

メタボロームデータと抗炎症活性を指標にした 栽培カンゾウの品質評価

申請代表者	原田 和生	大阪大学大学院薬学研究科	助教
所外共同研究者	小田 知佳	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生（修士）
所内共同研究者	小松かつ子	資源開発部門生薬資源科学分野	教授

【報告セミナー要旨】

【背景・目的】 栽培品に由来する生薬の利用が避けられない状態になりつつあり、その品質管理・評価は極めて重要な課題となる。市場流通品である野生カンゾウと栽培カンゾウとの、生薬としての同等性を証明することができれば、生薬材料の安定供給につながり、今後も安全に生薬を使用することが可能となる。本研究では、メタボローム解析および培養細胞アッセイによる生薬品質評価法の確立、さらに申請者らが栽培した植物をはじめとする栽培品、代替産地の野生品および市場に流通するカンゾウの相違を評価することを目的とした。

【方法】 実験材料として産地、採取時期が異なるウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) の野生品および栽培品を70種類収集した。これらを熱水抽出し、LC/PDA/MSに供してUVおよびMSのデータを取得した。活性評価にはカンゾウの主要な効能である抗炎症作用を目標として、マウスマクロファージ RAW cell 264.7をリポ多糖 (LPS) で処理した際に生成する一酸化窒素 (NO) の産生抑制率を指標として用いた。各種データを多変量解析ソフト Pirouette 4.0 (Infometrix) および SIMCA 13 (Umetrics) により解析した。

【結果・考察】 まず、カンゾウの主成分であるグリチルリチンとNO産生抑制率との相関を解析したところ、材料のグリチルリチン含量が局方規定の2.5%以上を示すものでもNO産生抑制率が低いものが数多く見られた。すなわち、他の成分も抗炎症に対して寄与することが推測され、このことから複数成分に着目した品質評価法の必要性が示唆された。次に主成分分析 (PCA) によりメタボロームデータの相違を解析したところ、栽培品と野生品では相違がある傾向が見られ、また野生品のばらつきが非常に大きいことが示された。相違に寄与する成分を示すローディングプロットでは、主要成分であるグリチルリチンやリクイリチンとは異なる寄与を示す化合物も検出されており、野生品間のばらつきにこれらの成分の寄与も少なからず存在することが示された。

続いてクロマトグラムフィンガープリントを説明変数とし、NO産生抑制率を予測する回帰モデルを、Projections to Latent Structures (PLS) により作成した。回帰モデルによるNO産生抑制率の予測値と実測値の間には正の相関が見られ、メタボロームデータから活性が予測可能であることが示唆された。さらに、回帰に寄与した成分を示すリグレーションベクトルの値を確認したところ、主要成分であるグリチルリチン、リクイリチン以外の成分も大きな値を示し、これらの成分も抗炎症作用に寄与する可能性が示された。当該成分の保持時間、UVスペクトル、 m/z の情報により、化合物の推定がある程度は可能であるが、同定には更なる検討が必要である。

本研究はメタボロームデータを用いてNO産生抑制作用を予測可能であることを示した。この作用だけでカンゾウの薬効の全てを評価できず、また薬物動態が考慮されていないなどの課題もあるが、本アプローチが高度な生薬品質評価法として応用されることが期待できる。

■背景・目的

近年生薬の価値が見直され、生薬材料の需要が世界的に拡大している。この影響で生薬産出国における野生品の乱獲が進み、資源枯渇、環境破壊が問題となっている。このような生薬産出国では採取、輸出を規制し始めており、特に国内消費量の大部分を輸入に依存している日本では良質生薬の安定確保が困難になりつつある。日本において処方される漢方薬で最も使用頻度の高いカンゾウは特にこの問題が深刻である。対応策として、製薬企業を中心として代替産出地の探索や栽培生産体制の整備が進められているが、代替産地の野生品や栽培品は日本薬局方の規定を満足し、かつ従来の流通生薬と同等であることが証明されなければ医薬品としての使用が難しい。このような背景から生薬の品質評価・管理は喫緊の極めて重要な課題となっている。

従来、生薬の品質評価方法としては、外部・内部形態による基原植物の鑑定、日本薬局方規定単一成分の定量、TLCパターンの解析などが採用されてきた。しかし、当該手法では複雑な成分組成を定量的に取り扱うことは困難であり、また、最も重要な薬効を直接評価できているわけではなく、生薬品質評価法として十分とはいえない。上述の問題を解決する手段として、生薬エキス成分を網羅的に解析するメタボローム解析およびエキスの薬効を簡便に評価できる培養細胞アッセイ法の活用が挙げられる。

