

研究成果

テーマ2：優良大和生薬品種の鑑定技術及び増殖技術の開発
 小テーマ2c：メタボリックプロファイリングの品質評価および生理活性化合物の探索とそれをマーカーに用いた品質評価

テームリーダー（所属、氏名、役職）：

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授 橋本 隆

研究従事者（所属、氏名、役職）：

（財）サントリー生物有機化学研究所 有機化学研究部 特任研究員 小村 啓

大阪大学大学院工学研究科 教授 福崎英一郎、准教授 馬場健史

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 准教授 小山智之

（財）奈良県中小企業支援センター 地域結集型共同研究コア研究室 室長 野本享資、

研究員 鷺田和人（H18.7～H22.10）、主任研究員 加藤 彰（H18.4～）、

研究員 武野カノクワン（H20.5～・大阪大学派遣）、技術員 二宮由佳（H18.5～）

研究の概要、新規性及び目標

①研究の概要

旧来、専門家による官能評価を中心としてなされてきた生薬の鑑定・等級評価において、新しい試みとして、より客観的な分析値による良否の評価が可能であることを検討することを目的とする。特に、トウキにおいては鑑定時に匂いを重視する点に着目し、トウキの揮発性成分の解析、更には各成分の分析値を基にした良否判定法の策定を行った。この結果を踏まえて、良否判定に寄与する成分の消長制御につながれば、ひいては良質トウキの生産方法への展開が可能になる。同様のアプローチをシャクヤクについても行った。一方、鑑定時に味覚により評価する点から、非揮発性成分についても、熱分解抽出GC/MS、LC/MS、FT-NMR、FT-NIRなどの分析データから、メタボリックプロファイリングによる品質予測システムの開発を行った。

また、大和シャクヤクについて抽出物の種々活性試験を行った結果、男性ホルモン調節活性物質を見出し、トウキについては優良トウキ商品製造に関係する指標成分の特定を行った。

②研究の独自性・新規性

このような薬効成分の明らかではない生薬の品質評価で、官能評価における生薬の匂いの評価を揮発性成分分析に置換える試みは、世界でも初めての例となる。

大和シャクヤクの活性成分を探索し、一定の成果が得られた。これまでに、シャクヤクのホルモン調節作用を示唆する結果が得られていたが、ホルモン調節物質を単離したのは初めてであり、関連の研究者にインパクトを与えた。また、日本薬局方に記載されているトウキの品質と、生理活性とその原因成分である(Z)-ligustilide含量の関係を示したのは、世界初である。

③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）

[フェーズⅠ]

当帰およびシャクヤクの良否判定基準となる揮発性成分の特定と、その成分による良否判定法の策定。大和シャクヤクに含有する成分の精査と種々の活性の評価。

[フェーズⅡ]

良否判定方法の検証および確立と、コア研への技術移行。大和シャクヤクのホルモン調節活性物質の解明および活性の評価。

研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）

トウキ及びシャクヤク双方について、生薬マイスターによって等級が鑑定されているサンプルを用いて、揮発性成分量による等級を判定する算定式を策定した。実際に鑑定された等級と、分析値から算出された等級の相関が十分に高い結果となった。トウキに関しては、指標となる揮発性成分の特徴から、収穫後処理工程、特に湯揉み及び熟成工程が重要で、この間にメイラード反応が急激に進行し、良好なトウキを与えることを明らかにした。以上、目標は十分達成された。

大和シャクヤクの活性成分の探索および評価については、ほぼ計画通りに実行できた。ただ、ホルモン調節活性物質を指標とした品質評価法を確立することはできなかった。

主な成果

具体的な成果内容：

- ・大和シャクヤクの活性成分を探索し、3種の新規物質3'-galloylpaeoniflorin、4'-galloylpaeoniflorin、4-galloylabiflorinを含む7種の男性ホルモン調節活性物質と女性ホルモン調節物質としてnaringeninを見出した。また、男性ホルモン調節活性物質については、構造活性相関についても検討を行い、コンフォメーションについても推定した。
- ・モルモット回腸におけるアセチルコリン誘導収縮における平滑筋弛緩に対する活性を、大和トウキの最上級品と低

級品のメタノール抽出物と比較した。その結果、最上級品は、低級品より低い活性を示すことが分かった。抽出物中に含まれる (Z) -ligustilideの含量をHPLC分析により定量した結果、最上級品質トウキ群の含量は、低級品質トウキ群より有意に低かった。(Z) -ligustilide標品を使用して、濃度と弛緩活性の関係を調べ、トウキ抽出物の活性より、ligustilide量を推定した結果、ligustilideが活性を担っている主成分であった。トウキ熱水抽出物中のligustilideを含む各種成分濃度とメタノール抽出物中の濃度に、相関が認められた。これらは、生薬中のligustilide含量が、煎じ調合される配合薬中のligustrilide含量を反映することを示している。これにより、トウキ品質の違いの一部はligustilide含量の違いとそこから派生する平滑筋弛緩活性に影響しうる事を明らかにした。

