

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 講師
所内共同研究者 小松かつ子 生薬資源科学分野 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。

ダイオウとカンゾウを含有する大黃甘草湯は便秘改善を目標とする処方で、その瀉下活性はダイオウの指標成分 sennoside A (SA) およびその立体異性体 sennoside B (SB) が腸内細菌により代謝され生成する rheinanthrone (RA) に起因することが知られている。本研究では、異なった基原種、産地から調製した大黃甘草湯エキスについて腸管内で生成する RA 量をメタボロームデータから予測するモデルを構築し、漢方薬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* L., *R. tanguticum* Maxim. それぞれ1検体、および長野県産の *R. plamatum* 栽培品4検体の計6検体を使用した。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検体、モンゴル産野生採取品1検体、日本産栽培品1検体の計4検体を使用した。使用したカンゾウは全て *Glycyrrhiza uralensis* Fisher である。第16改正日本薬局方の大黃甘草湯エキス(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エキスを調製し、全24種類の大黃甘草湯エキスを調製した。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。また同エキスをマウス糞便懸濁液に添加、インキュベートし、RA量を経時的に測定し、最高到達濃度 (Cmax) を求めた。エキスメタボロームデータを説明変数、RA Cmax 値を目的変数とし、部分最小二乗法 (PLS) による多変量解析を行うことにより、RA Cmax 値を予測するモデルを構築した。

構築したモデルの実測値と予測値の相関係数は0.99となり、これはSA含量とRA Cmax 値の相関係数0.92より高い値であった。また、メタボロームデータに含まれる各成分ピークの予測モデルに対する寄与度を示すVIP値から、SA、SBに類似した構造を有しRAを生成し得るジアンスロン、SAからRAへの代謝を活性化する rhein, emodin, aloe-emodin などのアントラキノンの寄与が高いことが示された。

つまり、当該エキスの薬理活性を予測するためにはSA含量のみならず、上記のような成分含量も併せて評価することが必要であると言える。本研究は複雑な成分組成を持つ生薬・漢方薬の品質評価、薬効予測にメタボローム解析が有用であることを示唆するものである。

■背景・目的

近年生薬の価値が見直され、そ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な生薬の安定確保が困難になりつつある。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言い難い。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。申請者はメタボローム解析を生薬、さらには漢方処方品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。

ダイオウとカンゾウを含有する大黃甘草湯は便秘改善を目標とする処方で、その瀉下活性はダイオウの指標成分 sennoside A (SA) およびその異性体 sennoside B (SB) が腸内細菌により代謝され生成する rheinanthrone (RA) に起因することが知られている。本研究では、異なった基原種、産地から調製した大黃甘草湯エキスについて腸管内で生成する RA 量をメタボロームデータから予測するモデルを構築し、漢方薬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

ダイオウは中国青海省産の *Rheum palmatum* L. に由来する市場品、*R. tanguticum* Maxim. に由来する市場品を各1検体、および長野県で栽培している4系統の *R. palmatum* の栽培5年目の根茎または根を各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および寧夏産の市場品を各1検体、モンゴル産野生品および日本栽培品の根を各1検体の計4検体を使用した。使用したカンゾウは全て *Glycyrrhiza uralensis* Fisher である。大黃甘草湯エキスは、第16改正日本薬局方の大黃甘草湯エキス(の処方2)に従って材料を混合し、調製した。上述のダイオウとカンゾウの材料について、全ての組み合わせでエキスを調製し、全24種類の大黃甘草湯エキスを作製した。

