

I-2 認知機能維持あるいはロコモティブシンドロームの 予防に有効な和漢薬の品質研究

学術研究部薬学・和漢系（和漢医薬学総合研究所） 教授 小松 かつ子

協力者

学術研究部薬学・和漢系（和漢医薬学総合研究所） 准教授 當 銘 一 文
（同） 助教 朱 姝

研究代表者である東田らはこれまでの基礎研究において山薬が認知機能改善作用を有すること¹、及びニクジュヨウが骨格筋機能改善作用を持つことを明らかにした²。本研究ではこれら2種類の生薬の安定供給体制を担保するために、優良生薬の品種を標準化する目的で研究を行う。今年度は、山薬について、活性成分であるジオスゲニンが高含量のものと低含量のものとの遺伝的差異を検討した。ニクジュヨウについては遺伝子多型に基づいて同定された3種の *Cistanche* 属植物（ニクジュヨウの基原として第十七改正日本薬局方³に収載）と *Boschniakia rossica*（ワニクジュヨウの基原として日本薬局方外生薬規格 2018⁴に収載）、及び *C. tuburosa* に由来する日本市場の生薬について活性成分⁵であるの *acteoside* (= *verbascoside*) 及び *echinacoside* を始めとする成分群の含有パターンを明らかにするための分析試料作成法と LC/MS 分析条件の検討を行った。

1. 山薬の遺伝子解析

背景・目的

山薬（サンヤク）は日本薬局方³に、ヤマノイモ科（*Dioscoreaceae*）のヤマノイモ *Dioscorea japonica* Thunberg 又はナガイモ *D. batatas* Decaisne の周皮を除いた根茎（担根体）であると規定されている。大井⁶はナガイモの学名を *D. batatas* として記載し、*D. polystachya* をその異名として扱っているが、現在国際的には *D. polystachya* が先に発表された学名として、採用されている（*International Plant Name Index*⁷参照）。今回、東田らが活性を報告している⁸ジオスゲニン高含量のヤマイモエキスの製造原料として使用される山薬と、同成分の含量が低い市場流通品の山薬及び食用の長芋の遺伝的差異を調べ、高含量の山薬の基原種を明らかにする目的で、*Dioscorea* 属植物の種の同定に有用であると報告されている⁹葉緑体 DNA の *matK* 遺伝子の部分配列の解析を行った。

実験材料

ジオスゲニン高含量のヤマイモエキスの製造原料として使用される山薬を(株)アンチエイジング・プロより入手し、2検体（Code No: Sanyaku-1, 2）について遺伝子解析を行った。比較には、(株)栃本天海堂より入手した日本市場品生薬のサンヤク（江蘇省産）

(TMWP No. 30629) 及び富山市内のスーパーマーケットより購入した長芋 (北海道産) を各 1 検体 (Code No: Sanyaku-D、Nagaimo-1) 解析した。

実験方法

材料の一部を削り、約 100 mg を steal beads とともに 2 ml チューブに入れ、 -80°C で 1 時間冷凍した。Tissuelyser (QIAGEN, Germany) で 30/sec、2.5 分間振動させ、試料を粉末にした。Steal beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて tDNA を抽出した。その後、抽出液の一部 ($1\ \mu\text{L}$) について 1% アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた tDNA の状態を確認した。次にこの tDNA を鋳型とし、PCR 法で葉緑体 DNA の *matK* 遺伝子領域を増幅した (図 1)。生薬材料では、*matK* 全領域を 2 分割し、それぞれプライマーセット MF-M658R と M499F-MR を使用して増幅した (表 1)。PCR 反応には KOD-FX Neo DNA polymerase (東洋紡社) を用いた。反応条件は、ホットスタート 94°C 4 分、続いて熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 50°C 30 秒、伸長反応 68°C 60 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 68°C 7 分で終了し、 4°C で保存した。得られた PCR 産物のうち $1\ \mu\text{L}$ について 1% アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認し、その残りを Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社, USA) で精製した。

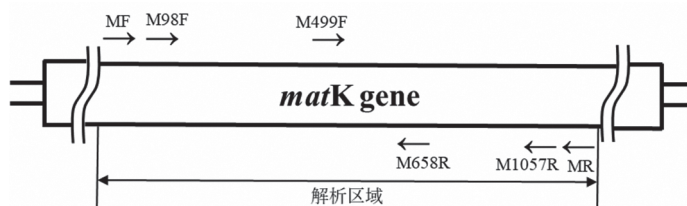


図 1 葉緑体 DNA の *matK* 遺伝子領域とプライマーの位置

精製した PCR 産物にシーケンシング反応を行った。反応条件は、ホットスタート 96°C 1 分、続いて熱変性 96°C 10 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 4 分の条件を 25 サイクル行い、得られた産物を 4°C で保存した。反応終了後、BigDye X TerminatorTM Purification Kit (Applied Biosystems) を用いて精製し、上澄み液を MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate に移し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で、塩基配列を決定した。

