

I. 高齢者疾患を制する和漢薬研究：製品化に向けた臨床研究と品質研究

学術研究部薬学・和漢系（和漢医薬学総合研究所）

教授 東田千尋

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

【研究概要】

背景：現代社会で問題化している疾患と治療の現状

現代社会は高齢化に突入し、治療法の確立が喫緊の課題となっている疾病が増えている。その代表的なものとして、認知症、ロコモティブシンドローム、頸椎症性脊髄症に着目した。

日本の2025年の認知症患者数は700万人を超えるとの推計値が出された（2015年1月厚生労働省発表）。我が国の65歳以上高齢者の約5人に1人が認知症患者となる計算である。日本のみならず、高齢化問題に直面している世界各国においては、“認知症の克服”が逼迫した重要課題となっている。近年、超早期診断の実現に向けた研究も進められているが、「認知症を予防する・治療する薬があること」こそが、今と未来の患者を救うために最も望まれているといえる。なかでも「アルツハイマー病」は認知症の原因疾患として全体の約50%以上を占める。アルツハイマー病の原因物質であるAmyloid β の脳内での蓄積が神経回路網を破綻させるが、現在、アルツハイマー病に対して臨床で使用されている薬剤（ドネペジル、メマンチン、ガランタミン等）は、症状の進行を抑制するための「対症療法薬」であり、疾患を根本的に治療するものではない。また近年、Amyloid β の抑制を狙った新しい治療薬の開発が進められてきたが、Amyloid β の減少が認知機能改善につながっていない臨床研究結果が数多く示されており、原因物質を減らすことが認知症治療薬として最善の戦略ではないことが示唆されている。

ロコモティブシンドロームは、「運動器の障害のために移動機能の低下をきたした状態」のことを表し、2007年に日本整形外科学会によって新しく提唱された概念である。社会の高齢化に伴い、介護の原因に運動器の障害が大きくかかわるようになった。しかし、筋肉や骨を強化するための運動介入や栄養強化が勧められているのが現状であり、効果的な方策は十分でない。

頸椎症性脊髄症は、頸椎脊柱管の狭い状態での頸椎の加齢性変化による脊髄圧迫によって脊髄麻痺（四肢のしびれ感、手指の巧緻運動障害、歩行障害、膀胱障害）を発症する疾患の総称であり、頸椎圧迫が生じる割合は年齢とともに増加し60歳以上では20%を超える。頸椎圧迫が高度の場合は手術適用となり、薬物療法としては鎮痛薬などの対症療法しかない。手術で圧迫を除去しても、それまでに進行した神経細胞のダメージによる機能障害は回復せず、根本的治療となるような機能改善薬の開発が望まれている。

本研究の目的と進捗状況

認知症において、神経機能の障害をもたらす直接的な要因は神経回路網の破綻である。認知機能の亢進に重要なことは、破綻した神経回路網を再構築させることであり、それが患者に負担の少ない薬物によってなされれば理想的である。研究代表者・東田は、萎縮した神経突起を修復し神経回路網を再構築することで認知機能を改善する和漢薬の作用を(生薬エキス、活性成分、漢方方剤)を、アルツハイマー病モデルマウスで見出してきた。中でも顕著な活性を示す“ジオスゲニン含有山芋(=山薬、サンヤク)エキス”に関して、ヒトでの効果を検証することを本研究の目的とした。そこで、特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」を実施し、今年度は被験者全38名の服薬および検査を終えた。認知機能検査および、脳内軸索、脳内炎症、脳内 amyloid を反映する血漿バイオマーカーの定量に関して、現在統計解析を実施中である。

また認知機能を向上させることに直接かかわるサンヤク中の活性成分はジオスゲニンであることを2020年度に明らかにしたことから、今年度は、ジオスゲニンの薬理作用の分子機序、特に脳内で萎縮した軸索を再伸長させ正しく投射させるメカニズムについて詳細に明らかにした。

また東田はこれまでに、脊髄損傷慢性期マウス、廃用性筋萎縮マウスを用いた研究により、骨格筋に投射する軸索の伸展を促して骨格筋萎縮を改善し、運動機能改善作用を示す和漢薬としてニクジュヨウを同定し、ニクジュヨウ中の活性成分がアクテオシドであることを見出した。そこで本研究ではこれまでの基礎研究の成果に基づき、ニクジュヨウエキスのヒトでの効果を検証することを目的とした。まずロコモティブシンドロームに対するニクジュヨウエキスの効果を検証する臨床研究を実施した(2020年度終了済み)。また2021年度からは特定臨床研究「頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」を実施し、今年度は症例組み入れを35名まで進めた。加えて、頸椎症性脊髄症におけるニクジュヨウエキスの作用機序を詳細に検討するために、新たなモデルマウスを確立し、ニクジュヨウエキス経口投与の効果、アクテオシド経口投与の効果を検討した。

研究分担者・當銘は、サンヤクに関しては、ジオスゲニン含量の高いサンヤクを安定的に得るための加工法の違いによる品質研究を行った。ニクジュヨウに関しては、生薬やエキスの標準化に資する成分的多様性の解析と、正確で簡便な成分分析法の確立を目指し、エキス中の成分であるアクテオシドおよびエキナコシドのHPLC法および定量NMR法による分析を行った。

I-1 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臨床研究と製品開発

学術研究部薬学・和漢系（和漢医薬学総合研究所） 教授 東田 千尋

協力者

学術研究部薬学・和漢系（和漢医薬学総合研究所） 助教 稲田 祐奈

学術研究部薬学・和漢系（和漢医薬学総合研究所） 助教 楊 熙蒙

はじめに

高齢化社会に直面している今、脳の衰えと身体の衰えをいかにくい止め、健康寿命を延伸させられるが大きな課題となっている。本研究は以下の3つの疾病に対して有効な薬物を開発することを目的としている。

増加し続ける認知症に対する対策は世界的急務であるが、現状、認知障害に有効な薬は開発されていない。また加齢に伴う運動器の衰えであるロコモティブシンドロームは、運動介入、食事療法が主体であり、それらの効果の程度は極めて限定的である。頸椎症性脊髄症は、頸椎脊柱管の狭い状態での頸椎の加齢性変化による脊髄圧迫によって脊髄麻痺（四肢のしびれ感、手指の巧緻運動障害、歩行障害、膀胱障害）を発症する疾患の総称であり、頸椎圧迫が生じる割合は年齢とともに増加し60歳以上では20%を超える。頸椎圧迫が高度の場合は手術適用となり、薬物療法としては鎮痛薬などの対症療法しかない。手術で圧迫を除去しても、それまでに進行した神経細胞のダメージによる機能障害は回復せず、根本的治療となるような機能改善薬の開発が望まれている。

以上の現状を解決するために本研究では、認知機能を維持する薬物としてサンヤクエキスの基礎研究と臨床研究、ロコモティブシンドロームを予防する薬物としてニクジュヨウエキスの臨床研究、頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの効果を検討する基礎研究と臨床研究を進め、それぞれを治療薬として開発することを目指している。基礎研究によるメカニズム解明とともに、ヒトでの有効性と安全性のエビデンスを得て、かつ分担者・当銘が進める、適切な生薬選定に資する研究成果をレギュレーションに生かすことで、単味生薬エキスとして医薬品へと開発するために必要なデータを総合的に蓄積する。

研究結果

1. サンヤクに関する研究

1-1 ジオスゲニン高濃度サンヤクエキスによる臨床研究

<研究の背景および目的>

研究代表者・東田の以前の研究によって、ジオスゲニンが、アルツハイマー病モデルマ

ウス(5XFAD)の記憶障害を改善し(1)、さらに正常マウスの認知機能も高めることが明らかになっている(2)。ジオスゲニンの特徴として、アルツハイマー病モデルマウス脳内のアミロイド凝集や神経原線維変化を減少させる作用を示すとともに、軸索変性を修復する作用がある(1)。これは現在の標準治療や開発中の候補薬にはない特性であり、認知機能の改善により効果が期待できる可能性がある。

2020年度に示したように、通常のサンヤク水エキスにはジオスゲニンが含有されず、認知機能に対する効果が期待できない(3)。以前に健常人を対象として行った臨床試験では、特定の製法によりジオスゲニンの含有量を16%にコントロールしたサンヤクエキスを用い、健常人を対象としたランダム化二重盲検クロスオーバー試験を行った結果、サンヤクエキス投与群(ジオスゲニン量として8 mg/日、12週間服用)ではプラセボ投与群と比較して有意に認知機能が向上した(4)。この健常人での臨床研究の成果に基づき、本研究では認知機能障害の患者での同エキスの効果を検証した。

