

学位（博士）論文の要旨及び審査結果の要旨

学位記番号	甲第二号	学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
氏名（カナ）	内倉 崇（ウチクラ タカシ）		
論文題目（和）	生薬オンジ及びハクシュウの指標成分解析と確認試験に関する研究		
論文題目（洋）	Identification and characterization of marker constituents for quality control of Polygala Root and Cynanchi Wilfordii Radix		
審査委員	主査： 松山大学 教授 河瀬 雅美 副査： 松山大学 教授 古川 美子 副査： 松山大学 教授 天倉 吉章		
受理日	平成 30 年 11 月 30 日		
公開発表日	平成 30 年 12 月 26 日		
審査終了	平成 31 年 2 月 5 日		

博士論文審査結果（要旨）

博士（薬学） 内倉 崇

論文題名 生薬オンジ及びハクシュウの指標成分解析と確認試験に関する研究

1. 内容の要旨

生薬・漢方薬の原料は天然物であり、その品質については日本薬局方（局方）により一定の同等性が確保されている。確認試験に用いられる方法として、簡便で安価に生薬の品質評価が実施できる薄層クロマトグラフィー（TLC）法がある。本研究では、局方で TLC 試験が規定されていない生薬及び誤用が問題とされる判別困難な生薬について含有成分を精査し、TLC による簡便評価法の提案を目的に検討を行った。具体的には、1) 局方で TLC による確認試験が規定されていない生薬のうち、加味帰脾湯、人参養栄湯などの漢方薬に配合され、さらに中年期以降の物忘れの改善を目的に単味エキス製剤が上市されているオンジ（遠志）について、紫外線（UV）照射検出による TLC 分析のための指標成分について検討した。また、2) 韓国で誤用が社会問題となっているハクシュウ（白首烏）とイヨウイケマ（異葉牛皮消）について、両者を区別する TLC 試験について検討した。

オンジ国内市場品 9 種について、各エキスを調製し、種々の条件で高性能 TLC (HPTLC) 分析を行ったところ、展開溶媒〔酢酸エチル (EtOAc) :メタノール (MeOH) :水 (6:1:1)〕で展開し、UV 照射することで R_f 0.5 付近に明瞭な 3 つのスポットが共通して観察された。これらを得る目的で局方オンジを MeOH で抽出し、各種カラムクロマトグラフィーによる分離、精製を繰り返し、3 つのスポットに相当する成分として tenuifolioside A、tenuifolioside B、3,6'-di-O-sinapoylsucrose を単離、同定した。これらの他、18 種の既知化合物とともに、文献未記載の化合物 2 種を単離、構造決定し、polygalaonjioside A、B と命名した。単離した化合物は NMR、MS 等のスペクトルデータ解析に基づいて構造解析した。一方で、単離、同定した 3 成分が、オンジに特徴的であるか同属植物を基原とするセネガと比較検討した。結果として、セネガには 3 成分のうち tenuifolioside B のみ観察された。よって、オンジについてはこれら 3 成分を検出することが重要であることが示唆された。また、オンジエキス製剤 5 製品について TLC 分析したところ、3 成分が全ての製品から確認され、オンジの指標成分として支持された。

ハクシュウとイヨウイケマについては、遺伝子解析により種の同定された韓国又は中国市場品（ハクシュウ 4 種、イヨウイケマ 9 種）のエキスを調製し、両者を比較する目的で HPTLC 分析を行った。種々の条件を検討した結果、展開溶媒〔EtOAc:水:MeOH:酢酸 (200:10:10:3)〕で展開し、UV 照射することでイヨウイケマにのみ R_f 0.5 付近に明瞭なスポットが観察された。そこで、このスポットに相当する成分の分離、精製を目的にカラムクロ

マトグラフィーを繰り返し、wilfoside C1N と wilfoside K1N を単離、同定し、2成分が重なって検出していることが明らかとなった。今回検討した試料数は限定されているが、本条件でこれら 2 成分によるスポットの濃淡を確認することで、両者を予備的に区別できる可能性が示唆された。