表 1 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの配列

Primer	Sequence (5'→3')	Length (bp)	Used for
Forward primer			
MF	ATT TGC GAT CTA TTG ATT CAA T	22	PCR
M98F	TAC CCC ATC CCA TCC ATC TG	20	Sequencing
M499F	AAG CAA TTC TGG TGT CAA AGG G	22	PCR & sequencing
Reverse primer			
MR	TGA GAT TCC GCA GGT CAT T	19	PCR
M658R	GCA TTT GAC TCC TTA CCA CGG	21	PCR & sequencing
M1057R	ACC GAA AAA GAG CTT GAG GGA	21	Sequencing

結果及び考察

解析した 4 検体の葉緑体 DNA の *matK* 遺伝子の部分配列は 1096 bp であり、全検体から得られた配列が完全に一致した。また、解析した配列を用い、GenBank においてホモロジー検索 (BLAST 検索) を行った結果、GenBank に異なる研究グループにより登録されている *D. polystachya* の同領域の塩基配列^{9,10}と 100%の相同性を示した。Sun ら⁹は中国各地で採集された *D. polystachya* 11 検体について *matK* 遺伝子の部分配列を解析しており、結果として 3 タイプの配列が確認され、3 タイプの間ではそれぞれ 1 塩基の違いがあったことを報告している。今回得られた配列は 3 タイプの内、最も多くの検体が示した 1 タイプの配列と完全に一致した (Accession No. JQ260048~JQ260050)。これらの 3 タイプは採集地とは関連がないと考えられた。以上から、今回解析したジオスゲニン高含量のヤマイモエキスの製造原料として使用される山薬の基原植物は *D. polystachya* (= *D. batatas*) であると考えられる。なお、Sun ら⁹は今回検討した *matK* 遺伝子領域の他、*rbcL* 遺伝子領域及び *psbA-trnH* IGS 領域でも遺伝子多型を検討している。同属植物では 3 領域の内、*matK* 遺伝子領域が最も種の同定に有用であると報告しているが、その有効性は 30%以下であるとされる。

今後、山薬の加工調製法による、ジオスゲニンなどの含有成分の変化を検討する予定である。

2. ニクジュヨウの成分プロファイル

背景・目的

ニクジュヨウ (肉蓯蓉) は、神農本草経の上品に収載され、古来、腎陽を補い、精血を増し、腸を潤し、便を通ずるなどの効能で応用されてきた。その基原として日本薬局方³に、ハマウツボ科 (Orobanchaceae) の *Cistanche salsa* (C. A. Meyer) G. Beck ホンオニク、*C. deserticola* Y. C. Ma、又は *C. tubulosa* (Schrenk) Wight の肉質茎であると規定され

ている。これらの内、*C. deserticola* 及び *C. tubulosa* は中華人民共和国薬典¹¹にも基原として規定されている。さらに、同科の *Boschniakia rossica* (Cham. et Schltdl.) B. Fedtsch. ex Fedtsch. et Flerov オニクの全草は、ワニクジュヨウとして日本薬局方外生薬規格 2018⁴に収載されている。東田らは、ニクジュヨウの骨格筋機能改善作用をもつ化合物としてフェニルエタノイドである *acteoside* (= *verbascoside*) を見出し、本化合物の投与により、骨格筋から *pyruvate kinase M2* (PKM2) が分泌され中枢神経系へ移行し軸索伸展促進作用と骨格筋増加作用を示すことを明らかにしている⁵。さらに、*acteoside* にグルコースが1分子追加された *echinacoside* にも同様の活性を明らかにしている。本研究では、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにすること、それらに含まれる2つの活性化合物の含量を調べることを目的とする。今年度はニクジュヨウの分析条件の確立を目指した検討を行った。