<研究方法>

特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」を計画し、富山大学倫理委員会の承認を得て厚生労働大臣への届出を行った（臨床研究実施計画番号 jRCTs041200036）。

被験者の選択基準は、・同意日の年齢が40歳以上85歳以下の方。・富山大学杉谷キャンパス内で行われる検査に参加可能な方。・DSM-5による、軽度認知障害または軽度アルツハイマー病の診断基準を満たす方。軽度アルツハイマー病患者の場合、コリンエステラーゼ阻害薬(アリセプト、レミニール、またはリバスタッチ)のみの服用をしている方。・スクリーニング時の簡易認知機能検査(Mini-Mental State Examination: MMSE)スコアが20点以上の方。・臨床検査用の血液検体提供に同意する方。・本人が試験薬の摂取可能で、本人または家族が試験薬の服薬管理をできる方。・試験期間中は市販の山芋エキス製品を服用しないことに同意する方。・試験期間中は運動習慣、食習慣等の生活習慣の極端な変更をしないことに同意する方。とした。

試験薬による介入（二重盲検）

プラセボ群：プラセボカプセルを1回につき3カプセルを、1日に2回（6カプセル/日）、水または白湯で飲む。これを24週間、毎日続ける。

試験薬群：試験薬カプセルを1回につき3カプセルを、1日に2回（6カプセル/日）、水または白湯で飲む。これを24週間、毎日続ける。

試験薬の用量は、16.7 mgエキス/カプセル（ジオスゲニン量に換算すると2.67 mg/カプセル、16 mgジオスゲニン/日）とした。プラセボとしては、添加剤のみを入れ外観からは試

験薬と見分けのつかないカプセルを準備した。

目標症例数

合計 40 例（プラセボ 群 20 例、試験薬 群 20 例）

主要評価項目

- 1) Mini Mental State Examination (MMSE)の質問項目の得点の合計を算出し、投与前後の得点の変化量を算出して群間比較する。
- 2) Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale (ADAS-cog)を用い、記憶、言語、行為の3領域12項目（単語再生、単語遅延再生、口頭言語能力、言語の聴覚的理解、自発話における喚語困難、口頭命令に従う、手指及び物品呼称、構成行為、観念運動、見当識、単語再認、テスト教示の再生能力）の機能評価を行なう。これに加えて、前頭葉機能をより詳細に評価するため、Verbal Fluency Test (VFT) による「言語流暢性」の評価を行う。それぞれについて、投与前後の得点の変化量を算出し、群間比較する。

副次評価項目

- 1) 血漿 NF-L の定量を行う。NF-L は軸索を構成する中間系線維の一つであり、軸索変性に伴って血中に増えかつ安定的に検出され、しかもアルツハイマー病発症前から徐々に血漿中に増加し始めることが知られているバイオマーカーである(18)。これは副次的有効性評価項目ではあるが、被験者脳内の神経軸索が器質的に修復されるかどうかを判断するものである。
- 2) 血漿 A β 42 および A β 40 の定量を行い A β 42/40 の比を求める。
- 3) 血漿 GFAP の定量を行う。

安全性評価項目

- 1) 一般血液検査
- 2) 有害事象

併用許可薬剤

被験者が軽度アルツハイマー病患者の場合、研究期間中、コリンエステラーゼ阻害薬（アリセプト、レミニール、リバスタッチ）の併用を許可する。

<結果>

2020年8月より被験者リクルートを開始し、2020年12月には症例登録が開始された。2023年3月31日を研究終了日とし、服用を終了した全被験者38名に関して、主要評価項

目、副次評価項目、安全性評価項目の全てのデータを得た。現在、結果について統計解析を進めている。

1-2 ジオスゲニンによる軸索再伸長の分子メカニズム

<研究の背景および目的>

アルツハイマー病では、脳にアミロイドβ (Aβ)が沈着することで神経回路網が破綻し、記憶障害が引き起こされる。しかし、アルツハイマー病発症後より破綻した神経回路網を修復するような根本的治療法はない。これまでに我々は、ジオスゲニンが、培養神経細胞においてAβで萎縮した軸索を再伸長させ、アルツハイマー病モデル (5XFAD) マウスの記憶障害を回復することを見出した。本研究では、ジオスゲニン投与により5XFADマウス脳内で萎縮した軸索がつながるべき脳部位に再伸長するかを明らかにし、本現象に関わる分子メカニズムの解明を目的とした。

<研究方法および結果>

5XFADマウスに溶媒またはジオスゲニンを14日間経口投与後、記憶形成に関わる海馬一前頭前野を逆行性トレーサーで標識し、軸索投射数を定量した。その結果、ジオスゲニン投与によって海馬神経細胞の軸索が前頭前野に再伸長した。これらの脳切片から、軸索が再伸長した神経細胞をレーザーマイクロダイセクションで採取し、発現量が変化した遺伝子をDNAマイクロアレイで網羅的に探索した。

ジオスゲニン投与によって軸索を再伸長した海馬神経細胞中で顕著に発現増加したGalectin-1 (Gal-1)に着目した(5)。まずジオスゲニン処置によるGal-1の発現量変化の再現性がタンパク質レベルで観察されるかどうかについて、ddYマウス (E14) の海馬神経細胞を用いて検討した。3日間初代培養した海馬神経細胞に溶媒またはジオスゲニン (1 μM) を処置し、その4日後にタンパク質を抽出後、western blotによってGal-1の発現量を比較した。その結果、溶媒処置群と比べてジオスゲニンを処置した海馬神経細胞では、Gal-1の発現量が有意に増加した (図1)。

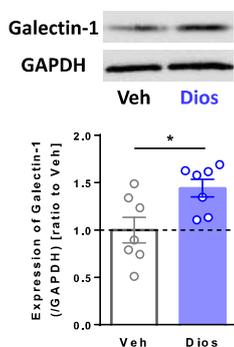


図1 海馬培養神経細胞へのジオスゲニン処置によるGal-1の発現量変化

3日間培養したddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に溶媒またはジオスゲニン(1 μM)を4日間処置した。細胞lysateを作成し、western blotでGal-1及びGAPDHの発現量を測定し、Gal-1/GAPDHの発現量を算出した。*p < 0.05, two-tailed unpaired t-test, mean ± SEM, vehicle (Veh), n = 7; diosgenin (Veh), n = 7 lysates.

*参考文献(5)より引用

Gal-1 の増加が軸索伸長に直接寄与するかどうかを検討するために、AAV9 ベクターを用いて、Gal-1 を神経細胞特異的に過剰発現した。神経細胞特異的なプロモーターSyn1 下で、mouse Lgals1 及び Cerulean を発現する AAV9 ベクター (AAV-Gal-1)、または Syn1 下で Cerulean のみを発現するコントロール AAV9 ベクター (AAV-Control) を、海馬神経細胞にインジェクションした。その7日後に抗 Gal-1 抗体、抗 Map2 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、Map2 陽性神経細胞中における Gal-1 の発現量は、AAV-Control と比べて AAV-Gal-1 処置により、有意に増加し (図 2A, B)、Gal-1 の過剰発現が誘発された。またこの際、Gal-1 の過剰発現により、pNF-H 陽性の軸索長が有意に増加した (図 2C, D)。