LC/MSによるメタボロームデータ取得

上述の通り調製した大黃甘草湯エキスのメタボローム解析を液体クロマトグラフィー / 質量分析 (liquid chromatography / mass spectrometry, LC/MS) を用いて行った。カラムは内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒子径1.7 μmのAcquity UPLC BEH C18 (Waters) を用いた。溶離液は0.1%ギ酸を含む蒸留水とアセトニトリルの混合液とし、グラジエント溶出を行った。イオン化はelectrospray ionization (ESI) で行い、極性は負イオンモードとした。m/z 100 - 1,000の範囲をスキャン時間0.95 secで走査することにより、データを取得した。検出ピークのうち、市販されている生薬成分標準品により同定された成分、およびKomatsuら (Komatsu *et al.*, 2006) およびYangら (Yang *et al.*,

2015)の先行研究を参照し、保持時間と m/z の情報から検出化合物を推定した。同定された成分としては、ダイオウの指標成分である SA, SB, 代表的なアントラキノンである rhein や emodin, aloemodin, カンゾウの指標成分である glycyrrhizinic acid, カンゾウに含まれる代表的なフラボノイド配糖体である liquiritin とそのアグリコンである liquiritigenin であった。また, rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside や catechin, スチルベン類の resveratrol 4'-*O*- β -D-glucopyranoside と推定されるピークも見出された。

次に、ダイオウの指標成分である SA の含量を MS クロマトグラムのピーク面積により比較した。その結果、SA 含量は中国青海省産 *R. tanguticum* 由来ダイオウ市場品を配合したエキスで高く、長野県栽培品を配合したエキスでは少ない傾向にあるなど、ダイオウの検体により大きな違いが見られた。

さらに LC/MS メタボロームデータを主成分分析 (principle component analysis, PCA) に供した結果、Fig. 1 に示す通り、ダイオウの材料ごとにクラスターが形成されており、第一主成分 (t1) の負の領域に市場品、正の領域に栽培品がプロットされた。また、第二主成分 (t2) の正の領域に *R. tanguticum* 由来ダイオウ市場品を用いたエキス、負の領域に *R. palmatum* 由来ダイオウ市場品と栽培品を用いたエキスがプロットされた。また、これら的大黄甘草湯エキス間で、カンゾウの材料による成分含量の違いは、ダイオウの材料による成分含量の違いに比べて小さいと考えられる。

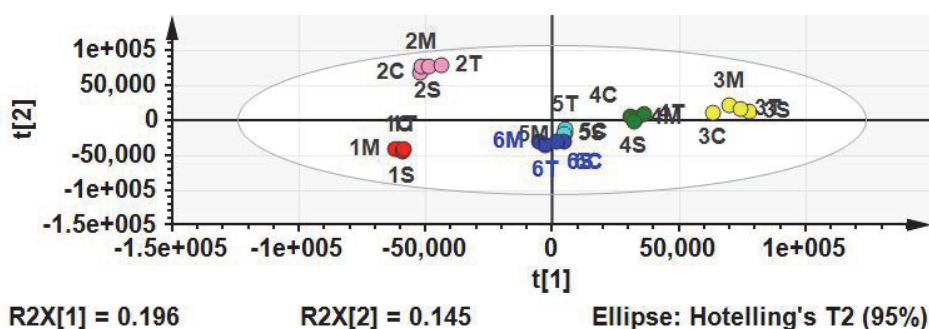


Fig. 1 LC/MS メタボロームデータを用いた大黄甘草湯エキスのスコアプロット

プロットに付したラベルは、各エキスの構成材料の産地、基原種の違いを表しており、数字はダイオウ、アルファベットはカンゾウの材料を示している。ダイオウは 1: 中国青海省産 *Rheum palmatum* 由来市場品(TMPW19929), 2: 中国青海省産 *R. tanguticum* 由来市場品(TMPW20109), 3-6: 長野県栽培 *R. palmatum* (3: 系統 4-2 根茎, 4: 系統 15-2 根, 5: 系統 18-9 根, 6: 系統 29-2 根)である。カンゾウはいずれも *Glycyrrhiza uralensis* であり, C: 中国内蒙古産市場品 (TMPW21585), M: モンゴル Bogd 産野生品, S: 中国甘肅省産市場品 (西北甘草), T: 中国内蒙古産市場品 (東北甘草 3 号)である。