実験材料

植物材料は、国立医薬品食品衛生研究所生薬部等で同定され、提供された以下の植物の乾燥した茎を用いた。

C. deserticola (中国内蒙古自治区産)、*C. tubulosa* (中国新疆ウイグル自治区産)、*C. salsa* (中国寧夏回族自治区産)、*B. rossica* (日本山梨県産)。

また、生薬材料として栃本天海堂から購入したニクジュヨウ(中国新疆ウイグル自治区産、TMPW30531、基原は *C. tubulosa*) を用いた。

実験方法

試料調製

各検体の茎を24時間以上凍結乾燥し、粉碎した。(乾燥試料として入手したが、吸湿性が高く、保存中に吸湿した。)粉末試料を秤量し、50%メタノールを加え、超音波抽出を行った。その間、*vortex* ミキサーで適宜試料を攪拌した。使用した溶媒量、抽出時間は、結果に記載した。遠心後、得られた上清を0.20 µm フィルターでろ過し、LC/MS用分析試料とした。

LC/MS 分析条件

LC/MS システムは、島津製作所製 Prominence HPLC システム及び LCMS-IT-TOF を用いた。分析条件は以下のとおり。

Column: Waters Atlantis T3 column (S-3 µm, 2.1×150 mm), flow rate: 0.2 mL/min.

Solvent system: A; water with 0.1% formic acid, B; MeCN with 0.1% formic acid, 10% B (0-2min), 10-25% B (2-17 min), 25-100% B (17-20 min).

Sample injection: 5 µL

Column temperature: 40°C

Detection: 190-400 nm for UV, *m/z* 100-1000 for MS.

結果及び考察

1) 抽出条件の検討

既報¹²では、粉末試料を50%メタノールで振とう抽出し、抽出液を減圧乾固した後、溶媒に再溶解してHPLC分析していた。この方法では、減圧乾固工程があり、時間がかかる。より簡便な抽出法を開発するため、今回、粉末試料を50%メタノールで超音波抽出することを検討した。

条件1では、粉末試料200 mgを50%メタノール10 mLで5分間超音波抽出し、遠心分離(4,000 rpm、5分間)を行った。この操作を2回繰り返し、20 mLにメスアップした。その後0.20 µm フィルターでろ過し、LC/MS分析に用いた。しかし、分析中にカラムが目詰まりを起こし、ラインの圧力が高くなってしまい、分析が行えなかった。この原因として、分析を待つ間に不溶性のものが試料中に生じているためであると考え、次に遠心操作を2回行うこととした。**条件2**では、粉末試料100 mgを50%メタノール5 mLで5分間超音波抽出し、遠心分離(4,000 rpm、5分間)を2回行ったものを0.20 µm フィルターでろ過し、LC/MS分析に用いた。**条件2**の抽出物では目詰まりは起こらなかったことから、以後の抽出はこの条件を用いることとした。

2) LC/MSによる成分比較

上記の**条件2**で抽出した試料についてLC/MS分析を行い、ニクジュヨウの主要化合物の検出と、成分パターンについて比較を行った。これらのLC/MSのクロマトグラムは、基原種が異なっても類似したクロマトグラムパターンを示した。主要な化合物として下記の6種のフェニルエタノイド類が検出された(表2、図2)。

表2 検出されたフェニルエタノイド類

化合物	分子式	保持時間(分)	<i>m/z</i>
cistanoside F (1)	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	5.6	487.1 [M-H] ⁻
echinacoside (2)	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	14.9	785.2 [M-H] ⁻
cistanoside A (3)	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	17.3	799.3 [M-H] ⁻
acteoside (4)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	18.7	623.2 [M-H] ⁻
isoacteoside (5)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	20.1	623.2 [M-H] ⁻
2- <i>O</i> -acetyl acteoside (6)	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	22.5	665.2 [M-H] ⁻

