

生薬品質保証を目的とした
オミクスデータならびにメタデータの
利用に関する研究

2025年

菅原 貴子

生薬品質保証を目的とした
オミクスデータならびにメタデータの
利用に関する研究

千葉大学大学院 薬学研究院
生命薬学研究部門 ゲノム創薬学講座
遺伝子資源応用研究室
博士（薬学）学位論文

菅原 貴子

略語表

日本薬局方： 日局

MIA : Monoterpenoid indole alkaloids

OIA : Oxyindole alkaloids

IA : Indole alkaloids

RC : rhynchophylline

IRC : isorhynchophylline

CX : corynoxine

ICX : isocorynoxine

HTI : hirsutine

THE : hirsutine

GME : geissoschizine methyl ether

TICC : Total ion current chromatograms

PCA : Principal component analysis

HCA : Hierarchical cluster analysis

CA : cinnamic acid

CAL : cinnamaldehyde

MCAL : 2-methoxycinnamaldehyde

HCAL : 2-hydroxycinnamaldehyde

t-SNE : t-distributed stochastic neighbor embedding

PLS : Partial least squares regression

目次

序論.....	3
第1部 カギカズラ無菌植物体におけるメタボローム解析.....	8
1.1 緒言.....	8
1.2 結果.....	9
1.2.1 カギカズラ無菌培養系の確立.....	9
1.2.2 生薬品質保証を目的とした無菌植物体の有用性評価.....	12
1.2.3 無菌植物体を用いたメタボローム解析.....	16
1.2.4 無菌植物体および成木を用いたMIAs含量比較.....	19
1.3 考察.....	24
第2部 シナニッケイに関するメタデータを用いた多変量解析.....	27
2.1 緒言.....	27
2.2 結果.....	28
2.2.1 産地、樹齢による形態および成分含量の変化.....	28
2.2.2 産地間における区別点の解析.....	34
2.2.3 成分含量の変動要因の解析.....	36
2.3 考察.....	40
総括.....	42
謝辞.....	43
実験の部.....	44
参考文献.....	61
論文目録.....	68

序論

我が国の漢方医学は、古代中国から日本に導入されて以来、独自の進歩を遂げてきた。漢方医学では、伝統的な医学理論に従い、複数の生薬を調合したものを煎じ薬（湯液）として服用することが一般的である。生薬とは、植物、鉱物または動物の特定の部位を加工したものである。近年の現代医療における漢方治療では、湯液を乾燥させ粉末化させたものが、医療用漢方エキス製剤として広く利用されている。

医療用漢方エキス製剤はいうまでもなく医薬品であり、その品質、有効性および安全性を担保するためには、原料生薬の品質を確保する必要がある。このため原料生薬の品質基準は、厚生労働大臣が定めた医薬品の規格基準書である日本薬局方（以下、日局）によって規定されており、令和6年6月告示の第十八改正日本薬局方第二追補の時点で、生薬176品目および生薬末55品目が収載されている。また、日局には、生薬が現行の薬事制度において医薬品として適切に使用されるための品質規格や、それを検定するための試験法が詳細に記載されている。生薬の取り扱いに関する全般的な指針は生薬総則にまとめられ、収載された生薬に共通して実施される試験法は、一般試験法に収載される。さらに、薄層クロマトグラフィー等を用いた確認試験や、液体クロマトグラフィーを用いた定量法、および一部の純度試験については、生薬毎に異なる特性があることを考慮し、医薬品各条に個別に記載されている [1]。

一方で、生薬は天然化合物からなる多成分系であり、糖類、アミノ酸等の一次代謝産物、アルカロイド、フラボノイド等の二次代謝産物、細胞壁成分やミネラル等、多様な化学成分を含んでいる。それゆえ、日局では各化学成分を評価するため対応する試験として、エキス含量試験、確認試験、定量試験、精油含量試験、灰分および酸不溶性灰分試験、乾燥減量試験等を設定している。これらは生薬の品質を評価する重要な手法であるものの、生薬含有成分の一側面のみが評価されるため、全体像を把握するには限界がある。

