

漢方薬の新品質評価法の開発を目指した メタボロームデータと生物活性の相関解析

申請代表者 原田 和生 大阪大学大学院薬学研究科附属薬用植物園
所内共同研究者 小松かつ子 生薬資源科学分野

講師
教授

【報告セミナー要旨】

【背景・目的】

漢方薬の原料生薬は野生採取品であることが多く、成分組成が均質な材料の大量調達は困難である上、近年では産出国で輸出が規制される等、その状況は悪化の一途を辿っている。このような状況下で生薬・漢方薬の品質評価には、複雑な成分組成を網羅的に取り扱い、従来品との同等性の評価、さらには生物活性や薬効の予測を可能とする技術が求められている。申請者はメタボローム解析を生薬・漢方薬の品質評価に活用することを目的とし、エキスのメタボロームデータから生物活性を予測する数式モデルの構築に取り組んできた。これまでに産地、採取時期が異なるウラルカンゾウのLC/PDA/MSデータからマクロファージー酸化窒素産生抑制活性を予測するモデルを構築してきた。本研究では、カンゾウを含む漢方薬の中で構成生薬が少なく、薬効に関係する生物活性が明らかな大黃甘草湯を題材として、メタボロームデータから生物活性を予測する数式モデルを構築し、漢方薬の品質評価技術としての有用性を検証することを目的とした。

【結果・考察】

ダイオウは中国青海省産の *Rheum palmatum*, *R. tanguticum* それぞれ1種類、および長野県産の *R. plamatum* 栽培品4種類の計6種類を使用した。また、カンゾウは中国内蒙古産、寧夏産の生薬市場品それぞれ1種類、内蒙古産栽培品1種類、モンゴル産野生採取品1種類、日本産栽培品2種類の計6種類を使用した。使用したカンゾウは全て *Glycyrrhiza uralensis* Fisherである。第十六改正日本薬局方に記載されている大黃甘草湯エキスの処方²⁾に従って混合し、エキスを調製した。上記のダイオウとカンゾウの生薬材料について、全ての組み合わせで計36種類の大黃甘草湯エキスを調製した。これにそれぞれの単味エキスを組み合わせ、全48種類のエキスを解析に用いた。調製したエキスはLC/PDA/MS解析に供しメタボロームデータを取得した。LC/PDA/MSプロファイルデータを主成分分析(PCA)に供したところ、使用したエキスのメタボロームプロファイルの違いは、ダイオウ試料の違いが強く反映されていた。

次に、同じエキスをヒト結腸株化細胞Caco-2に処理し、瀉下活性と相関があるとされるアクアポリン3(AQP3)タンパク質の発現量をウェスタンブロット法により解析する手法の確立を試みた。Caco-2細胞破碎液をSDS-PAGEに供し、抗AQP3抗体で染色を行ったところ、報告されている分子量とは異なるバンドが非常に強く検出され、また、AQP3の発現量に影響を与えるとされるプロスタグランジンE2(PGE₂)や硫酸マグネシウム(MgSO₄)処理による変動が明確に確認できなかった。そこで、細胞破碎液を細胞質と細胞膜に分画し、解析したところ、細胞膜画分から想定された分子量のバンドが検出され、PGE₂やMgSO₄による変動も確認された。現在、大黃甘草湯エキスの処理による細胞膜画分に局在するAQP3の発現量を解析中である。

■背景・目的

漢方薬の原料生薬は野生採取品であることが多く、成分組成が均質な材料の大量調達には困難であるうえ、近年では産出国で輸出が規制される等、その状況は悪化の一途を辿っている。日本国内での栽培生産体制整備も進められているが、栽培品と従来品との同等性が問題となっており、未だ実用には至っていない生薬も多い。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。

従来の生薬品質評価手法は外部・内部形態観察による基原植物の鑑定、日本薬局方規定成分の定量、TLCパターン解析などが採用されてきた。しかし、当該手法では漢方薬特有の複雑な成分組成を定量的に取り扱う事は困難であり、今日の医療の流れであるEBMに貢献し得る生薬品質評価法として十分とは言い難い。上述の問題を解決する手段として生薬成分を網羅的に解析するメタボローム解析の活用が挙げられる。近年、メタボローム解析を活用した基原種・産地判別や生理活性成分探索の研究例が発表されているが、生薬および漢方薬の品質として最も重要な薬効を評価した例は少ない。