マウス糞便懸濁液中における sennoside 代謝

続いて上述の大黄甘草湯エキスをマウス糞便懸濁液に添加、窒素雰囲気下でインキュベートし、RA 量を継時的に測定した。予備実験として、中国青海省産 *R. tanguticum* 由来ダイオウ市場品のエキス、および当該エキスに含まれる SA, SB と含量を揃えた SA, SB 標準混合溶液を、それぞれマウス糞便懸濁液に添加し、生成する RA 含量を測定した。その結果、Fig. 2 に示す通り、標準混合溶液を添加した場合とエキスを添加した場合のどちらにおいても sennoside 代謝が確認されたが、RA の最大到達濃度は、SA, SB 標準混合溶液を添加した場合に比べ、ダイオウエキスを添加した場合、32 倍高い値となった。このことから、ダイオウエキス中の何らかの成分が RA に変換したか、もしくは sennoside から RA への代謝が促進された可能性が示唆された。

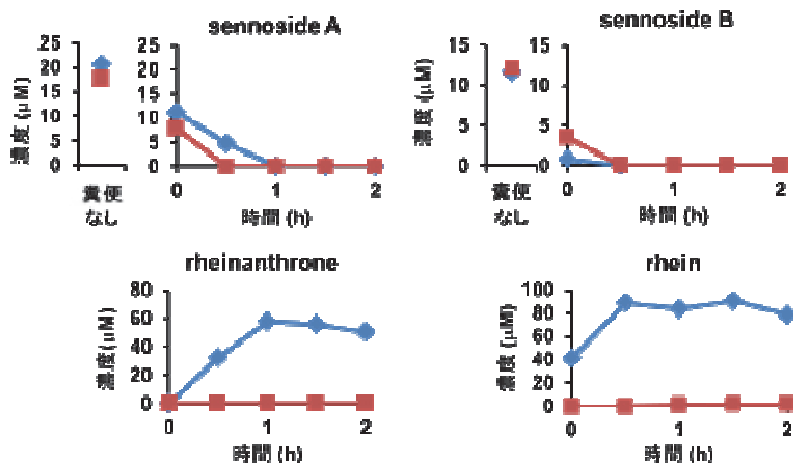


Fig. 2 Sennosides 標準溶液およびダイオウエキスをマウス糞便に添加した際の sennosides A, B, rehinanthrone, rhein 含量の経時変化
赤四角は sennosides 標準溶液, 青菱形はダイオウ (中国青海省産 *R. tanguticum* 由来市場品(TMPW20109)) のエキスを添加した場合の結果を示す。

PLSによるrheinanthrone Cmax予測

続いて調製した大黃甘草湯エキスそれぞれについて、マウス糞便懸濁液により代謝を行い、RA生成量を経時的に測定し、Cmaxの値を算出した。この値を目的変数とし、各エキスのLC/MSプロファイルデータを説明変数として、部分最小二乗法 (projection to latent structure by means of partial least square, PLS)を行った。その結果をFig. 3に示す。得られたモデルのRA Cmax予測値と実測値の相関係数は0.99であった。この値はsennoside Aピーク面積とRA Cmaxの相関より高い結果となった。