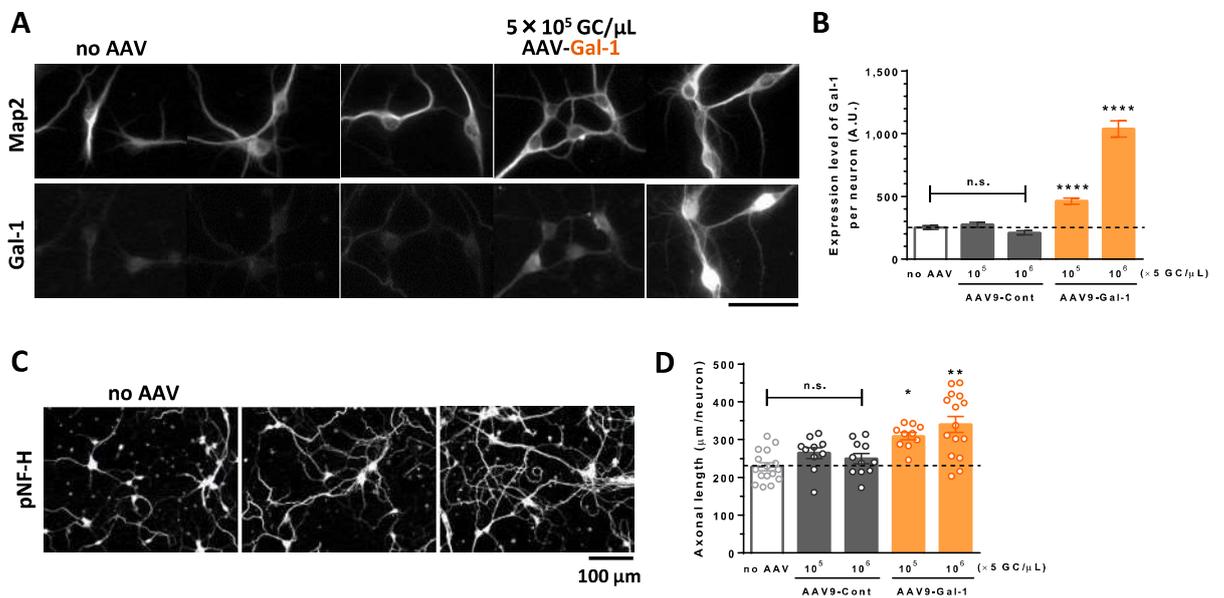


図 2 海馬培養神経細胞での Gal-1 過剰発現による軸索伸長作用

ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に、 5×10^5 または 5×10^6 GC/ μ L の AAV-Control (AAV9-Syn1- Cerulean-WPRE) または AAV-Gal-1 (AAV9-Syn1-mLgals1-IRES-Cerulean-WPRE) を 7 日間処置し、抗 Gal-1 抗体及び抗 Map2 抗体 (A, B)、または抗 pNF-H 抗体 (C, D) による蛍光免疫染色を行った。

A, B, Map2 陽性神経細胞中での Gal-1 の発現量を定量した。**** $p < 0.0001$ vs same concentration of AAV-Cont, one-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 248$ –511 neurons.

C, D, pNF-H 陽性軸索長を定量した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs same concentration of AAV-Cont, one-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 10$ –16 photos.

*参考文献(5)より引用

続いて、wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雌性、7–9 ヶ月齢) の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入し、AAV 注入より 21 日後に物体認知記憶試験を行った (図 3A)。その結果、AAV-Gal-1C の注入によって 5XFAD マウスの物体認知記

憶は有意に改善した。続いて、これらマウスについて、AAV 注入より 26 日後に空間記憶試験を行った (図 3B)。その結果、AAV-Gal-1 の注入によって 5XFAD マウスの物体認知記憶も有意に改善した。さらに、AAV 注入より 28 日後に自発運動試験を行った (図 3C-E)。その結果、AAV 注入によるマウスの自発運動 (総移動距離、進行方向に対する方向転換角度、不動時間) に群間差は認められなかった。また、AAV 注入によってマウスに顕著な体重変化も見られなかった (図 3F)。以上の結果より、海馬神経細胞における Gal-1 の過剰発現によって、5XFAD マウスの記憶障害が改善することが明らかとなった。

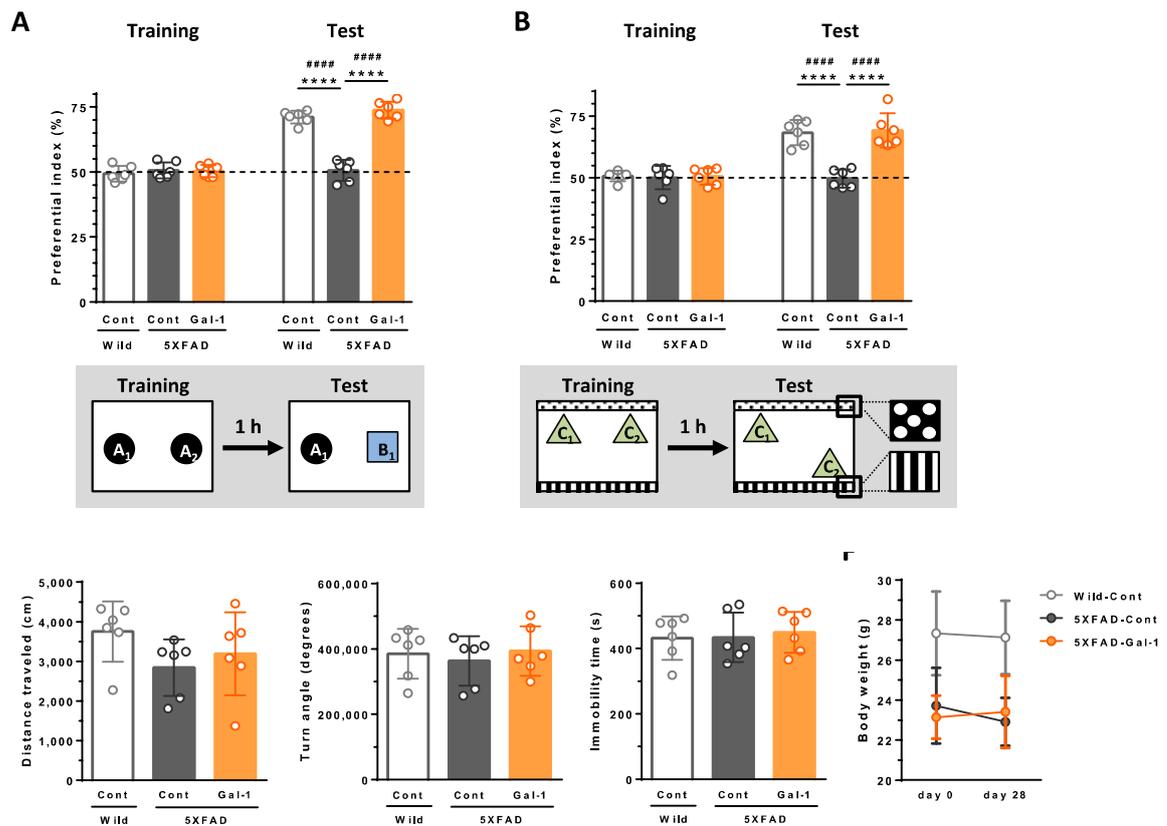


図 3 海馬神経細胞での Gal-1 の過剰発現による 5XFAD マウスの記憶障害改善作用

Wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入した。

A, B, AAV 注入より 21 日後に物体認知記憶試験 (**A**)、27 日後に空間記憶試験 (**B**) をそれぞれ行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。新奇物体または位置を移動した物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。**** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test. A significant drug \times test interaction was found using repeated measures two-way ANOVA [(**A**) $F(2, 15) = 44.47$, $p < 0.0001$, (**B**) $F(2, 15) = 15.35$, $p = 0.0002$]. ##### $p < 0.0001$, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice.

C-F, AAV 注入より 28 日後に自発運動試験を行った。10 分間の自由行動をさせ、総移動距離 (**C**)、進行方向に対する方向転換角度 (**D**) 及び不動時間 (**E**) それぞれを測定した。 $p > 0.05$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice. (**F**) AAV 注入によるマウスの体重推

移。p > 0.05, repeated-measures two-way ANOVA, mean ± SD, n = 6 mice.