申請者はメタボローム解析を生薬・漢方薬の品質評価に活用することを目的とし、エキスのメタボロームデータから生物活性を予測する数式モデルの構築に取り組んできた。これまでに産地、採取時期が異なるウラルカンゾウのLC/PDA/MSデータからマクロファーゼ酸化窒素産生抑制活性を予測するモデルを構築してきた。そこで本研究では、カンゾウを配合生薬として含む漢方薬の中で構成生薬の種類が少なく、薬効に関係する生物活性が明らかな大黃甘草湯を題材として、メタボロームデータから生物活性を予測する数式モデルを構築し、漢方薬の品質評価技術としての有用性を検証することを目的とした。

■結果・考察

実験材料

本研究で用いたダイオウは、中国青海省産の生薬市場品2検体 (*Rheum palmatum*, *R. tanguticum*)、および日本長野県で栽培された*R. palmatum*の4系統各1検体の計6検体を使用した。また、カンゾウは中国内モンゴル産、寧夏産の生薬市場品それぞれ1検体、内モンゴル産栽培品1検体、モンゴル産野生採取品1検体、日本産栽培品2検体の計6検体を使用した。使用したカンゾウは全てウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) である。第十六改正日本薬局方に収載されている「大黃甘草湯エキス」の製法²⁾に従って混合し、エキスを調製した。上記のダイオウとカンゾウの生薬材料について、全ての組み合わせで計36種類の大黃甘草湯エキスを調製した。これにそれぞれの単味エキスを組み合わせ、全48種類のエキスを解析に用いた。

LC/MSによるメタボローム解析

調製したエキスはLC/PDA/MS解析に供しメタボロームデータを取得した。LCはAcquity UPLC、MSはQuattro Premier XE (ともにWaters)、カラムはAcquity UPLC BEH C18 (2.1 X 150 mm, 粒子径1.7 μm, Waters)を用い、40℃で保温した。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分離を行った。流速は0.250 mL/minとした。フォトダイオードアレイによる検出では200 - 400 nmの吸光度を測定した。MSはイオン化にエレクトロスプレー法、極性にポジティブモードを使用し、m/z 50 - 1,000の範囲を0.95秒で走査するスキャンモードにより測定を行った。

LC/MSにより得られたデータの特徴を概観することを目的に主成分分析 (Principle Component Analysis, PCA) を行った。各サンプルのMSプロファイルデータを表現したスコアプロットを Fig. 1 に示した。Fig. 1ではダイオウサンプルの違いが第一主成分軸 (PC1) に、カンゾウサンプルの違いが第二主成分軸 (PC2) に沿って現れていた。PCAの計算原理は、成分間で含量変動の相関が高いものを集約することで新たな主成分軸を構築し、最も変動の大きい主成分軸をPC1、PC1と直行する主成分軸の中で次に変動の大きいものをPC2とする、というものである¹⁾。つまり、ダイオウ、カンゾウの材料の違いがそれぞれ別の主成分軸に反映されたことは、各生薬由来の成分含量は当該生薬の材料の違いによって変動し、もう一方の生薬材料の種類による影響をほとんど受けていないことを示している。また、本実験で使用した大黄甘草湯エキスのダイオウ、カンゾウの量比は2:1であることから、PC1にダイオウ、PC2にカンゾウの材料の違いが反映されていることも理に適っている。一方、ダイオウ2を含むエキスは、他のエキスからは大きく離れた位置にプロットされている。これは基原植物がダイオウ2のみ *Rheum tanguticum* であり、他は *Rheum palmatum* であるため、ダイオウ由来成分の組成が大きく異なることを示していると考えられる。また、同じ葉緑体 *matK* 遺伝子型を示すダイオウ5とダイオウ6が同じ位置にプロットされていたことも興味深い。