また、このモデルのVIP (variable importance in the projection) 値を確認したところ、モデル構

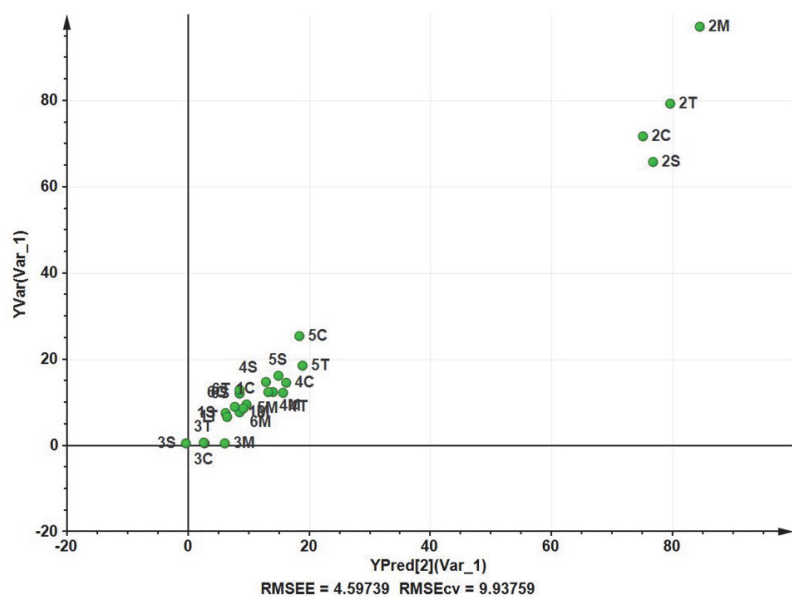


Fig. 3 PLSを用いた大黃甘草湯エキスのRA Cmax予測
横軸はLC/MSメタボロームデータを用いて予測したRA Cmax値, 縦軸は実測値を示す。

築に寄与しているとみなすことができる1以上の値を示す成分が多数検出されていた。そこで、モデル構築に寄与した成分を推定したところ、sennosides A, Bのみならず、rhein, aloe-emodin, emodinなどのアントラキノンやそれらの配糖体が推定された。一方、保持時間と m/z だけでは構造が推定できない成分も検出されていた。以上の結果は、大黃甘草湯の薬効の評価を行う上で、指標成分とされる sennoside A だけの評価ではなく、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している。

一方、本モデルでは、カンゾウ中に含まれる代表的な成分は検出されなかった。その理由として、PCAの結果で示されている通り、エキス間でのカンゾウ由来成分のばらつきが、ダイオウ由来成分のばらつきに比べ小さく、カンゾウ由来成分の含量の変動がRA Cmax値に大きく影響しなかったことが考えられる。

■総括

本研究では、大黃甘草湯エキスの薬効を予想可能な新たな品質評価法の開発を目指し、エキス成分のメタボロームデータから、腸管内で生成するRA量を予測するモデルの構築に取り組んだ。

まず、様々なダイオウ、カンゾウの材料の組み合わせで調製した大黃甘草湯エキスを糞便懸濁液に添加し、生成するRA量を継時的に測定した。得られたRA Cmaxデータを目的変数、大黃甘草湯エキスのメタボロームデータを説明変数としてPLSに供し、エキス成分のメタボロームデータからRA Cmaxを予測するモデルを構築した。その結果、sennoside A含量との相関に比べ、高い相関関係が得られるモデルを構築することに成功した。当該モデルにより、エキスに含まれる様々な成分の情報から正確にRA Cmaxを予測することができ、より正確な薬効予測に繋がると考えられる。

また、本稿では示していないが、モデル構築に対し大きな寄与を示した成分について、それぞれの標準品を糞便懸濁液に添加したところ、これらの成分の中には実際にRAを生成するものや、その成分自身はRAを生成しないがsennosideの代謝を促進する効果があるものが存在することが確認された。以上のことから、RAの生成にはSAだけでなく様々な成分が関与し、それらの相互作用によりRA生成量またはRA生成速度が変化することが示された。これは大黃甘草湯エキスの複数成分を用いて、エキスの品質評価を行うことの必要性を改めて示唆している。

本研究では、漢方処方エキス成分のメタボロームデータを利用することにより、腸管内における活性本体生成量の精度の良い予測が可能であること、さらに代謝におけるエキス成分間の相互作用の検出が可能であることも示した。このような薬物動態学的評価に加え、さらに薬力学的評価を組み合わせることにより正確な薬効予測に繋がると考えられる。