本研究の目的は、メタボローム解析および培養細胞アッセイによる生薬品質評価法の確立、さらに申請者らが栽培したものをはじめとする栽培品、代替産地の野生品および日本市場に流通する日局カンゾウの同等性を上述の解析系により評価することである。

■結果・考察

実験材料

本研究で用いたカンゾウは全てウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) である。中国東北、西北地域で採取されたカンゾウ野生品で日本市場品（以下中国産市場品と略す）（(株) 栃本天海堂、山本豊博士より譲渡）、モンゴルで採取されたカンゾウ野生品（富山大学和漢医薬学総合研究所 小松かつ子教授より譲渡）、栽培品として中国・内蒙古自治区で栽培されたカンゾウ（小松かつ子教授より譲渡）、北海道の温室で栽培されたカンゾウ、大阪大学大学院薬学研究科にて栽培したカンゾウ（上記の北海道で栽培された植物組織から個体を再生させたもの）、計66種類を使用した。

実験材料のグリチルリチン含量

日本薬局方に準じた分析方法でカンゾウ試料のグリチルリチン含量を算出した結果、概して中国産市場品が高く、栽培品は低く、モンゴル野生採取品はその中間にある傾向が見られた。日本の栽培品においては、北海道の温室で栽培されたものは局方の規定を満たしていた。

マウスマクロファージを用いた一酸化窒素産生抑制活性試験

本研究ではカンゾウの主要な薬効である抗炎症作用に着目し、その評価方法の一つであるマウスマクロファージ RAW 264.7細胞を用いた一酸化窒素(NO)の産生抑制活性試験の結果を指標とした。熱水抽出したエキスを凍結乾燥により水分を留去しPBSで再溶解した試料を用い試験を行った。その結果、用いたカンゾウサンプルによってNO産生抑制率が大きくばらつきが見られた。なお、カンゾウエキスの代わりにNF- κ B阻害剤として知られるCAPEも同時に測定を行い試験が正常に機能し

ていることを確認した。

実験に用いた材料のグリチルリチン含量とNO産生抑制率との間には緩やかな正の相関が確認された。しかしながら、グリチルリチン含量2.5%以上のサンプルでも低いNO産生抑制率を示すものが存在し、グリチルリチン含量のみでの薬効評価は困難であることが示唆された。

LC/MSによるメタボロームデータ取得

続いてカンゾウ熱水抽出エキスのメタボロームデータを取得する為、まず市販されているカンゾウ含有成分の標準物質を揃え、それらが全て検出可能な分析条件を検討した。溶離液Aを0.1% ギ酸, Bをアセトニトリルとし、B濃度を0%から15分で100%に直線的に高め、5分間維持するグラジエント条件において良好な分離が得られた。続いて当該測定条件でカンゾウエキスを分析した。入手した標準物質以外にも数多くの化合物が検出されていた。保持時間、UVスペクトル、 m/z の情報と、これまで論文等で報告されているカンゾウ含有成分の情報とを照合した結果、ピークはリクイリチンアピオシド、イソリクイリチンアピオシド、イソリクイリチン、ホルモノネチンの配糖体であるホルモノネチングリコシドと推測された。

LC/MSプロファイルのPCA

続いてLC/MSにより得られたデータについてその特徴を概観することを目的にPCAを行った。各サンプルのMSプロファイルデータをプロットしたスコアプロット、および主成分軸に対する検出ピークの寄与度を示すローディングプロットをFig. 1に示した。

Fig. 1Aのスコアプロットでは中国産市場品、モンゴル野生採取品、および栽培品のプロット位置が第一主成分(PC1)に沿って明確に区分されていた。また栽培品、モンゴル野生採取品、中国市場品の順で相対的にプロットのばらつく範囲が大きくなっており、中国市場品はそのグループ内でプロファイルパターンが大きく異なっていることが示されている。中国栽培品は中国産市場品(野生品)と同等のMSプロファイルパターンを示し日本栽培品と大きく異なっていた。この違いとして栽培方法や産地の違いが考えられる。