*参考文献(5)より引用

続いて、Gal-1 過剰発現による 5XFAD マウス海馬一前頭皮質における軸索再伸長作用について、2 色の逆行性トレーサーを用いた標識実験で検討した。5XFAD マウス及び wild-type マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) に対し、逆行性トレーサー-Dextran (3000 MW) Texas Red (赤) を右側前頭皮質に注入した。続いて右側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入し、その 21 日後に右側前頭皮質に 2 色目の逆行性トレーサー-Dextran (3000 MW) FITC (緑) を注入した (図 4A)。その 7 日後に脳を摘出し、CA1 及び CA3 における逆行性トレーサー陽性細胞数をそれぞれ定量した (図 4B)。

その結果、CA1一前頭皮質において、軸索が再伸長した細胞 (Texas Red 陰性かつ FITC 陽性) 数は、Gal-1 過剰発現により有意に増加することが示された (図 4C)。また、AAV が注入された期間中に軸索が萎縮した細胞 (Texas Red 陽性かつ FITC 陰性) 数は、wild-type と比べて 5XFAD マウスの溶媒投与群で有意に増加したが、Gal-1 を過剰発現した 5XFAD マウスでは有意に減少した (図 4D)。また、軸索が萎縮も伸長もしなかった naïve 細胞 (Texas Red 陽性かつ FITC 陽性) 数は、5XFAD マウスの AAV-Control 群と比べて AAV-Gal-1 群で有意に増加した (図 4E)。また、5XFAD マウスの AAV-Control 群と AAV-Gal-1 群間では、元々前頭皮質に軸索投射する細胞 (全 Texas Red 陽性) 数に差がなく、また両群とも wild-type マウスと比べて有意に低かったことから (図 4F)、AAV 注入前の段階において、5XFAD マウスの両群では同程度の軸索萎縮が起こっていたものと考えられる。また、AAV 注入後に CA1一前頭皮質において軸索投射していた細胞 (全 FITC 陽性) 数は、Gal-1 を過剰発現した 5XFAD マウスで wild-type マウスと同程度にまで有意に増加したことから、Gal-1 過剰発現によって 5XFAD マウスでは wild-type マウスに匹敵するほどの軸索投射が起きていることが示唆された (図 4G)。一方、定量した CA1 領域の面積は群間で差はなかった (図 4H)。

また、免疫染色での検討により、Gal-1 は神経細胞の特に軸索終末部に局在することを見出した。

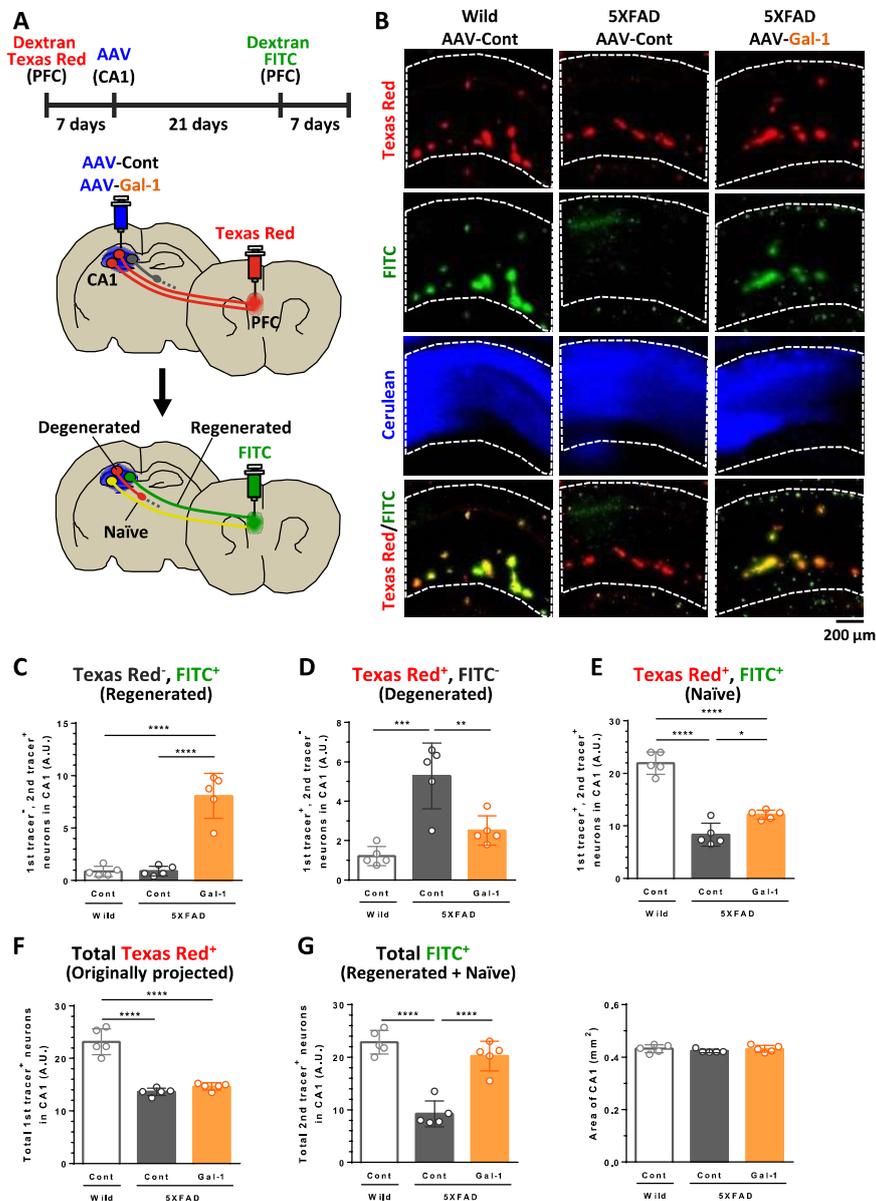


図4 Gal-1 過剰発現による 5XFAD マウスの CA1—前頭皮質における軸索再伸長作用
A, B, 5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）の右側前頭皮質に Dextran Texas Red を注入した。その 7 日後に、右側 CA1 領域に 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入し、AAV 注入より 21 日後に Dextran FITC を前頭皮質の同部位に注入した。その 7 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて各逆行性トレーサー陽性の細胞数を定量した。**(B)** 各群の右側 CA1 における逆行性トレーサー（Texas Red 及び FITC）を示す。
C–H, 右側 CA1 における **(C)** Texas Red 陰性かつ FITC 陽性の細胞数、**(D)** Texas Red 陽性かつ FITC 陰性の細胞数、**(E)** Texas Red 陽性かつ FITC 陽性の細胞数、**(F)** 全 Texas Red 陽性細胞数、**(G)** 全 FITC 陽性細胞数、**(H)** 定量した CA1 の面積。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 5$ mice.

*参考文献(5)より引用

海馬神経細胞は、前頭皮質には多く軸索投射するものの、小脳にはほとんど軸索投射しないことが報告されている。したがって、前頭皮質神経細胞と比べて小脳神経細胞から全く分泌がない液性因子が、前述の軸索誘導因子候補になりうるのではないかと考えた。そこで、前頭皮質神経細胞または小脳神経細胞 (negative control) を7日間培養し、それぞれの培養上清を回収し、SDS-PAGE 及び銀染色を用いて、前頭皮質培養上清では発現があるものの小脳培養上清では発現がないタンパク質を網羅的に探索した。その結果、Secernin-1を見出した。

次に Gal-1 を過剰発現する海馬神経細胞の軸索が、遊離型 Secernin-1 によって伸長するかどうかについて検討した。そこで、Neuron device チャンバーを用いて、Gal-1 を過剰発現した海馬神経細胞の成長円錐側からのみ rSecernin-1 を処置し、Gal-1 による軸索伸長が促進されるかどうかを検討した。海馬神経細胞を neuron device チャンバーの細胞体スペース内 (Soma; 灰色) に播種し、AAV-Control または AAV-Gal-1 (5×10^5 GC/ μ l) を処置した (図 5A)。同時に、チャンバーの軸索投射部 (Axonal site; 青色) より、1 ng/ml rSecernin-1 を添加した。チャンバー内で7日間培養後、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、microgroove 部 (M)、軸索投射部 (A)、及びその total の軸索密度を算出した (図 5B-D)。その結果、海馬神経細胞の成長円錐が存在する軸索投射部より rSecernin-1 を処置した場合には、AAV-Gal-1 による軸索伸長作用が顕著かつ有意に増強した (図 5B-D)。これは、軸索円錐上に局在する Gal-1 が、PFC 培養上清中の軸索誘導因子 Secernin-1 を感知する受容体様にはたらくことで、海馬—前頭皮質における軸索誘導を促進することを支持する結果であると考えられる。

