

## I-2 認知機能維持、ロコモティブシンドロームの予防、 あるいは頸椎症性脊髄症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

学術研究部薬学・和漢系（和漢医薬学総合研究所） 助教 朱 妹

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<sup>1</sup>、およびニクジュヨウが骨格筋機能改善作用をもつことを明らかにした<sup>2</sup>。本研究ではこれら2種類の生薬について、有効性・安全性・安定性が担保された生薬を供給する目的で、優良生薬の基原種の選択、最適な加工法などを決定するための品質評価研究を行う。今年度は、山薬について、活性成分であるジオスゲニンの高含量化を目指して、加水分解処理や発酵処理による影響を検討した。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十八改正日本薬局方<sup>3</sup>に記載）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 2018<sup>4</sup>に記載）、および *C. tuburosa* に由来する日本市場の生薬について活性成分<sup>5</sup>である acteoside (=verbascoside) および echinacoside を始めとする成分群の含量を明らかにするための分析試料を作成し、<sup>1</sup>H NMR 法による定量法（qHNMR）について検討を行った。

### 1. サンヤクのジオスゲニン高含量化に向けた研究

#### 背景・目的

山薬（サンヤク）は日本薬局方<sup>3</sup>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* Decaisn (= *D. polystachya* Turcz.) の周皮を除いた根茎（担根体）であると規定されている。本研究では、日本市場に流通しているサンヤクについて、東田らが認知機能改善作用を報告しているジオスゲニン<sup>1</sup>を増やすための加工調製方法の開発を目的にした。サンヤクにはジオシンなどのスピロスタン型ステロイド配糖体が含まれるが、そのアグリコンがジオスゲニンであることから、ステロイド配糖体の加水分解を行うことでジオスゲニン量を増加させることが可能と考えた。加水分解の方法として、硫酸処理、酵素処理、および麹菌を用いる方法を検討した。

#### 実験材料

ステロイド配糖体高含量のサンヤク（TMWP No. 31107、詳細非公開）、および栃本

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）を用いた。

## 実験方法

### 1) サンヤクの硫酸処理

サンヤク（TMWP No. 31107）の粉末 2 g に 2M 硫酸水溶液を 40 mL 加え、95°C の熱水中で 8 時間加熱した。飽和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液で中和し、上清を除いた後、沈殿を超純水で洗浄し、凍結乾燥した。乾燥後、加水分解処理後のサンヤクを 80% メタノール水溶液 40 mL に懸濁させ、超音波処理 30 分を 2 回繰り返す、得られた上清を溶媒留去、乾燥した。これをエタノール 1 mL で溶解し 0.22 μm のフィルターでろ過後、LC/MS 分析に供した。

### 2) サンヤクの酵素処理

サンヤク（TMWP No. 31107）を 50% メタノール、水、メタノールで抽出し、それらを合わせたエキス 200 mg（サンヤク 1.6 g に相当）を 0.1 M クエン酸緩衝液（pH 5）4 mL に溶解し、アロマーゼ H2（天野エンザイム）80 mg を加えて 40°C で 16 時間加熱した。その後反応混合物を凍結乾燥し、メタノール 1 mL を加え、30 分間超音波抽出した。遠心分離（14000 rpm、2 分）して得られた上清を 0.22 μm のフィルターでろ過後、LC/MS 分析に供した。

### 3) サンヤク麴の調製および糖化处理

乳鉢で米粒大に粉碎したサンヤク（TMWP No. 30629）50 g に水 20.2 mL と麴菌（*Aspergillus oryzae*、bioc 社製）を 10<sup>6</sup> cells/g になるように添加後、35°C/相対湿度 98% で 48 時間培養し、サンヤク麴を調製した。糖化处理は、サンヤク麴 5 g に脱塩水 3.38 mL（水分が乾燥重量の 2 倍量となるように）添加し、55°C の水浴で 24 時間保温した。その後、遠心分離により上清と沈殿に分け、上清をそのまま LC/MS 分析に供した。また、沈殿についてはエタノール 10 mL を加え、ホモジナイズする操作を 3 回繰り返す、得られた上清を合わせて溶媒留去し、2 mL のエタノールに溶解し 0.22 μm のフィルターでろ過後、LC/MS 分析に供した。

### LC/MS 分析条件

LC/MS システムは、島津製作所製 Prominence HPLC システムおよび LCMS2020 を用いた。分析条件は以下のとおり。

Column: Acquity CSH C18 column (2.1×100 mm)	Flow rate: 0.2 mL/min
Solvent system: A; water, B; MeCN, 70-100% B (0-20 min)	Sample injection: 5 μL
Detection: MRM transition Q1/Q3 = 415.5/271.4	Column temperature: 40°C