Fig. 1Bのローディングプロットで注釈を加えたピークはPC1, PC2に対する寄与が大きいものである。Fig. 1Bの中心から右側に大きく外れているピークは保持時間、 m/z の情報から主要成分であるリクイリチンやイソリクイリチゲニン、リクイリチゲニンであることが判明した。つまり、当該成分は栽培品、モンゴル野生採取品、中国産市場品の順で含量が大きくなっていることを示している。またリクイリチンとリクイリチゲニン、イソリクイリチゲニンはPC2に対して正負が反対の値を示している。つまりスコアプロットにおいてPC2に沿って正に大きな値を示すものは配糖体であるリクイリチン含量が高く、逆にPC2に沿って負に大きな値を示すものはそのアグリコンであるリクイリチゲニン、およびその異性体イソリクイリチゲニンの含量が高い傾向にあることを示す。つまり同一グループ内のサンプル間で配糖体化の程度が異なっていることを示唆している。

一方、PC1に対して負の大きな寄与を示す化合物として(R_t , m/z) がそれぞれ (7.9, 839), (8.5, 987), (8.8, 839), (9.2, 453)であるピークが検出されていた。当該化合物群は同定に至っていないが、Tanakaらの報告(J. Trad. Med. 27, 210-216, 2010)を参照すると、グリチルリチンに構造が類似したトリテルペン類である可能性が高い。当該化合物群は中国産市場品よりも日本栽培品において蓄積量が高く非常に興味深い。