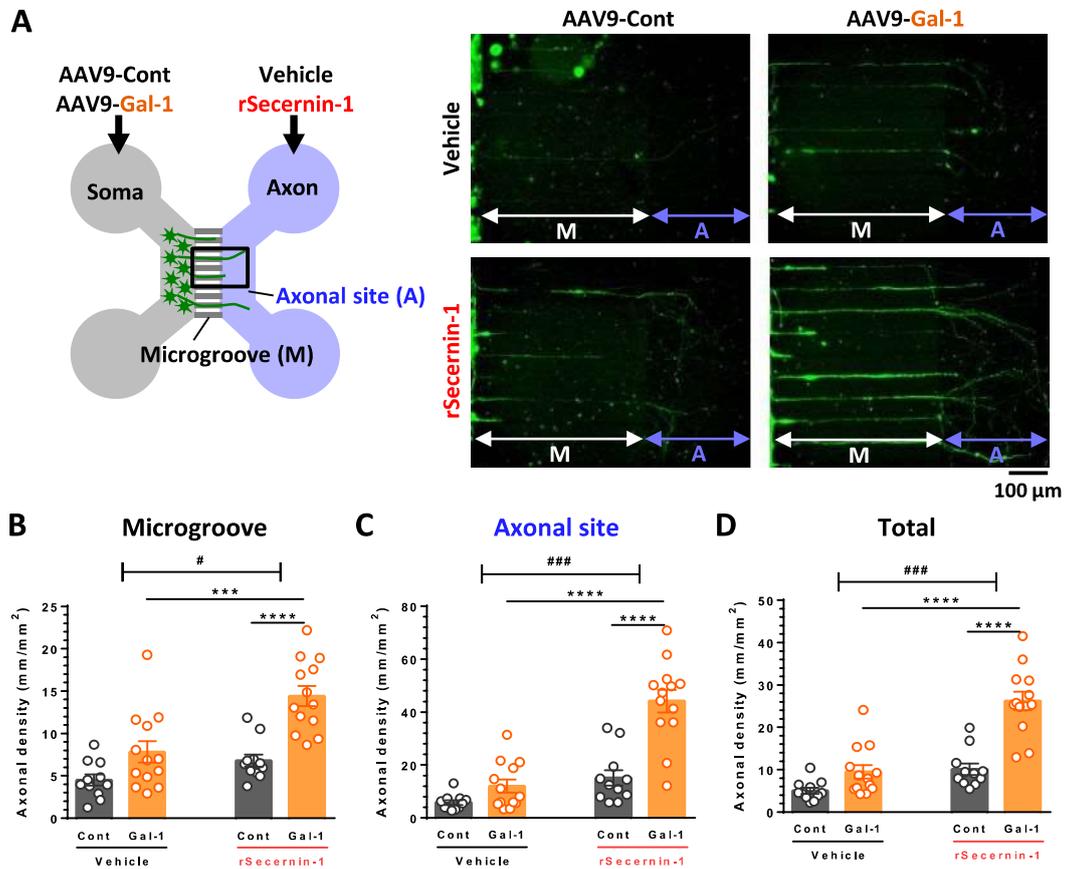


図5 Gal-1 及び遊離型 Secernin-1 による HPC—PFC における軸索誘導作用

ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞を neuron device チャンバーの細胞体スペース (Soma; 灰色) に播種し、AAV-Control または AAV-Gal-1 (5×10^5 GC/ μ l) を Soma 部に処置した。同時に、1 ng/ml rSecernin-1 または溶媒を軸索投射部 (Axonal site; 青色) に処置し、7 日間培養した。その後、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。(B) microgroove (M)、(C) axonal site (A)、及び (D) その total における pNF-H 陽性軸索密度を算出した。*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, Vehicle vs rSecernin-1, two-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 11-13$ images.

2. ニクジュヨウに関する研究

2-1 ニクジュヨウエキスによる頸椎症性脊髄症に対する臨床研究

<研究の背景および目的>

頸椎症性脊髄症は、頸椎脊柱管の狭い状態での頸椎の加齢性変化による脊髄圧迫によって脊髄麻痺を発症する疾患の総称であり、頸椎圧迫が生じる割合は年齢とともに増加し60歳以上では20%を超える。脊髄が圧迫されることにより、手先の動作が不器用になる、歩行で脚がもつれる、手足がしびれるといった症状が出る。診断は、神経学的所見、重症度の頸椎 JOA スコア（日本整形外科頸椎症治療判定基準）および JOA Cervical Myelopathy Evaluation Questionnaire による評価、X線やMRIによる画像診断などによって総合的に判断する。

MRI 診断により脊髄の圧迫が高度な場合や、後述する保存療法に抵抗性である場合は、手術適用により圧迫を除去する。保存療法のうち薬物治療は、消炎鎮痛剤、ビタミン12、筋弛緩剤、抗不安薬、プロスタグランディン製剤、ステロイドなどだが、これらが脊髄症状に有効であるという報告はない(6)。頸椎カラー装着や頸椎牽引療法による保護療法も取られる場合がある。

頸椎症性脊髄症を未治療のままの場合の予後については、患者の75%が外傷などで症状が悪化、20%が徐々に悪化、5%が急速な悪化となり、自然治癒はまずない(7)。

保存療法では、改善24%、不変14%、悪化62%であり、有効であるとは言えない(8)。よってこれまで有効とされる投薬などの治療はないとされてきた。

頸椎症性脊髄症では脊髄が圧迫されており、Hori らの microstructural MRI 解析による定量では、頸椎症性脊髄症患者では健常人と比較すると、髄鞘には変化がないが軸索が変性している（細くなっている）ことが示されている(9)。Murphy らの diffusion basis spectrum imaging による解析でも、頸椎症性脊髄症の重症度に応じて軸索容量が減少することが示されている(10)。頸椎症性脊髄症の主たる臨床症状である運動機能の低下や感覚機能の低下は、脊髄中を走行する軸索の機能不全によってもたらされていることは明らかであるが、頸椎症性脊髄症の治療研究として「変性した軸索を修復する介入法」が試された例は、ヒトにおいても動物モデルにおいても未だない。

東田はこれまで、脊髄損傷の受傷後慢性期からの投与で、運動機能を改善する薬物の探索研究を行い、生薬「ニクジュヨウエキス」に有望な活性を見出した。ニクジュヨウエキスを脊髄損傷慢性期のマウスに経口投与あるいは後肢骨格筋注射すると、関節の動きや歩行機能といった運動機能が有意に改善し萎縮した骨格筋重量も回復することを見出した。ニクジュヨウエキス中の活性を担う成分が「アクテオシド」であることも見出し、アクテオシドの投与によっても同様に運動機能の改善と筋萎縮改善が認められた(11)。アクテオシド投与群の脊髄中では、軸索密度、および軸索と運動神経間のシナプス結合が有意に増しており、アクテオシドが脊髄内の軸索修復を可能にする成分であることが示された。また、後肢不動化による廃用性筋萎縮を呈したマウスに対しニクジュヨウエキスを経口投与すると、歩行

機能が有意に改善することも見出した(12)。

さらに東田は、「ロコモティブシンドロームに対するニクジュヨウエキスの予防及び改善効果の研究」(UMIN000036275)をランダム化二重盲検により実施し、ニクジュヨウエキス(1800 mg/日)の12週間の経口服用により歩行機能の有意な良化作用と、特に副作用は見られないという結果を見出した(13)。

東田によるこれまでの基礎研究、および臨床研究の結果を総合して考えると、ニクジュヨウエキスの経口投与により、軸索変性が修復され運動機能が改善することが示唆された。またヒトにおける安全性も示された。これらの結果から、頸椎症性脊髄症に対してもニクジュヨウエキス経口投与が有効である可能性を考え、本研究は、頸椎症性脊髄症の被験者を対象として、アクテオシドが一定量含有されているニクジュヨウエキスによる頸椎症性脊髄症の機能改善作用を検討することを目的とする。対症療法ではなく頸椎症性脊髄症を根本的に治療できる効果をニクジュヨウエキスに見出すことができれば、多くの患者が存在する頸椎症性脊髄症の治療に大きく貢献する薬剤開発へとつながる。

<研究方法>

特定臨床研究「頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」を計画し、富山大学倫理委員会の承認を受け実施している(jRCTs041200080)。

被験者の選択基準は、・同意日の年齢が40歳以上85歳以下の方。・富山大学附属病院で行われる検査に参加可能な方。・身体診察によって、頸椎症性脊髄症の診断基準を満たす方。・スクリーニング時の頸椎JOAスコアがおおむね8点以上かつ15点以下の方。・臨床検査用の血液検体提供に同意する方。・本人が試験薬の摂取可能で、本人または家族が試験薬の服薬管理をできる方。・試験期間中は運動習慣、食習慣等の生活習慣の極端な変更をしないことに同意する方。とする。