生薬等の天然物は多成分系であるため、その品質確保のためには科学的根拠に基づいた同等性の評価が求められる。本研究で示した方法はいずれも簡便かつ安価に試験できる TLC による評価法であり、天然物の適正使用を見据えたレギュラトリーサイエンスに資する一データになり得ることが期待される。

2. 審査結果の要旨

生薬は医薬品として利用される際には、品質、有効性と安全性の確保が重要であるが、そのアプローチは含有成分が多いこと、薬理活性成分の多くが未解明であること、また不純物に対する考え方が多様であることなどから、単一成分である合成医薬品とは異なる。日本薬局方（局方）における生薬の取り扱いでは、形態学的手法と種々の理化学的手法により正しい基原が使用されていることを確認し、さらに指標成分等を確認することにより品質が確保されている。この確認に用いられる代表的な方法として、薄層クロマトグラフィー（TLC）法がある。本学位論文では、局方で TLC 試験が規定されていないオンジ（*Polygala root*）及び韓国で誤用が社会問題となっているハクシュウ（白首烏）とイヨウイケマ（異葉牛皮消）について含有成分を精査し、TLC 試験に利用可能な指標成分の探索を行った。

オンジについては、9 種類の国内市場品について、各エキスを調製し、種々の条件で高性能 TLC 分析を行ったところ、UV 照射により共通の 3 個の明瞭なスポットを観察した。このスポットに相当する成分を単離、同定するために局方オンジの含有成分の分離精製を行い、2 種の新規化合物（polygalaonjicide A、polygalaonjicide B）を含む計 23 種の化合物を単離、構造決定した。その内の tenuifolicide A、tenuifolicide B と 3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose が 3 個のスポットに対応することを明らかにした。次に、この 3 個の化合物が TLC 試験において UV 照射検出における指標成分となり得るか確認するために、オンジエキス製剤 5 製品について TLC 試験を行ったところ、全てのエキスから 3 個の成分のスポットが確認できた。また、オンジと同属の植物を基原とするセネガの TLC 分析を行ったが、セネガでは tenuifolicide B が確認されたのみで、他の 2 個のスポットは確認できなかった。したがって、オンジの TLC 試験では、この 3 個の化合物を同時に確認することにより指標成分となり得ることを明らかにした。

ハクシュウとイヨウイケマについても、遺伝子解析により種の同定された韓国又は中国市場品（ハクシュウ 4 種、イヨウイケマ 9 種）について、オンジと同様に高性能 TLC 分析を行った。イヨウイケマにおいて、指標成分となり得る明瞭なスポットが観察されたので、これの分離、精製を行ったところ、このスポットは wilfoside C1N と wilfoside K1N の 2 成

分が重なっていることが分かった。したがって、ハクシュウとイヨウイケマを区別する TLC 試験としては、ハクシュウでは検出できないイヨウイケマの 2 成分からなるスポットを指標成分とすることが有用であることを明らかにした。なお、ハクシュウの成分研究からは 11 種の既知化合物を単離したが、その内でピアセトフェノン誘導体 *cynandione A* のこれまで明らかにされていなかったビフェニル部分の C-1 と C-1' 間の結合を INADEQUATE 解析により確認した。

以上、申請者は TLC 試験法によるオンジの品質評価法を開発した。この TLC 試験法は UV 照射により確認できる指標成分を用いて簡便で安価に実施できることから、オンジ及びオンジエキス製剤の確認試験として十分適用される知見であると考えられる。また、ハクシュウとイヨウイケマにおいては、TLC 法により両者を区別できる指標成分を見出した。本研究の成果は、生薬の品質確保のための科学的根拠に基づいた同等性の評価が TLC 法により可能であることを示しており、生薬の適正使用を見据えた研究やレギュラトリーサイエンスの視点からの制度や研究の発展に大いに寄与する成果であるといえる。

本学位論文の予備審査会は、平成 30 年 12 月 26 日に松山大学薬学部で開催され、口頭発表と質疑応答が行われた。その後、学位論文審査委員により本学位論文の内容とそれに関連した事項について口頭試問と審査が行われた。その結果、本学位論文に記載された研究成果は、新規性と学術性が高く、その内容は薬学に関連する学問領域において高く評価されることから、審査委員全員一致して、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと判定した。