以上のことから、成分組成の異なった一連の大黄甘草湯エキスを作成でき、それらの違いを反映したLC/MSプロファイルを得ることができた。

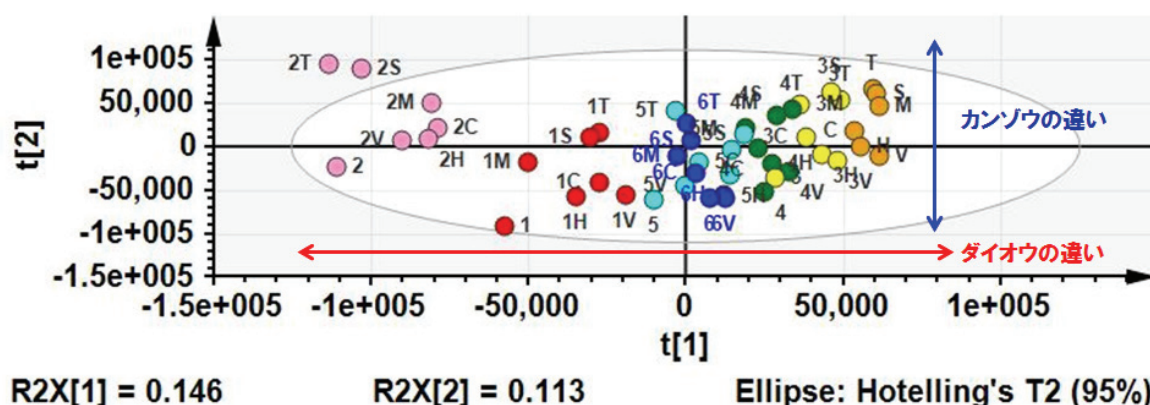


Fig. 1 大黄甘草湯エキス LC/MS プロファイルデータの PCA スコアプロット

プロットラベルは、数字がダイオウ、アルファベットがカンゾウのサンプルの違いを示している。ダイオウ, 1: 中国青海省産市場品 (*Rheum palmatum*), 2: 中国青海省産市場品 (*R. tanguticum*), 3-6: 日本長野県産 *R. palmatum*, カンゾウ, T: 中国内モンゴル産市場品, S: 中国甘粛産市場品, M: モンゴル (Bodg, Bayanhongor Province) 産野生採取品, C: 中国内モンゴル赤峰市産栽培品, H: 日本北海道産栽培品, V: 日本大阪産栽培品を示す。カンゾウは全て *Glycyrrhiza uralensis* である。

腸管細胞アクアポリン3発現量解析

大黄甘草湯は便秘やそれに伴う諸症状を目標として使用される。その作用機序の一つとして、腸管表皮細胞膜の水トランスポーターであるアクアポリン3 (AQP3) の発現制御により便の水分含量を高め、瀉下作用が誘導されることが挙げられる^{2), 3)}。そこで、大黄甘草湯エキス処理によるAQP3発現量変動の解析を目指した。腸管上皮細胞株であるCaco-2細胞の破碎液をSDS-PAGEに供し、抗AQP3抗体によるウェスタンブロットを行った。その結果をFig. 2に示す。30 kDaは未修飾、35 kDaは糖鎖修飾を受けたAQP3であると考えられる。また、AQP3はプロスタグランジン2 (PGE2) によって発現が抑制されることが知られている⁴⁾が、30 kDaでは僅かながら発現量が低下している

ことが確認された。続いて各種大黄甘草湯エキスを Caco-2細胞に処理し、AQP3の発現量の変動を解析した。その結果を Fig. 3に示す。30 kDaおよび35 kDaのいずれもタンパク質もエキス処理によって発現量が変動していた。しかし、構成生薬の材料の違いによる一定の傾向は特に確認できなかった。