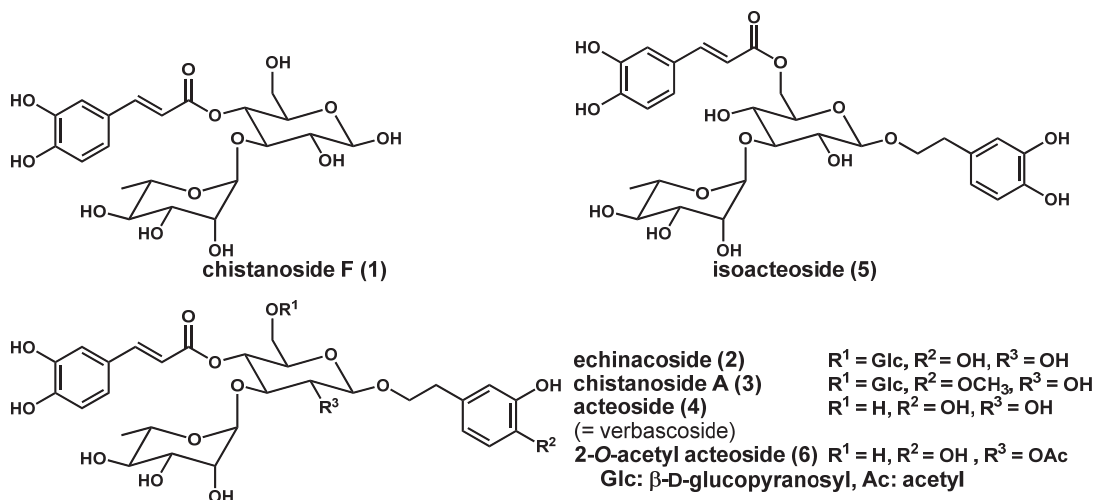


図2 化合物1-6の構造式

対象として用いた生薬材料 (*C. tubulosa*) のLC/MSのクロマトグラムを以下に示す

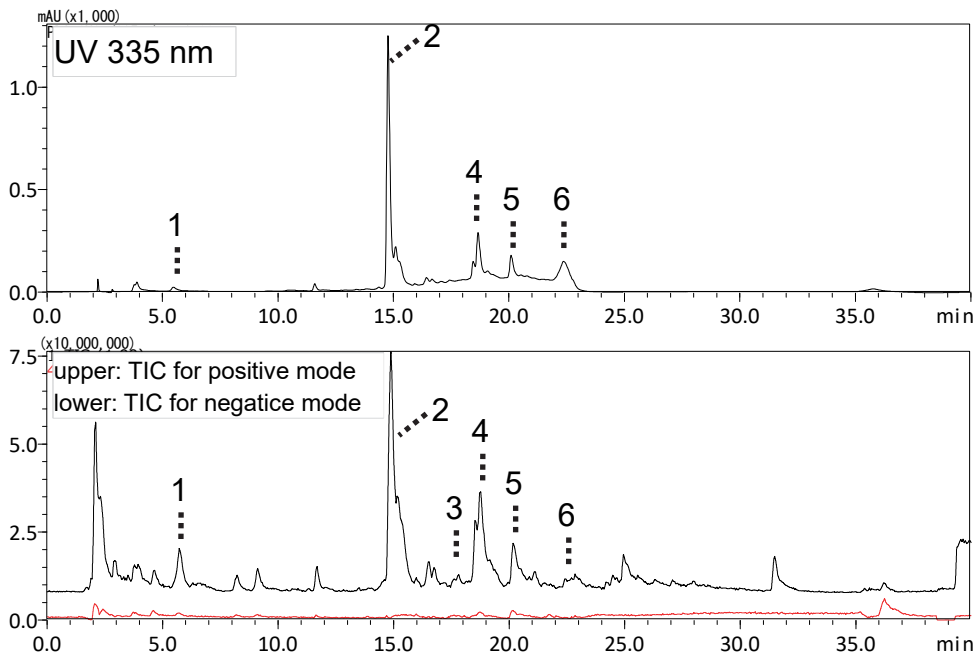


図3 *C. tubulosa* に由来する生薬ニクジュヨウのクロマトグラム
(上 UV 335 nm, 下 LC/MS)

また、これら化合物の各材料での存在の有無は以下の通りであった。

表 3 各材料において検出された化合物

化合物	植物材料				生薬材料
	<i>C. deserticola</i>	<i>C. tubulosa</i>	<i>C. salsa</i>	<i>B. rossica</i>	<i>C. tubulosa</i>
cistanoside F (1)	+	++	++	+	++
echinacoside (2)	+	++	++	++	++
cistanoside A (3)	++	+	-	+	+
acteoside (4)	+	++	++	+	+
isoacteoside (5)	++	++	+	+	++
2-O-acetyl acteoside (6)	+	-	+	+	+

+: 検出された。++: 強いピークとして検出された。 -: 検出されなかった。

C. salsa において 3 は検出されなかった。植物材料の *C. tubulosa* において 6 は検出されなかったが、*C. tubulosa* を基原とする生薬市場品においては検出された。他の化合物は今回試験したすべての検体で検出された。クロマトグラムのピーク面積を比較すると今回試験した中では、*C. tubulosa* は 1、2、4、5 が他と比較して多いか、同程度含まれることがわかり、これらの含量が高いことが予想された。また、*C. salsa* においては 1、2、4 の含量が高いと予想されるものの、5 の含量は *C. tubulosa* に比べると低いと予想された。活性化合物 2、4 に着目すると、*C. deserticola* は他と比較すると、その含量が低いと予想されたことから、骨格筋機能改善作用を期待する場合、*C. tubulosa*、*C. salsa* を基原とする生薬の使用が良いと考えられた。一方、Lei らの総説論文¹³では、*C. deserticola*、*C. tubulosa*、*C. salsa* においてこれら 6 化合物が複数の論文で報告されていることが記載されている。今回は各植物について、1 検体ずつを用いて分析した。一部の検体では検出されていない化合物があったが、今回用いた検体では当該化合物の含量が低かったともうと考えられた。今後検体数を増やし、定量を行って、その結果を比較する予定である。