## 結果および考察

サンヤクについて 2 M の硫酸中で加熱することで加水分解を行い、その抽出物につ

いて LC/MS による分析を行った結果、保持時間 14 分にジオスゲニンのピークが検出された。一方、10M の硫酸で処理したものではジオスゲニンは検出されなかった。また、加水分解酵素であるアロマーゼ H2 を用いて、加水分解処理を行ったものでは、ジオスゲニンのピークは検出できなかった。そこで、*A. fumigatus* から得られた  $\beta$ -グルコシダーゼにより *Dioscorea* sp. 含有のスピロスタン型ステロイド配糖体からジオスゲニンが生成するとの報告<sup>6</sup>があったことから、同じ *Aspergillus* 属の麹菌 (*A. oryzae*) の利用を検討した。サンヤクを麹菌で処理することによりグルコシダーゼ活性が 1751 U/g となった。しかしサンヤク麹の状態ではジオスゲニンが検出されなかった。続けて糖化処理を行ったところジオスゲニンが検出できることを確認した。現在、6 種類の菌株で培養したサンヤク麹の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性の測定と糖化処理後の分析によるジオスゲニンの検出の検討を進めている。今後、ジオスゲニンの定量を行い、最も  $\beta$ -glucosidase の活性が高く、ジオスゲニン含量も高い菌株の特定と処理方法の検討を行う予定である。

## 2. ニクジュヨウの NMR による成分プロファイリング

### 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<sup>3</sup>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* および *C. tubulosa* は中華人民共和国薬典<sup>7</sup>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 2018<sup>4</sup>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<sup>5</sup>。さらに、*acteoside* にグルコースが 1 分子追加された *echinacoside* についても活性化化合物である可能性を検討している。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抽出物について <sup>1</sup>H NMR 法による定量法 (qHNMR) の可能性について検討を行った。

### 実験材料

栃本天海堂から購入した生薬ニクジュヨウ (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100 mgに、80%メタノールを5 mL加え、超音波抽出(15分)を2回繰り返した。遠心分離(4000 rpm、10分)後、溶媒留去・凍結乾燥を行った。得られたエキスをDMSO- $d_6$ またはCD $_3$ ODに溶解させ $^1$ H NMRを測定した。

Chemfaces社より購入したechinacoside、acteoside、isoacteoside(図1)についてはDMSO- $d_6$ またはCD $_3$ ODに溶解させ $^1$ H NMRを測定した。

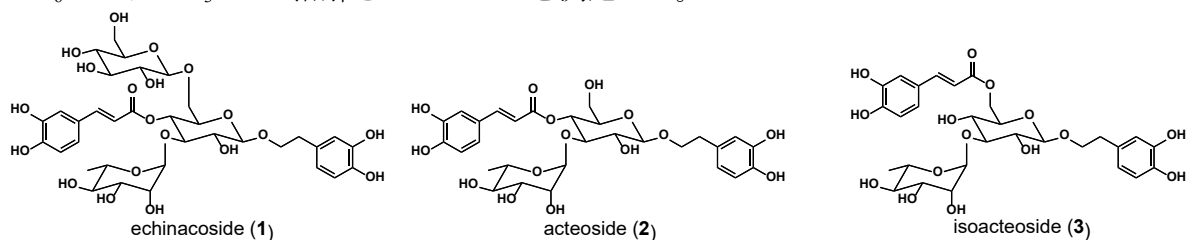


図1 フェニルエタノイド類の構造式

### 結果および考察

抽出溶媒の検討を行ったところ、熱水エキスは、NMR用のDMSO- $d_6$ またはCD $_3$ ODに溶解しないことから、本研究に適さないことがわかった。一方、含水メタノールで抽出したエキスはDMSO- $d_6$ またはCD $_3$ ODに十分溶解することを確認した。HPLCを用いた検討でメタノールの濃度を検討したところ、80%メタノールで抽出した際に最も高い抽出効率が得られたため、以後のニクジュヨウの抽出は80%メタノールで行うこととした。