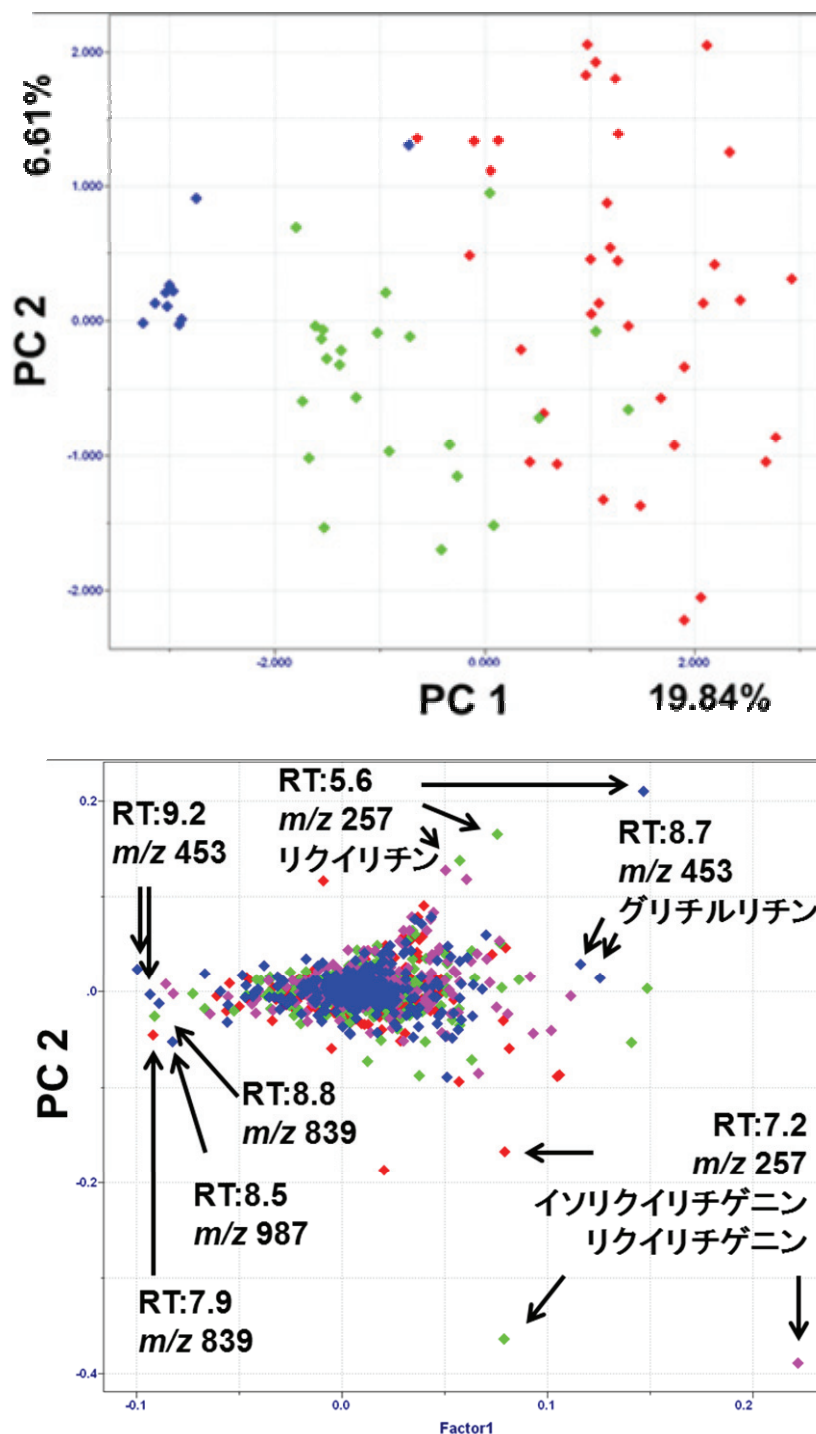


Fig.1 MSクロマトグラムパターンを用いた主成分分析のスコアプロット(A)とローディングプロット(B)
Aのシンボルの色は赤が中国産市場品、緑色がモンゴル野生採取品、青が栽培品を示す。A, Bいずれも横軸に第一主成分 (PC1), 縦軸に第二主成分 (PC2) を示す。PC1, PC2 の寄与度は各々 19.8, 6.6%であった。Preprocessingにpareto, transformは無しで計算を行った。

LC/MSプロファイルとNO産生抑制率のOPLS

続いてMSプロファイルに含まれる各MSピークを説明変数, NO産生抑制率を目的変数としてOPLSを行った。まず66個のMSデータから外部バリデーション用に10個を除き, 残りの56個を用いてOPLSモデルを構築した。またOPLSモデル構築時にもランダムに10個をテストセットとする