さらに、生薬含有成分の組成および含量は多岐にわたる要因により変動する。これらの要因は、内因性および外因性に大別できる。内因性要因としては、基原植物の種、変

種および系統（遺伝情報）や、器官、組織、発生段階等が挙げられる。外因性要因としては、生育環境（土壌、温度、水分、pH 等）や、収穫時期、収穫後処理等が挙げられる。このように、多様な成分変動要因が存在することに加え、漢方エキス製剤の品質管理上の重要なポイントが明確ではなく、原料生薬の最適な生産条件の設定は非常に困難であり、均一な品質の生薬生産に苦慮しているのが現状である。

そこで本研究では、生産工程において原料生薬の望ましい品質を保証するため、含有成分の管理に関する知見を構築することを主眼に置き、メタボローム解析と多変量解析に注目した。具体的には「釣藤鈎」（図 1）および「桂皮」（図 2）の品質保証体制にこれらの解析方法を応用展開することを目的とした。両生薬は、生薬、漢方エキス製剤のいずれにおいても成分管理が課題となっている。また、漢方エキス製剤は、近年のエビデンスの集積や漢方医学教育の充実により使用量が増加傾向にある。この背景において、両生薬は国内の生産動態量が大きく、2020 年度において釣藤鈎は 270 t（使用実績のあった生薬 276 品目中上位 29 位）、桂皮は 1,100 t（同 4 位）の使用実績がある [2]。したがって、両生薬共に漢方エキス製剤の原料生薬として、品質、数量ともに考慮が必要とされる重要な生薬であるため、研究題材として選定した。

第 1 部「カギカズラ無菌植物体におけるメタボローム解析」では、釣藤鈎含有成分に影響を及ぼす内因性要因に対処するため、含有成分の生合成に関する基盤情報の取得を試みた。釣藤鈎は、釣藤散や抑肝散等の漢方処方に配合され、高血圧や不安症の治療に用いられる。日局では、アカネ科（Rubiaceae）に属すカギカズラ *Uncaria rhynchophylla* Miquel、*U. sinensis* Havid、および *U. macrophylla* Wallich が釣藤鈎の基原植物として規定されている。これらの植物の外観における特徴は、葉腋に見られるとげであり [3]、とげとその周辺の茎枝を生薬として用いる。このため栽培植物の場合、とげの収量が十分に得られるようになる定植 3~5 年程度を目安に収穫し、生薬にすることが多い [4]。

Uncaria 属植物はこれまで、中国薬典に記載される *U. hirsuta* Havil や *U. sessilifructus* Roxb を含め、外観性状および内部形態、また含有成分に関する数多くの研究が行われ、

種間の差異について報告されている [5-7]。特に、日本の千葉県以南および中国の中南部に分布するカギカズラは、Monoterpenoid indole alkaloids（以下、MIAs）を豊富に含み、120 成分を超える単離報告がある [8-11]。MIAs は、アカネ科、マチン科 (Loganiaceae)、キョウチクトウ科 (Apocynaceae) 等に含有されていることが知られており、インドール環とモノテルペン部位から構成される化合物である。MIAs には、例えば、抗がん作用をもつ vinblastine とその関連代謝物 [12] や、神経毒の strychnine [13] 等、強力な生理活性を示すものが多い。

カギカズラ含有 MIAs の中では、rhynchophylline（以下、RC）および hirsutine（以下、HTI）は、血管拡張作用や脳神経保護作用等が報告されており、釣藤鈎の薬効成分として知られている [14-17]。したがって日局では、換算した生薬の乾燥物に対し総アルカロイドとして両成分の合算値を 0.03%以上含む、と定めている。このことから、総アルカロイド含量は釣藤鈎の品質管理における目標値になる。しかしながら、実際には生薬中の MIAs 含量は植物の組織部位 [18] や、光強度 [19,20]、エチレン応答 [21]、土壌条件 [22] 等の環境要因によって変化する。さらに、これらの要因は植物の生育過程において相互に影響し合うことが予想されるため、含量の変動要因を正確に特定し、含量を管理することは難しい。これらの要因から、均一な品質な釣藤鈎を安定的に確保することは困難である。

