

令和元年6月6日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08302

研究課題名(和文) NMRメタボロミクスによる生薬原料の品質評価法確立

研究課題名(英文) Establishment of quality evaluation for natural medicines using NMR metabolomics.

研究代表者

鈴木 龍一郎 (Suzuki, Ryuichiro)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：20415201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の漢方薬による医療を継続させるためには、その原料である生薬の安定的供給が必要となる。そのためには生薬の品質を客観的に評価できる手法の確立が求められるため、本研究では、その手法の一つであるNMRメタボロミクスの有効性について検討した。その結果、モデル生薬として用いたカンゾウは、その種の違いを区別することが可能であり、ケイヒについては食用と局方品とを識別することが可能であった。それに対してシャクヤクは産地ごとに分類することができなかった。シャクヤクについては前処理の必要性が示唆された。本研究によって、NMRメタボロミクスは生薬の品質評価方法として有効であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国における漢方薬の原料である生薬は中国からの輸入に頼っているが、供給に懸念があることから生薬の国内栽培化が進められている。しかし、国内栽培するためには生薬の品質を評価する方法が必要である。本研究課題はその生薬の評価方法をNMRメタボロミクスという技術を応用して確立するものである。本課題で得られた成果は、将来の我が国における漢方薬による医療に貢献するものとなる。

研究成果の概要(英文)：To continue medical treatment with Kampo, stable supply of natural medicines is required. For that establishment of quality evaluation method for natural medicines is important. In this research I have considered the effectiveness of NMR metabolomics of natural medicines. As a result, Glycyrrhiza were discriminated according to their species using NMR metabolomics. And Cinnamomum were also grouped according to their use for food and medicine. On the other hand, Paeonia could not be categorized to their harvesting area. The necessity of preprocessing for NMR metabolomics was suggested on Paeonia. In this study, it was revealed that NMR metabolomics is useful for quality evaluation of natural medicines.

研究分野：天然物化学

キーワード：NMRメタボロミクス 生薬 品質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国で漢方薬に使用している生薬原料のほとんどは中国からの輸入に頼っているが(日本漢方生薬製剤協会(日漢協)生薬原料使用量等調査報告書(平成23年7月)より)、現在、生薬の乱獲や環境保全のために中国からの輸出に規制がかかっており、そのことが生薬の価格高騰の原因となっている。このような状況では医薬品である漢方製剤の安定供給に支障をきたす可能性が高く、また、生薬原料の価格高騰はそれらを扱う企業にも大きな負担となり、良識を欠く企業による生薬原料の品質低下や産地偽装、品質保証データの改竄などの問題まで生じかねない。このようなことから現在、我が国で使用している生薬原料の国内栽培化が検討されている。生薬原料を国内で栽培するためには、各生薬原料の栽培に適した土壌や気候の調査・選択、我が国の栽培に適した生薬品種への改良なども必要になってくるが、最も大切なことは現在良品として流通している生薬と同じ品質の生薬を栽培することである。現在流通している生薬原料のうち、日本薬局方に収載されている生薬は医薬品であるため、日本薬局方で定める試験によりその品質は規定、担保されている。しかしその試験法は生薬に含まれる1~2個の指標成分を確認するといったものであり、未だ明らかとなっていない成分を多数含む生薬の品質を確認する手法としては十分ではない。現在の生薬原料は中国におけるこれまでの長い歴史の中で栽培条件などの試行錯誤がなされ、栽培されている。しかし、今後、我が国で生薬を栽培する場合、土壌や気候、栽培方法が異なることから、これまで良品とされてきたものと同じ品質の生薬を栽培するためには、1~2個の含有成分に着目するのではなく、生薬成分全体を俯瞰できる方法で品質を評価する必要がある。生薬は薬である以上、良品な生薬とは確実に薬効を示すものであり、またその薬効はその生薬に含まれている成分によって左右されるため、生薬の本質はその生薬の含有成分によって決まると考えることができる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では生薬に含まれている未同定の成分も含め、含有成分全体に着目した方法で生薬の品質を規定することを試みた。実際には<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクス手法を用いて生薬に含まれる検出可能な成分すべてを対象に品質の良否、生薬の産地の違いを判断できるかを検証し、<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクス手法を用いた生薬原料の品質評価方法を確立することを目的とした。なお、申請者はこれまでに<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクス手法を用いて、生薬であるクジンの産地の違いを明らかにしてきた。この手法は他の生薬にも適用できると考えられるが、これまでに本手法を用いて他の生薬の品質評価を実施したことがない。そこで、本研究でクジン以外の生薬についても<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクスによる品質評価を実施し、本手法の有用性を確認し、将来、我が国で生薬原料を栽培した際にも使用できる方法として確立したいと考えている。

### 3. 研究の方法

本研究では生薬としてカンゾウ、ケイヒ、シャクヤクの3種について市場品を入手し、それらの基原の区別や産地の違いを<sup>1</sup>H-NMRメタボロミクス手法を用いて判別が可能か検討した。

カンゾウ3種(*Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*)をそれぞれ入手し、メタノールによる加熱還流抽出、及び熱水抽出を行い、それぞれ対応するエキスを調製した。つぎにそれらのエキスをODS担体を充てんしたカラム(Sep-Pak C18 cartridge, Waters)に負荷し、水、50%含水メタノールおよびメタノールによる溶出を行い、それぞれ対応する溶出画分を得た。次にそれらの溶出画分の溶媒留去を行い、減圧乾燥させたのち、いずれも10 mg/mLとなるようにdimethyl sulfoxide-*d*<sub>6</sub>に(D, 99.9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)溶解し、各サンプルについて<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定した。得られたスペクトルはAlice2 for metabolome(JEOL)に供し、0.00~14.00 ppmの範囲を0.04 ppmごとにバケット積分し、その積分値を主成分分析した。