試験薬による介入 (二重盲検)

プラセボ群：プラセボ混合末を1日1回1包、服薬ゼリーに混ぜて飲む。これを24週間、毎日続ける。

試験薬群：試験薬混合末を1日1回1包、服薬ゼリーに混ぜて飲む。これを24週間、毎日続ける。

1日摂取量(1包)あたり、ニクジュヨウエキス2400 mg。

目標症例数

合計 40 例 (プラセボ群 20 例、試験薬群 20 例)

主要評価項目

1) 頸椎 JOA スコア (日本整形外科頸椎症治療判定基準) および JOA CMEQ (JOA Cervical

- Myelopathy Evaluation Questionnaire) の得点の合計を算出し、投与前、投与後 12 週間(3 か月)、24 週間(6 か月)の時点での得点の変化量を算出して群間比較する。
- 2) 身体診察所見 (10 秒テストの回数、握力) を投与前、投与前、投与後 12 週間(3 か月)、24 週間(6 か月)の時点での得点の変化量を算出して群間比較する。
 - 3) EQ-5D (日本語版 EuroQol) の得点の合計を算出し、投与前、投与前、投与後 12 週間(3 か月)、24 週間(6 か月)の時点での得点の変化量を算出して群間比較する。
 - 4) VAS (Visual Analog Scale) を投与前、投与後 12 週間(3 か月)、24 週間(6 か月)の時点での評定の変化量を算出して群間比較する。

プラセボ群と試験薬群それぞれにおいて、試験薬服用前と、服用後 12 週間後、服用終了後 (24 週間後) の間での値の変化量を求める。

副次評価項目

単純レントゲン、MRI の所見を定性的に比較する。

安全性評価項目

- 1) 一般血液検査
- 2) 有害事象

<結果>

2023 年 3 月 31 日現在、適格基準に合致し組み入れとなった被験者は 35 名である。引き続き、症例登録と試験実施、および研究全体のモニタリングを継続的に行っている。

2-3 ニクジュヨウエキスによる頸椎症性脊髄症に対する基礎研究

<研究の背景および目的>

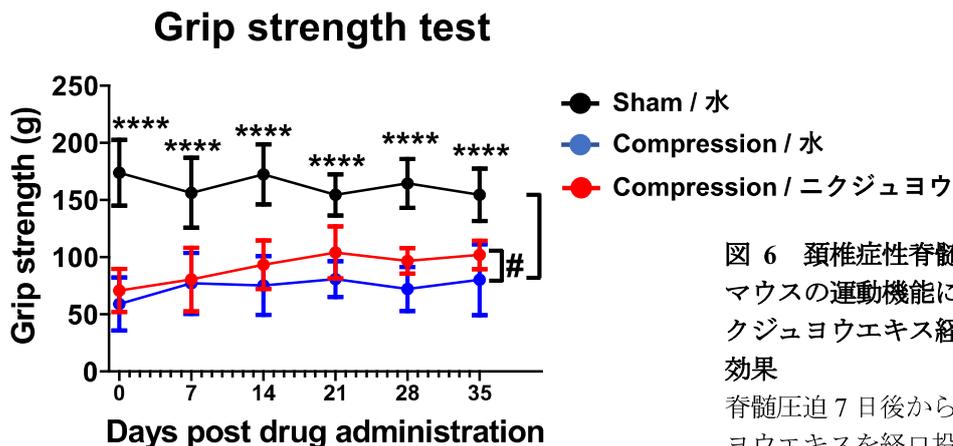
臨床研究と並行して、頸椎症性脊髄症におけるニクジュヨウエキスの改善効果を動物レベルで検討し、さらにはその作用機序の詳細を解析する必要がある。慢性的に脊髄を圧迫することで作製する頸椎症性脊髄症のげっ歯類モデルは報告例が少なく、またいずれも機能障害が発現するまでに 1 か月から数か月を要する点や、機能障害の程度をコントロールすることが難しいと言った課題があった。そこでまず、より早期から運動障害や感覚障害を定量的に表出させる新しいモデルマウスを確立し、ニクジュヨウエキスの効果を検討することを目的とした。

<研究方法>

ddY マウス (8-9 週齢, オス) の C3-5 頸椎椎弓を切除し、微小ネジ用ナットを周囲の骨と固定させ、微小ネジをねじ込むことで定量的に頸髄を圧迫した。圧迫 7 日後からニクジュヨウエキス(492 mg/kg)またはアクテオシド(3, 30 mg/kg)を連日経口投与した。7 日ごとに運動機能、感覚機能を定量し、薬物投与を開始して 28 日後あるいは 35 日後に脊髄を摘出し、免疫染色により軸索を定量した。運動機能はトラクションメーターによる握力測定と、inclined wire mesh test によって評価した。感覚機能は von Frey filament test により評価した。

<結果>

マウスの頸髄を損傷させずに慢性圧迫する方法を種々検討した結果、微小ネジとナットを使う方法によって、少なくとも圧迫後 7 日目から、圧迫の深さ依存的に前肢と後肢の運動機能の低下が認められた。感覚機能は、頸髄圧迫による痛覚鈍麻の傾向が見られたものの有意な変化ではなかった。ニクジュヨウエキスを 35 日間経口投与したところ、握力が有意に増加した (図 6)。またニクジュヨウエキス投与群では、脊髄の運動神経細胞死が抑制されている傾向が見られた、効果を示したニクジュヨウエキスに含有されている量相当のアクテオシドを同モデルマウスに経口投与した。圧迫 7 日後から薬物投与を開始した。その 28 日後には、コントロール群と比べアクテオシド投与群で運動機能が有意に改善した。また脊髄中を下行する縫線脊髄路を定量したところ、縫線脊髄路密度は圧迫によって減少しアクテオシド投与によって増加する傾向が示された。



† $p < 0.05$, Sham/Vehicle vs Compression/Vehicle, day x group interaction [F(5, 75) = 2.54, $p = 0.0354$], # $p < 0.05$, Compression/Vehicle vs Compression/CT extract, drug effect [F(1, 16) = 4.72, $p = 0.0452$], repeated measures Two-way ANOVA. **** $p < 0.0001$ *post hoc* Bonferroni's test. Sham/Vehicle : $n = 8$ mice, Compression/Vehicle : $n = 9$ mice, Compression/CT extract : $n = 9$ mice. Values are mean \pm SD.

図 6 頸椎症性脊髄症モデルマウスの運動機能に対するニクジュヨウエキス経口投与の効果

脊髄圧迫 7 日後からニクジュヨウエキスを経口投与し、7 日に 1 度の頻度で四肢の握力を測定した。

参考文献

- (1) Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. 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.
- (2) Tohda C, Lee YA, Goto Y, Nemere I. Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D₃-MARRS. *Sci Rep*. 2013;3:3395.
- (3) Yang X, Nomoto K, Tohda C. Diosgenin content is a novel criterion to assess memory enhancement effect of yam extracts. *J Nat Med*. 2021;75(1):207-216.
- (4) Tohda C, Yang X, Matsui M, Inada Y, Kadomoto E, Nakada S, Watari H, Shibahara N. Diosgenin-rich yam extract enhances cognitive function: A placebo-controlled, randomized, double-blind, crossover study of healthy adults. *Nutrients*. 2017;9(10):1160.
- (5) Yang X, Tohda C. Axonal regeneration mediated by a novel axonal guidance pair, Galectin-1 and Secernin-1. *Mol Neurobiol*. 2023;60(3):1250-1266.
- (6) 田中雅人、杉本佳久、三澤治夫、高畑智宏、尾崎敏文. 頰椎症性脊髄症の診療ガイドライン. *岡山医学会雑誌*. 2010;122:67-71.
- (7) Schmidt MH, Quinones-Hinojosa A, Rosenberg WS. Cervical myelopathy associated with degenerative spine disease and ossification of the posterior longitudinal ligament. *Semin Neurol*. 2002;22(2):143-148.
- (8) 吉松弘喜、永田見生、後藤博史、菌田恭輔、久保学、井本浩樹、西田俊晴、真島武、高宮啓彰、井上明生. 過去3年間における頰椎症性脊髄症の非手術症例の検討. *整形外科と災害外科*. 2000;49:1006-1010.
- (9) Hori M, Hagiwara A, Fukunaga I, Ueda R, Kamiya K, Suzuki Y, Liu W, Murata K, Takamura T, Hamasaki N, Irie R, Kamagata K, Kumamaru KK, Suzuki M, Aoki S. Application of quantitative microstructural MR imaging with atlas-based analysis for the spinal cord in cervical spondylotic myopathy. *Sci Rep*. 2018;8:5213.
- (10) Murphy RK, Sun P, Xu J, Wang Y, Sullivan S, Gamble P, Wagner J, Wright NN, Dorward IG, Riew D, Santiago P, Kelly MP, Trinkaus K, Ray WZ, Song SK. Magnetic Resonance Imaging biomarker of axon loss reflects cervical spondylotic myelopathy severity. *Spine* 2016; 41(9):751-756.
- (11) Kodani A, Kikuchi T, Tohda C. Acteoside improves muscle atrophy and motor function by inducing new myokine secretion in chronic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2019;36(12):1935-1948.
- (12) Kimbara Y, Shimada Y, Kuboyama T, Tohda C. *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight extract enhances hindlimb performance and attenuates myosin heavy chain IId/IIx expression in cast-immobilized mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;9283171.
- (13) Inada Y, Tohda C, Yang X. Effects of *Cistanche tubulosa* Wight extract on locomotive