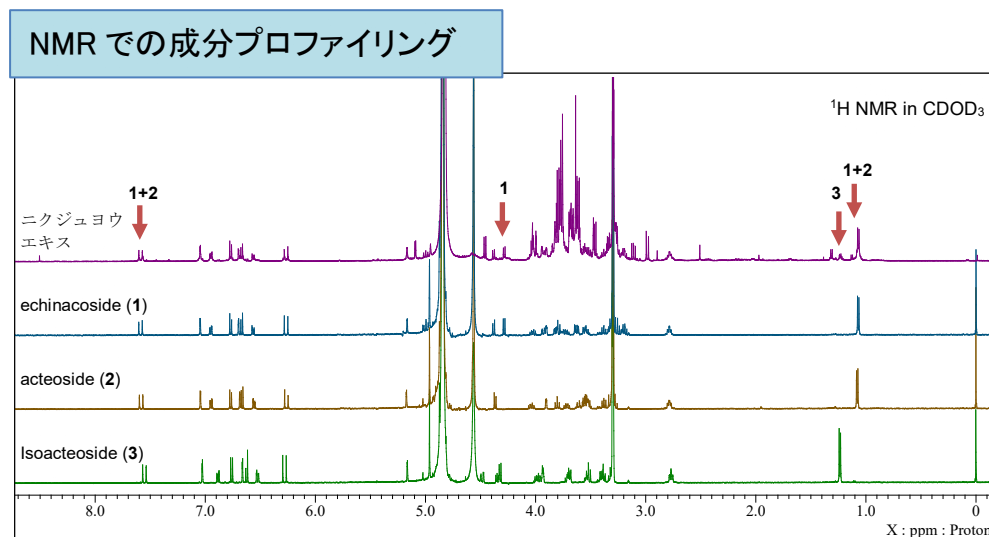


図2 ニクジュヨウエキスとフェニルエタノイド類の $^1$ H NMR スペクトル

ニクジュヨウエキスを DMSO- $d_6$  または CD<sub>3</sub>OD に溶解し測定した <sup>1</sup>H NMR スペクトルと、ニクジュヨウの代表的なフェニルエタノイド成分である echinacoside、acteoside、isoacteoside のスペクトルとを比較した (図 2)。その結果、CD<sub>3</sub>OD 中で測定したスペクトルにおいて、フェニルエタノイド類のシグナルはニクジュヨウエキスのスペクトルにおいても十分な感度をもって検出できることを確認し、その量の大小を簡便に見積もることができることがわかった。これらのシグナルにはエキスのスペクトルにおいて比較的よく分離して観測されているものがあり、これらのシグナルを用いて、定量 NMR 法 (qHNMR 法) によるフェニルエタノイド類の定量分析の可能性が示唆された。また、これら化合物は共通する骨格構造をもち、共通するシグナルを示すことから、骨格構造が共通する化合物を一括して定量できることがわかった。さらに化合物ごとに特徴的な部分構造の違いに起因するシグナルが確認され、それらを用いた化合物ごとの定量が可能であることがわかった。一方、ニクジュヨウエキスの DMSO- $d_6$  中で測定したスペクトルにおいては、シグナルは明瞭に観測されるものの、ベースラインの上昇が認められ、qHNMR 法には適さないことがわかった。

今後、基原、産地の異なるニクジュヨウサンプルについて HPLC による成分定量、<sup>1</sup>H NMR による成分プロファイリング、および qHNMR 法によるフェニルエタノイド類の定量分析を行い、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。

## 結論

ニクジュヨウの基原植物および生薬について、基原種、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、ニクジュヨウエキスの <sup>1</sup>H NMR を利用した分析条件の確立を目指して検討を進めた。

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)、および isoacteoside について qHNMR 法により、一括して、または個々に定量分析が可能であることが明らかになった。また、その分析条件を決定した。

今後は、並行して行っている HPLC による成分定量の結果と qHNMR 法による定量分析結果とを合わせて解析を行い、それぞれの測定法の利点、問題点を明確にし、より簡便で正確なニクジュヨウの成分分析法の確立を目指す。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およ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する。

## 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*, 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<sub>d</sub>/II<sub>x</sub> Expression in Cast-Immobilized Mice. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* 9283171. DOI:10.1155/2019/9283171.
  - 3) 厚生労働省, 2021 年. 第十八改正日本薬局方, p. 1952 (サンヤク), pp. 2017-2018 (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) Lei J, Niu H, Li T, Huang W. (2012) A novel  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigates* releases diosgenin from spirostanosides of *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright (DZW). *World J Microbiol Biotechnol*, 28: 1309-0314. DOI:10.1007/s11274-011-0907-z.
  - 7) 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, 中国医药科技出版社, 北京.