一方、ケイヒについては生薬として用いられるもの(CINNAMOMI CORTEX)を8種(ベトナム産、中国産)および主として食品として用いられるものを4種(中国産、スリランカ産)入手し、カンゾウと同様にメタノールによる加熱還流抽出を行った。調製したそれらのメタノールエキスはロータリーエバポレータにより溶媒留去を行い、得られた残渣をdimethyl sulfoxide-*d*<sub>6</sub>に溶解し<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定に供した。得られた<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、Alice2 for metabolomeにてデータ処理し主成分分析(PCA)に供した。さらにバケット積分により得られた0.04 ppmごとの積分値は、JMP Pro13(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)にてクラスター解析に供した。

また、生薬シャクヤクPAEONIAE RADIX(ボタン科シャクヤク*Paeonia lactiflora*の根)についてもNMRメタボロミクス手法を用いて産地の判断ができるかの検討を実施した。国内で流通しているシャクヤク10種を入手した(日本産大和、日本産大潟、日本産北海道、中国産安徽省)。入手したシャクヤクをメタノールで加熱還流抽出し、メタノールエキスを調製した。メタノールエキスを10 mg/mLとなるようにdimethyl sulfoxide-*d*<sub>6</sub>に溶解し、<sup>1</sup>H-NMR測定に供した。取得した<sup>1</sup>H-NMRスペクトルはAlice2 for metabolome(JEOL)でバケット積分を行い、引き続きJMP pro 13(SAS)にて主成分分析を行った。

#### 4. 研究成果

カンゾウ 3 種 (*Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*) をメタノールで加熱還流抽出して得たメタノールエキスを固相抽出カラムに付し、50%メタノールで溶出した画分の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータを主成分分析したところ、score plot 上で *inflata* 種、*glabra* 種、*uralensis* 種それぞれにカテゴリズすることができた。そこで次に loading plot を解析したところ、*inflata* 種に特徴的な <sup>1</sup>H-NMR シグナルは 5.30 ppm であり、*uralensis* 種に特徴的なシグナルは 7.02 ppm であった。一方、*glabra* 種に特徴的なシグナルは 6.74 と 7.30 ppm であった。ところでこれまでの検討から、*inflata* 種には licochalcone A が、*uralensis* 種には glycycomarin が、また、*glabra* 種には glabridin が得意的な成分として知られている。そこで今回の loading plot から明らかとなった <sup>1</sup>H-NMR シグナルがこれら既知の種特徴的な成分に由来するか確認したところ、いずれの <sup>1</sup>H-NMR シグナルもこれらには対応していなかった。このことから、NMR メタボロミクスではこれまでとは異なる別の成分によって種の区別がなされていることが明らかとなった。ところでカンゾウにはグリチルリチン酸をはじめとする種々のサポニンが含まれていることが知られているが、これらサポニンがそれぞれの種 (*Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*) の判別に寄与するかの検討を行った。カンゾウを水で抽出し調製した水エキスをメタノールと同様に固相抽出に供し、サポニンを高含量含むフラクションを調製した。そのサポニンフラクションの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し、主成分分析に供したところ、score plot 上でそれぞれの種に応じてカテゴリズすることが可能であった。

ケイヒに関して、調製したメタノールエキスの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを主成分分析した結果、score plot 上で主として食品に用いられるものと生薬ケイヒとはそれぞれ別々にプロットされた。そのうち局方ケイヒは中国産とベトナム産にカテゴリズすることが可能であり、さらにベトナム産は二つのグループに分類することが可能であった。次に <sup>1</sup>H-NMR スペクトルをバケット積分して得られた積分値をクラスター解析したところ、主成分分析と同様に食品に用いるケイヒと局方品のケイヒはそれぞれ別々にカテゴリズすることが可能であり、さらに局方ケイヒも産地ごとに分類することが可能であった。

生薬シャクヤクに関して、主成分分析により得られたスコアプロットを確認したところ、評価したサンプルは一点に集中することなく、スコアプロット上に四散した。このことからシャクヤクの成分はサンプルごとに異なっていることが明らかとなった。次にその産地に基づいてシャクヤクをカテゴリズできるかを検討したところ、シャクヤクは産地ごとにカテゴリズすることができなかった。シャクヤクに関しては、シャクヤクの根の皮を付けたままのものか、あるいは剥がしたものかの違いや湯通し処理を施したか否かの違いもあることから、これらの違いを考慮し、再度主成分分析に供する予定である。また、さらに調製したメタノールエキスを固相カラムに付し、様々な溶媒にて溶出させたサンプルについても <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し、それらのスペクトルを主成分分析やクラスター解析などの多変量解析に供する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

R. Suzuki, F. Nakano, H. Ohno, T. Murakami, Y. Okada and Y. Shirataki, Distinguishing *Glycyrrhiza* species using NMR-based metabolomics, *Nat. Prod. Commun.*, **13**, 71-73 (2018).

〔学会発表〕(計 2 件)

粕谷優貴、鈴木龍一郎、北村雅史、榊原巖、白瀧義明 “NMR メタボロミクスを用いた桂皮の産地比較” 日本生薬学会第 65 年会、2018 年 9 月、広島

鈴木龍一郎、中野扶佐子、大野裕和、村上敏之、岡田嘉仁、白瀧義明 “NMR メタボロミクスによるカンゾウ属 (*Glycyrrhiza*) 植物の判別” 日本生薬学会第 64 回年会、2017 年 9 月、千葉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。