- ・大和トウキサンプルの熱分解抽出物の誘導体化物のGC/MS分析で得られたデータを標準化後、PCA解析ならびにPLS-DA解析に供した。栽培地域が最も分離に寄与した。大和トウキサンプルをLC/MS分析で得られたデータを標準化後、PCA解析に供した。栽培地域、栽培種によるクラス分類が可能であることが認められた。
- ・シャクヤク乾燥根から抽出した親水性代謝物をシリル化しGC-FIDならびにGC-TOF-MS分析に供した。アミノ酸、糖、有機酸類を中心とした代謝物が観測された。OSC-PLS予測モデルにより等級予測が可能であることを示した。粉碎し、凍結乾燥したシャクヤクサンプルをギ酸0.1%を含む80%メタノールで抽出し、フィルターろ過後、UPLC-TOF-MS分析に供した。ODSカラム、水-アセトニトリル系で分離条件を検討し、ESIポジティブ/ネガティブモードでイオン化条件を検討し、検出条件を得た。種々の大和シャクヤクサンプルをGC-FIDおよびUPLC-TOF-MSを用いたノンターゲット分析に供し、シャクヤク品質予測モデルを作成した。

特許件数：6件 論文数：8件 口頭発表件数：11件

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

薬効成分が明らかになっていない生薬の品質評価において、揮発成分による品質評価法自体、世界初の成果で今後の他の生薬への広い展開が期待できる。これまでシャクヤクのホルモン調節活性を示唆するデータが報告されていたが、ホルモン調節活性成分の報告はまったく無かった。本研究で明らかにしたシャクヤク由来の男性ホルモン調節活性物質の単離の報告は新規である (Washida K, Itoh Y, Iwashita T, Nomoto K, Chem. Pharm. Bull. 57 (9), 971-974, 2009)。

日本薬局方に記載されているトウキの品質と、生理活性とその原因成分である (Z) -ligustilide含量の関係を示したのは、世界で初めてである。

2 実用化に向けた波及効果

トウキの品質評価にピラジン類を用いる今回の成果は、トウキ生産における指標としても使用できることが示され、後処理工程におけるピラジン類の消長検討の結果、後工程での湯揉み、熟成が重要と判明されたことにより、今後のトウキ生産における重要な指標を提供したことになる。

漢方処方でのヒト試験ではないので、産業界への波及効果は少ないと思われる。しかし、対外的に大和シャクヤクの研究成果を精力的に発信したことによって、大和シャクヤクの知名度の向上には一部貢献できたものと考えている。

残された課題と対応方針について

大和シャクヤクと他のシャクヤクとの徹底的な比較が必要である。芍薬甘草湯などの単純な処方を用いて、動物試験などを行うことで、処方中での大和シャクヤクと他のシャクヤクの効果の違いを見出せる可能性がある。

トウキの品質差を説明するには、複合成分の相乗効果を考慮する必要がある。その観点の研究が、今後、望まれる。

	J S T負担分 (千円)								地域負担分 (千円)						合計
	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度	小計	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度	小計	
人件費	75	6,298	6,911	6,728	6,107	3,653	29,772	846	2,978	9,942	6,065	6,377	4,803	31,017	60,789
設備費	7,783	8,517	10,651	7,174	3,725	2,293	40,143	452	5,140	8,380	7,104	7,164	4,010	32,250	72,393
その他 研究費*	2,886	7,535	7,484	7,031	10,468	2,151	37,555	0	129	356	716	261	450	1,912	39,467
旅費	26	236	302	250	104	38	956	0	77	89	517	175	265	1,123	2,079
その他	9	803	991	962	940	953	4,658	0	518	1,462	679	570	31	3,260	7,918
小計	10,779	23,389	26,339	22,145	21,344	9,088	113,084	1,298	8,842	20,235	15,081	14,547	9,559	69,562	182,646

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T負担による設備：熱分析分解システム (フロンティア・ラボ社製PC制御ダブルショット・パロライザー PY-2020iD, フロンティア・ラボ社製マイクロジェット・クライオトラップ PY-1030E)、飛行時間型精密質量測定装置 (ウォータース社製LCT-Premier TYPE MB)

地域負担による設備：ガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析システム、フーリエ変換近赤外分光装置、フーリエ変換核磁気共鳴スペクトル装置、質量分析計、質量分析計付ガスクロマトグラフ、水素炎検出器付ガスクロマトグラフ、包括的二次元ガスクロマトグラフ