結論

ニクジュヨウの基原植物及び生薬について、基原、産地の異なる試料の成分的多様性を明らかにし、同生薬の標準化に寄与することを目的として研究を開始した。今年度は、分析試料作成法と LC/MS 分析条件の確立を目指して検討を進め、既報より簡便な超音波抽出法でも LC/MS 分析が可能であることを明らかにした。今後は、各植物・生薬の検体数を増やし、また LC/MS 分析条件の最適化を行って、基原植物、産地の違いによる成分パターンの差異をクロマトグラム及び多変量解析により明らかにするとともに、

ニクジュヨウに含まれる化合物について同定を行う。また、東田らによりニクジュヨウの骨格筋機能改善作用を示す化合物として報告されている 2 種のフェニルエタノイド類 (acteoside、echinacoside)、及び関連する化合物について HPLC による定量分析を行う。その結果をもとに、高い有効性が期待できるニクジュヨウの品質に関する知見を蓄積し、高品質のニクジュヨウの選別及びその加工調製法の確立に応用し、単味生薬エキス製剤としての開発に貢献したい。

参考文献

- 1) Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. (2012) Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D3-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep.* 2012;2:535. DOI: 10.1038/srep00535.
- 2) Kimbara Y, Shimada Y, Kuboyama T, Tohda C. (2019) *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight extract enhances hindlimb performance and attenuates myosin heavy chain II_d/II_x expression in cast-immobilized mice. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* 9283171. DOI:10.1155/2019/9283171.
- 3) 厚生労働省, 2016 年. 第十七改正日本薬局方, p. 1813 (サンヤク), pp. 1876-1877 (ニクジュヨウ).
- 4) 局外生規 2018 出版検討会, 2020 年. 和英対訳日本薬局方外生薬規格 2018, pp. 201-202, 薬事日報社, 東京.
- 5) Kodani A, Kikuchi T, Tohda C. (2019) Acteoside improves muscle atrophy and motor function by inducing new myokine secretion in chronic spinal cord Injury. *J. Neurotrauma*, 36: 1935-1948. DOI:10.1089/neu.2018.6000.
- 6) 大井次三郎, 1972 年. 日本植物誌 (顕花篇) 改訂新版, pp. 386-389, 至文堂, 東京.
- 7) IPNI (2020). International Plant Names Index. Published on the Internet <http://www.ipni.org>, The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens.
- 9) Sun XQ, Zhu YJ, Guo JL, Peng B, Bai MM, Hang YY (2012) DNA Barcoding the *Dioscorea* in china, a vital group in the evolution of monocotyledon: Use of *matK* gene for species discrimination. *PLoS ONE* 7(2): e32057. DOI:10.1371/journal.pone.0032057.
- 10) Cao JL, Jiang D, Zhao ZY, Yuan S, Zhang YJ, Zhang T, Zhong WH, Yuan QJ, Huang LQ (2018) Development of chloroplast genomic resources in chinese yam (*Dioscorea polystachya*). *Biomed Res Int* 2018: 1-11. DOI:10.1155/2018/6293847.
- 11) 国家薬典委員会編, 2015 年. 中華人民共和国薬典 2015 版, 第一部, p. 135, 中国医薬科技出版社, 北京.
- 12) 花岡信義, 石塚康弘, 林 克彦, 屠 鵬飛, 神本敏弘, 袴塚高志, 合田幸広 (2015)

生薬「肉蓯蓉」と「和肉蓯蓉」の基原植物の成分比較. 生薬学雑誌 69: 1-9.

- 13) Lei H, Wang X, Zhang Y, Cheng T, Mi R, Xu X, Zu X, Zhang W. (2020) Herba *Cistanche* (Rou Cong Rong): A review of its phytochemistry and pharmacology. Chem. Pharm. Bull. 68: 694-712. DOI:10.1248/cpb.c20-00057.