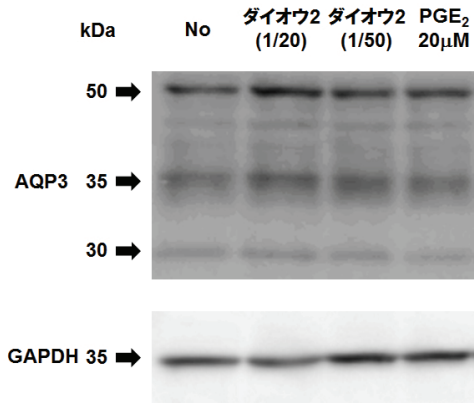


Fig. 2 Caco-2 細胞由来 AQP3 ウェスタンブロット

No は非処理, ダイオウ 2 は中国青海省産 *Rheum tanguticum* のエキスを 1/20, 1/50 に希釈し 5 時間処理したもの, PGE₂ は 20 mM の濃度で 30 分処理した。処理後, 細胞を回収し, RIPA バッファー中で超音波破碎し, 総タンパク質 20 μg を SDS-PAGE に供した。30, 35 kDa はそれぞれ未修飾, 糖鎖修飾 AQP3 と考えられる。50 kDa は二量化体と考えられるが詳細は不明である。内部標準として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

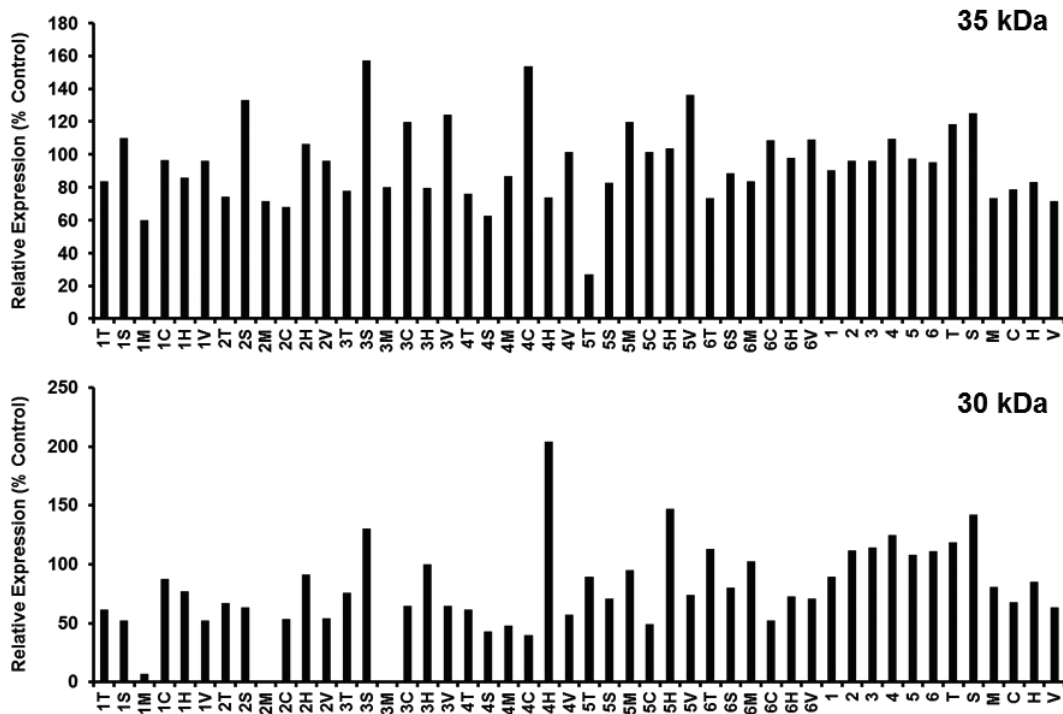


Fig. 3 大黄甘草湯エキス処理した Caco-2 細胞中の AQP3 発現量変動

大黄甘草湯エキスを 1/20 に希釈し, 5 時間処理した。処理後, 細胞を回収し, RIPA バッファー中で超音波破碎し, 総タンパク質 20 μg を SDS-PAGE に供した。非処理細胞での AQP3 発現量を 100% とし, 相対値で表示している。