syndrome: a placebo-controlled, randomized, double-blind study. *Nutrients*. 2021;13: 264.

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) 准教授 當 銘 一 文

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サンヤク抽出物が認知機能改善作用を有すること¹、およびニクジュヨウ抽出物が骨格筋機能改善作用をも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、サンヤクについて、活性成分である diosgenin の高含量化を目指して、発酵処理や加水分解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³に記載)肉質茎の抽出物について、主要成分⁵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し、産地や基原の違いによる影響を明らかにすることを目的とした。

1. サンヤクの diosgenin 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³において、ヤマノイモ科(Dioscoreaceae)のヤマノイモ *Dioscorea japonica* Thunberg またはナガイモ *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 diosgenin¹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 dioscin 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 diosgenin 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 diosgenin 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、麹菌による発酵処理およびイオン交換樹脂である Amberlyst を用いる方法を検討した。

実験材料

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. 31106)、およびステロイド配糖体高含量とされているサンヤク(TMWP No. 31107、詳細非公開)を用いた。

実験方法

1) サンヤク麴の調製および糖化処理

乳鉢で米粒大に粉砕したサンヤク(TMWP No. 31106) 50 g に水 20.2 mL と麹菌(白麴および甘酒用麴)を 10^6 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。糖化処理は、サンヤク麴 1 g に脱塩水 2 ml 添加し、55°Cで 24 時間加温し

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 回繰り返し、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。

2) Amberlyst による加水分解

サンヤク(TMWP No. 31107)の粉末 12 g を 70%メタノール、80 度の水浴中で 2 時間、2 回抽出し、得られた上清を減圧濃縮後、凍結乾燥した。得られたサンヤク抽出物 1 g を超純水 20 mL に懸濁し、酢酸エチル 20 mL で得られた水可溶部について、水で飽和させたブタノール 20 mL で 2 回分配抽出した。得られたブタノール可溶部を減圧濃縮後、凍結乾燥した。ブタノール可溶部 15 mg を超純水 0.75 mL に懸濁させ、30 mg の Amberlyst とともにプラスチックチューブ中、100°C で 24 時間加熱した。反応後の溶液を減圧濃縮後、凍結乾燥し、得られたサンプルを各種測定に供した。5 mg をメタノールに溶解し、0.22 μm のフィルターでろ過後、LC/MS 分析に供した。

3) 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

4) ¹条件 NMR 装置システムは、日本電子製 ECA500II を用いた。測定溶媒は NMR 測定用の DMSO-*d*₆ または pyridin-*d*₅ を用い、試料が溶解しない場合は上清を用いた。

結果および考察

昨年度は、サンヤクの粉末を硫酸中で加熱、または麹菌で発酵・糖化処理後の物を抽出し LC/MS で diosgenin を分析したが、ピークは検出されるものの、強度は弱かった。これらの条件ではうまく加水分解ができていない可能性と考え、今年度は、他の方法で加水分解を試みた。

まず、麹菌による発酵を検討するために、6 種の麹菌の加水分解にかかわる β グルコシダーゼ活性を検討した。その結果、白麹と甘酒用麹の活性はそれぞれ 533 および 351 U/g であり、他の 4 種の活性 (134–282 U/g) より高かったことから、これら 2 種の麹を用いたサンヤクの発酵・糖化物を分析したが、diosgenin は検出されなかった。

昨年の検討では、加水分解方法として 2M 硫酸を用いていたが、この条件では、生成した加水分解生成物である diosgenin が硫酸の強酸性により分解してしまう可能性も考えられた

め、より温和な条件である Amberlyst を用いた加水分解を行った。Amberlyst はイオン交換樹脂であるが、酸性の触媒として加水分解反応に用いられている。この際、サンヤクそのものではなく、サンヤクの熱水抽出物を溶媒分配して得られたブタノール可溶部を用いた。一般的にこのブタノール可溶部は配糖体の含量が高いことが知られている。ブタノール可溶部を Amberlyst 処理したものについて、分析したところ、diosgenin は検出されなかった。

上記の加水分解条件 2 種で diosgenin が検出されなかったことから、今回用いたサンヤク中には diosgenin の原料となるステロイド配糖体類が含まれていない可能性が示唆された。そこで、LC/MS でサンヤク抽出物および、前述のブタノール可溶部中の配糖体を分析した。その結果、配糖体と推測される m/z を示すピークは検出されなかった。さらにこれらのサンプルについて ^1H NMR も測定したが、配糖体と推測されるシグナルは観測されなかった。以上のことから、今回用いたサンヤク中には diosgenin の原料となるステロイド配糖体類がほとんど含まれていないことが推測された。

今後は、ステロイド配糖体が高含有なサンヤクを入手し、それらを用いた加水分解反応を行う予定である。

2. ニクジュヨウに含まれる acteoside 類の分析

背景・目的

ニクジュヨウ(肉菴蓉)は、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おり、神農本草経の上品に収載されてきた。その基原として日本薬局方³において、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⁶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 つの活性化化合物およびそれらの関連化合物の含量を調べることを目的とした。昨年度までにニクジュヨウ抽出物に含まれる成分の ^1H NMR による定量法(qHNMR 法)および、HPLC による定量法の開発を行っており、今年度は、これらに応用しニクジュヨウ抽出物に含まれる acteoside 関連化合物の定量を行った。

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肉質茎を用いた。

C. salsa: 内モンゴル自治区アルシャー産 10 種、内モンゴル自治区産 6 種、寧夏回族自治区産 1 種

C. deserticola: 新疆ウイグル自治区産 5 種

C. tubulosa: 寧夏回族自治区産 3 種

実験方法

1) 試料調製

各検体の茎を 24 時間以上凍結乾燥し、粉砕した。(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)を行った。得られた上清をメスフラスコに回収し、5 mL にメスアップした。これに超純水 3 mL を加え、0.22 μm のフィルターでろ過後、HPLC 分析に供した。

NMR 用のサンプルは、上記の操作の遠心分離により得られた上清を減圧濃縮・凍結乾燥した後、得られたエキスを NMR 測定用の CD_3OD 溶媒に溶解させ NMR 測定に供した。溶媒は内標準物質である $\text{DSS-}d_6$ (79.5 $\mu\text{g/mL}$)をあらかじめ溶解させたものを用いた。

2) HPLC 分析条件

HPLC システムは、島津製作所製 Prominence HPLC システムを用いた。

分析条件は以下のとおり。

Column: Atlantis T3 column (2.1 \times 150 mm)

Flow rate: 0.2 mL/min

Solvent system: A; water + 0.1% formic acid

Sample injection: 5 μL

B; MeCN + 0.1% formic acid

Column temperature: 40 $^\circ\text{C}$

Detection: UV at 335nm

Time program for solvent gradient:

time (min)	0	7	23	28	40	60	65	75	85	90	100
%B	10	13	13	18	18	25	25	100	100	10	10

検量線は、市販の echinacoside、acteoside、tubuloside A、isoacteoside (図 1)を用いて作成し、定量に用いた。

3) qHNMR 測定条件

qHNMR 用のパルスシーケンスを用いて測定した。主なパラメーターを以下に示す。

scan: 8, pulse angle: 90 $^\circ$, relaxation delay: 60 s, offset: 8 ppm, sweep 20 ppm.

