生産県である。茶品質は、栽培と収穫後製茶条件に左右される。そこで、まず茶製造技術の向上を目指した。一方、製品茶の品質が極めて多数の成分の相互作用に依存しているため、熟練者による官能試験に委ねられている。そこで、メタボリックプロファイリング※手法を用いてデジタル化された総合評価システムを構築し、茶の栽培・製茶に適応した茶の生産技術の開発に取り組んだ。ここでは、荒茶の品質評価技術および蒸熱工程の数値化技術の開発についての研究成果を記述した。

※分析装置によって分析して得られた結果を緑茶の持つ特徴、すなわち指紋として捉える手法をメタボリックフィンガープリントと呼んでいる。これらのデータに様々な多変量解析手法を用いて品質判定を再現しようとする一連の技術。

<大和茶の品質評価技術の開発>

緑茶(煎茶)の品質は熟練した鑑定人によって外観や内質を官能検査によって評価しているが、メタボリックプロファイリング手法を用いて茶品評会に出品された茶を測定し、人の五感による評価を再現することができた。本技術は、機器分析(GC-MS, NMR, LC-MS, GC-FID等)により、データを多変量解析することにより品質評価を確立した。

GC-MS法は糖、アミノ酸、有機酸等の親水性低分子代謝物、NMR法は主にカテキン類、LC-MSは疎水性、低沸点代謝物を主対象として測定し、いずれの手法においても、データを主成分分析、PLS法によって解析することで、熟練した品質鑑定人の評価とほぼ同等の鑑定結果を得る技術を確立した。

これらの分析手法は、煩雑な前処理や機器使用の熟練が求められるが、生産、流通現場での利用に適したFT-NIRを用いた品質解析手法を検討した。データ解析の困難さをPCA法、PLS解析等を組み合わせたソフトを開発し、予測モデルを作成した。

<大和茶の製茶工程適正化技術の開発>

緑茶(煎茶)の製造工程は全6~7工程で成り立っており、その中でも最も品質に影響を及ぼすとされるのが蒸熱工程である。緑茶(煎茶)の蒸熱工程は、網胴回転攪拌式蒸機という機械により行われ、茶葉の蒸熱程度は胴傾斜角度、胴回転数、攪拌軸回転数等多くの操作要因(パラメーター)により決定づけられる。生葉品質、特性が異なる茶葉を解析し、最適蒸熱条件(パラメーター)を提供することで、安定した品質の荒茶を生産することが可能となった。そこで、蒸熱時間だけが蒸熱程度を決定づけるベルトコンベア式試験用蒸機を用いて、蒸熱時間を操作変数とし、網胴回転攪拌式蒸機の操作変数(胴傾斜角)との相関見出し、PLS回帰予測モデルを構築した。