LC/MS プロファイルと AQP3 発現量の 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, 腸管表皮細胞膜の水トランスポーターであるアクアポリン 3 (AQP3) の発現量を目的変数として多重回帰分析の一つである projections to latent structures by means of partial least square (PLS) を行った。結果を Fig. 4 に示す。全サンプルをモデル構築に用いた場合の決定係数 R^2 は 0.649, クロスバリデーションを行った際の Q^2 値は -0.04 であった。後者の値が極めて低いことから, 今回の解析から MS プロファイルと AQP3 発現量の間には相関を見出すことができなかつたと判断される。

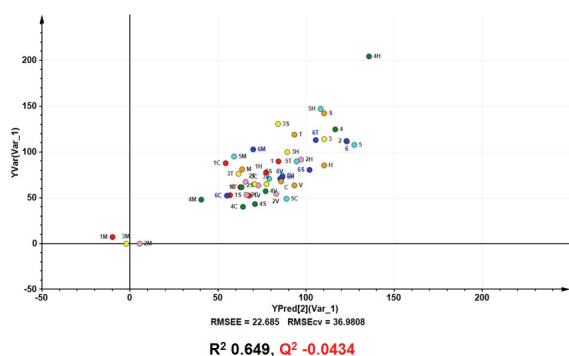


Fig. 4 MSプロファイルデータを用いたPLSによるAQP3発現量予測結果

横軸はAQP3発現量の実測値 (Fig. 3の値), 縦軸はMSプロファイルデータをもとにした予測値を示す。R²は実測値と予測値の線形性を示す決定係数で1に近いほど線形性が高いことを示す。Q²はクロスバリデーションを行った際のテストセットの予測精度であり、R²値に近いほど、予測精度が高いことを示す。

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大黃甘草湯エキスの品質評価法の確立を目的とした。基原植物種、産地が異なる生薬材料を組み合わせたエキスをLC/PDA/MSにより測定し、PCAに供したところ、ダイオウ、カンゾウの材料の違いがそれぞれ別々の主成分に反映された。これはエキス製剤であっても構成生薬材料の基原植物種、産地の判別が可能であることを示している。

続いて大黃甘草湯の主要な薬効である瀉下作用を、腸管上皮細胞Caco-2におけるAQP3発現抑制活性で評価した。抗AQP3抗体を用いたウエスタンブロットにより発現量を解析したが、ダイオウ、カンゾウのサンプルの種類でAQP3発現量に一定の傾向は見られず、サンプル間の発現量の変動は極めて大きいものとなった。さらにLC/MSプロファイルデータを説明変数、AQP3発現量を目的変数としたPLSモデルの構築を試みたが、成功には至らなかった。

モデルが構築できなかった理由として、AQP3発現量測定法の不備と実験に用いたエキスにそもそも瀉下作用を誘導する活性がない可能性の二点が挙げられる。前者を支持する根拠としては、AQP3発現を抑制することが知られているPGE2処理によっても、その発現量の低下がわずかであったこと、既報のウエスタンブロット^{2), 3)}では言及されていない二量化体と思われる50 kDaのバンドが明確に検出されていることが挙げられる。AQP3は膜タンパク質であり、細胞破碎あるいはSDS-PAGE試料の変性条件を精査することにより、AQP3由来と思われるバンドの強度が変化するか確認し、変化する場合は、再度ウエスタンブロット条件の最適化を行う必要がある。また後者については、ダイオウの瀉下作用はエキスに含まれるsennoside Aが腸内細菌により代謝されたrheinanthroneによって誘導されることが古くから知られている⁵⁾。今後はグリコシダーゼなどの各種代謝酵素で処理を行ったエキスを用い、AQP3発現抑制活性を測定し、そのプロファイルパターンと活性との相関を解析していく必要があると思われる。

参考文献

- 1) Eriksson L., *et al.*, Multi- and Megavariate Data Analysis. Part I Basic Principles and Applications, Edited by Umetrics (2006)
- 2) Ikarashi N., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 238-242 (2011).
- 3) Ikarashi N., *et al.*, *Life Sci.*, 88, 194-200 (2011)
- 4) Zelenina M., *et al.*, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 278, F38-F394 (2000)
- 5) Leng-Peschlow, E., *J. Pharm. Pharmacol.*, 38, 369-373 (1986)