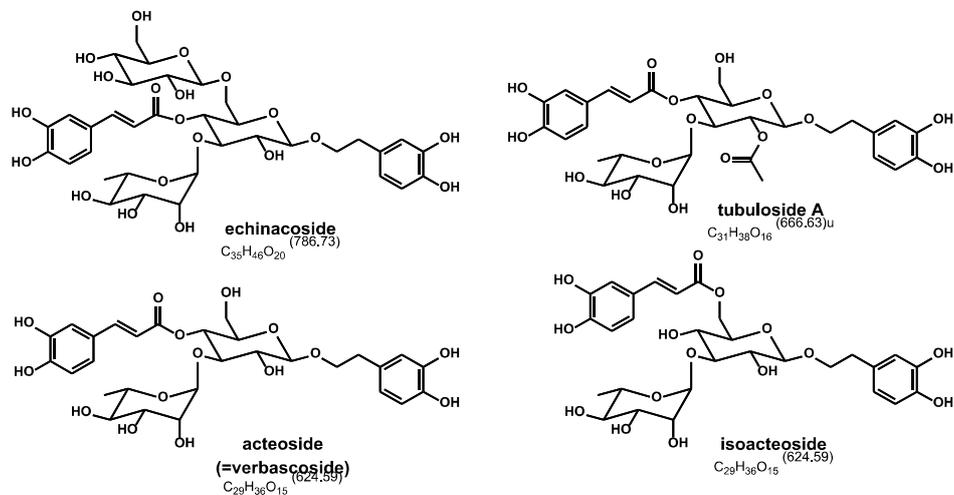


図 1 acteoside 関連化合物の構造式

結果および考察

Cistanche 属肉質茎抽出物について、HPLC 法で echinacoside、acteoside、tubuloside A、isoacteoside の定量を行った(図 2)。その結果、echinacoside の含量が最も高く、次いで acteoside、tubuloside A、isoacteoside の順であった。これら成分の含量は、サンプルにより大きくばらついており、基原や産地の違いより、個体差による影響が大きいことがわかった。

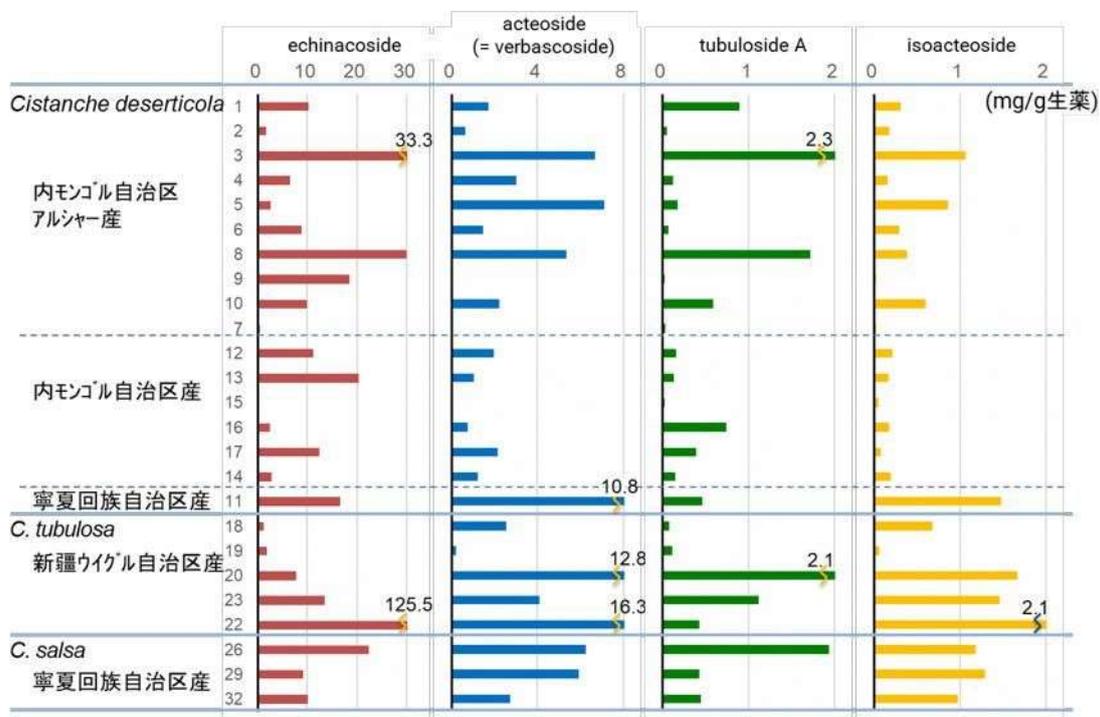


図 2 *Cistanche* 属肉質茎抽出物の HPLC 定量結果

個体差が大きかった原因として、サンプリングを行った際の部位が統一できていなかった可能性がある。入手したサンプルは、すでに収穫されたものであり、どこが地上部に近いか、また根の先端に近いのかが不明であった。今後は、複数の検体を用いて、肉質茎全体を、地上部から離れるごとにいくつかに分けて区切ったり、肉質茎の外側および中心部に分けてサンプリングを行い、それぞれの抽出物の成分含量を定量し、肉質茎の部位による成分含量の違いを検討したい。

昨年度の検討でニクジュヨウの代表的な成分である echinacoside、acteoside、isoacteoside の qHNMR 法による定量法を開発しており、今回本法を適用した定量を行った。echinacoside、acteoside については、シグナル強度が充分であった。今回これら化合物の定量に用いるシグナルとして caffeic acid ユニットの 7 位のプロトンに由来するシグナル (δ_{H-7} 7.9 ppm) を用いた。化学構造の類似性から、定量に用いたシグナルは両化合物で近いケミカルシフト値を示すことから区別が難しく、両者を合わせた量として定量を行った。qHNMR では、含量はモル濃度として算出されるため、得られた両化合物を合わせたモル濃度を acteoside のモル濃度として換算し、acteoside 換算の濃度として算出した。

表 1 qHNMR と HPLC による定量結果の比較

	No.	qHNMR acteoside 換算 (mg/g)	HPLC acteoside 換算 (mg/g)
<i>C. deserticola</i>	1	10.57	9.91
	2	6.97	2.00
内モンゴル自治区 アルシャー産	3	24.06	33.12
	4	15.57	8.14
	5	19.11	9.18
	6	13.94	8.46
	8	21.08	29.16
	9	23.95	14.70
	10	9.72	10.08
	7	0.00	0.35
内モンゴル自治区産	12	12.09	10.90
	13	5.51	17.26
	15	0.00	0.13
	16	4.16	2.68
	17	6.91	12.08
	14	0.00	3.40
	11	183.37	271.56
<i>C. tubulosa</i>	18	4.72	3.53
	19	3.37	1.63
新疆ウイグル自治区産	20	56.16	18.94
	23	17.14	14.90
	22	225.58	303.04
	26	24.90	24.10
<i>C. salsa</i> 寧夏回族自治区産	29	9.33	13.23
	32	14.90	10.70

qHNMR と HPLC での echinacoside、acteoside の定量結果を acteoside 換算の濃度として比

較したところ、定量値は完全に一致しているわけではなかったが、定量値の大小の傾向および、おおよその定量値は一致していた。以上より、qHNMR による定量は HPLC と比較し、定量性は少し劣るものの、簡便に echinacoside、acteoside の含量を見積もることができると考えられた。また、いくつかの検体において、HPLC での定量結果より、qHNMR の定量値が大きいものが確認された。この原因として、echinacoside、acteoside と構造が類似しているフェニルエタノイド類の含量が高く、今回 qHNMR で定量対象としたシグナルと重なってしまったことが考えられ、その結果、qHNMR での定量値が高かったことが推測された。

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遂行した。今年度は、産地、基原の異なる *Cistanche* 属植物の肉質茎抽出物について HPLC および qHNMR による acteoside 類の定量を行った。今回の検討では、個体差が大きく、産地や基原による成分含量の違いを見出すことはできなかった。今後は、検体数を増やし分析を進めるとともに、できるだけ個体差が出ないようなサンプリング法の確立に向けた検討を行い、優良なニクジュヨウの基原種および産地を明らかにしたい。さらにその結果をもとに、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_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, 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) 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.