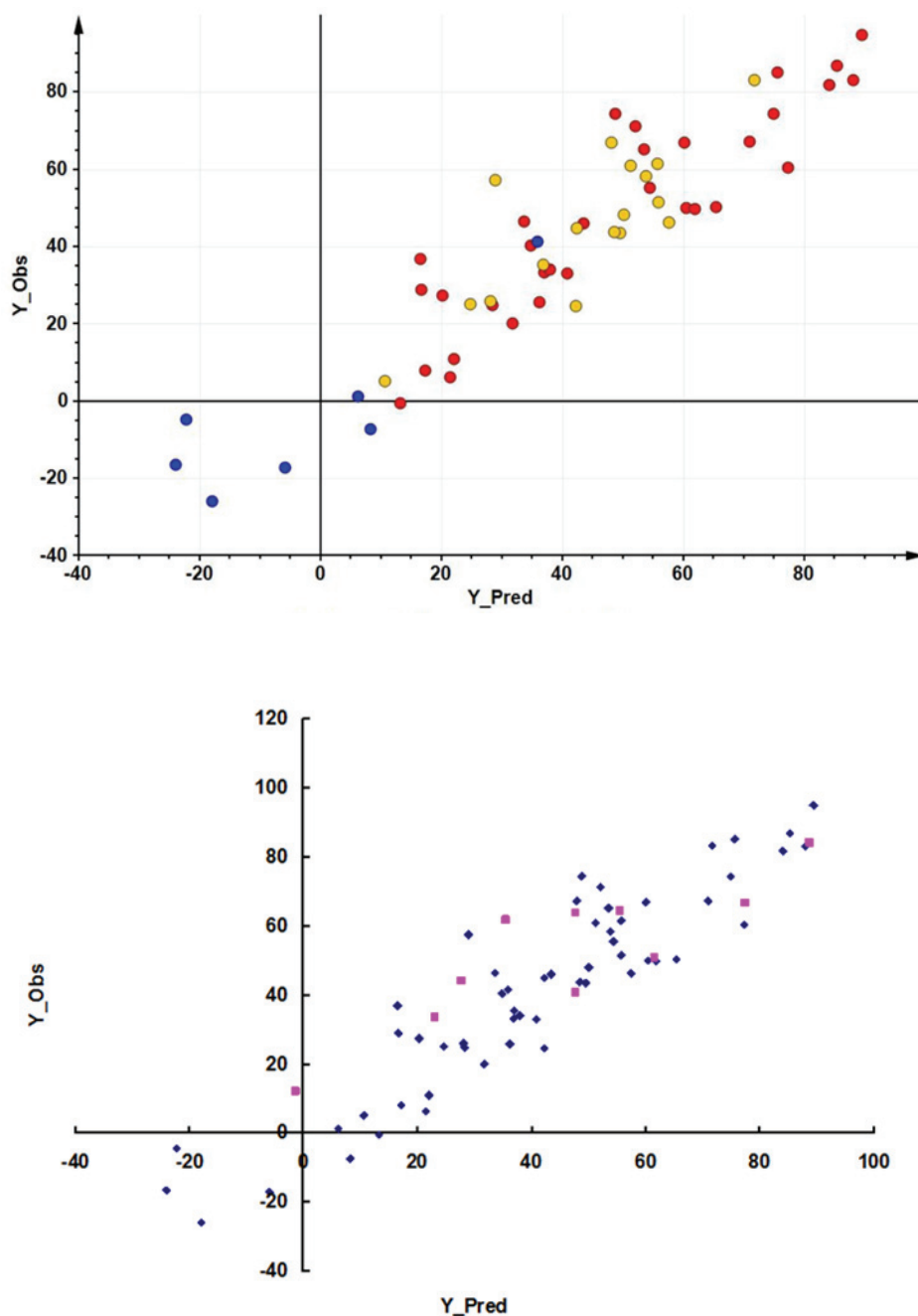


Fig.2 MSプロファイルデータを用いたOPLSによるNO産生抑制率予測結果

A：外部バリデーション用テストセットを除いたデータセットでOPLSを行った際の、予測値(縦軸)と実測値(横軸)の散布図, B：Aのモデルを用いて外部バリデーション用テストセットを予測した散布図。モデルセット, テストセットのプロットは各々、青、ピンクで示している。

クロスバリデーションを実施した。結果をFig. 2に示す。Fig. 2Aはクロスバリデーション実施後のOPLSモデルによるNO産生抑制率予測値と実測値の関係を示したものである。Fig. 2Aに示す通り構築されたPLSモデルから予測されたNO産生抑制率は多少のずれが確認されるものの概ね実測値と相関が見られた。さらに構築されたOPLSモデルを用いて外部バリデーション用テストセットの予測を行った結果 (Fig. 2B), ピンクのプロットで示した外部バリデーション用テストセットの結果のばらつきが、青のプロットで示したOPLSモデルが示すばらつきの範囲に収まっていることが確認で

きた。同様の解析を外部バリデーションテストセットの組み合わせを変えて行ったが、ほぼ同等の結果が得られ、OPLSによりMSプロファイデータを用いてNO産生抑制率を予測できることが示唆された。

予測に寄与した化合物のピークとその寄与度を示したリグレーションを確認したところ、グリチルリチンを始め正の寄与を示すや負の寄与を持つものなど様々なピークが見られる。本結果はグリチルリチンだけの評価ではなく、様々な生理活性を持つ他の成分との相互作用も考慮しなければならないことを示唆している。今後当該リグレーションベクトルデータを文献情報と照合し寄与化合物の同定を進めていく必要がある。

■結論

本研究はメタボローム解析および培養細胞アッセイによるカンゾウの品質評価法の確立、さらにウラルカンゾウについて申請者らが栽培したものをはじめとする栽培品、代替産地の野生品および中国野生品で日本市場に流通する日局カンゾウの違いを評価することを目的とした。カンゾウの主要な効能である抗炎症作用を目標としてマウスマクロファージRAW cell 264.7が生成するNOの産生抑制率を測定したところ、概して日本栽培品の活性が低い傾向が見られたが、中国産市場品においてグリチルリチン含量が局方規定の2.5%以上を示すものでも活性が低いものが多く見られた。このことは単一成分のみでの生薬の薬効評価が困難であることを示している。

次に各サンプルの熱水抽出エキスのメタボロームをLC/PDA/MSにより測定し、PCAに供したところ、日本栽培品と中国産市場品ではそのパターンが大きく異なり、主要成分であるグリチルリチンやリクイリチン以外にも含量が異なる成分が見出された。一方、スコアプロットで中国栽培品は中国産市場品とほぼ同じ位置にプロットされ、同じ栽培品であっても産地や栽培方法の違いがメタボロームパターンに影響することが示唆された。

続いてメタボロームデータを説明変数としNO産生抑制率を予測するOPLSモデルを作成したところ、実測値とモデルによる予測値との間には正の相関が見られた。さらに当該回帰にはグリチルリチン、リクイリチン以外の成分も寄与していることが判明し、当該成分も抗炎症作用に寄与する可能性が示された。

一方、NO産生抑制率のみでカンゾウの薬効全てを評価できない、*in vivo*の実験に基づく薬物動態が考慮されていないなどの課題が残っている。今後はNO産生抑制率以外の生物活性試験データや薬物動態力学パラメータデータを集積し、それらとメタボロームデータとの相関関係を明らかにしていく必要がある。

本研究では抽出エキス成分のメタボロームデータを用いて、抗炎症作用の一評価方法であるNO産生抑制作用を予測可能であることを示した。生薬の最も重要な品質は薬効であるが、それを予測、評価するためにはメタボロームデータの活用が極めて有効であることが示唆された。まだ残された課題は多いが、前述のような課題を克服することで、生薬の「薬効」評価が可能になると期待される。