本研究第 1 部では、釣藤鈎の基原植物であるカギカズラについて、生薬含有成分の生合成に関する基盤情報を取得するため、モデルシステムとして無菌 *in vitro* 植物体を確立し、代謝物の全体像を把握するメタボローム解析を実施した。MIAs の組織内推移や生育ステージによる含量変動に関する評価を行い、MIAs の管理における生合成経路に関する知見を構築することを目指した。

第 2 部「シナニッケイに関するメタデータを用いた多変量解析」では、桂皮含有成分に影響を及ぼす外因性要因に対処するため、栽培条件、形態および品質に関するメタデータを用いた成分変動要因の探索を行った。桂皮は、桂枝湯や桂枝茯苓丸等の漢方処方

に配合され、感冒や婦人科系疾患の諸症状の治療に用いられる。日局では、クスノキ科 (Lauraceae) に属すシナニッケイ *Cinnamomum cassia* J. Presl の樹皮、または周皮の一部を除いた樹皮が桂皮の基原植物として規定されている。Phenylpropanoid である cinnamaldehyde (以下、CAL) は桂皮の薬効成分として知られ、抗炎症作用や血行促進作用等が報告されている [23,24]。さらに、揮発性成分である CAL は桂皮の香りだけではなく、味を左右する [25]。においや味は生薬の品質指標であり、この点からも CAL は桂皮の品質において重要な役割を果たしていることがわかる。このことから、日局では成分の含量規定は設けられていないものの、薄層クロマトグラフィーを用いた確認試験において CAL の有無を確認している。

シナニッケイの主要な生産地は中国とベトナムであり、両産地の桂皮は含有成分の特性や差異が示されている [26,27]。一方、中国国内においても複数のシナニッケイの産地が存在するが、産地の傾向を見出すためのサンプル数が限られており、十分な検証が行われていない [28-30]。さらに、シナニッケイは中国において播種から苗の植え付けを経て、生薬の原料として樹皮を収穫するまでに 5~8 年を要する。このため、植物の生育過程において気候や土壌などの環境要因の影響を大きく受けることが予想されるが、栽培環境や生育ステージが成分含量に及ぼす影響については十分に研究されていない [31,32]。以上のことから、現地採取者は経験に基づく判断により収穫を行っており [33]、生薬桂皮の要求品質を満たすために適切な栽培条件や収穫時期に関する知見が求められている。

本研究第 2 部では、桂皮の基原植物であるシナニッケイについて、生薬含有成分の変動要因を特定するために、栽培環境、形態、および成分に関するメタデータを用いて、複数の変数間の関係性を同時に評価する多変量解析を実施した。本手法を用いることにより、含有成分の管理に関する知見を得ることを目指し、栽培環境や形態データを基に桂皮の品質管理における指標の構築を目指した。



図 1 釣藤鉤の外観



図 2 桂皮の外観

第1部

カギカズラ無菌植物体におけるメタボローム解析

1.1 緒言

生薬含有成分の組成および含量は多岐にわたる要因により変動し、内因性要因としては、基原植物の種、変種および系統（遺伝情報）や、器官、組織、発生段階等が挙げられる。ここでは、釣藤鈎の含有成分に影響を及ぼす内因性要因に対処するため、メタボローム解析を用いて、釣藤鈎の基原植物あるカギカズラに含まれる MIAs の生合成に関する基盤情報の取得を試みた。

最初に、カギカズラの *in vitro* 無菌培養系を確立し、釣藤鈎の品質保証を目的とした無菌植物体の有用性を評価した。続いて、無菌植物体を用いたメタボローム解析を実施し、組織部位や生育ステージによる含量変動を評価した。これにより、カギカズラ含有 MIAs の動態を考察し、生合成に関する知見を得ることを目指した。

1.2 結果

1.2.1 カギカズラ無菌培養系の確立

千葉県鴨川市にて、自生するカギカズラを採取した。2 個体の植物から果実を 2022 年 11 月に、同一個体の地上部を 2024 年 7 月に採取した。カギカズラの成木は、谷沿いの斜面に自生し、他の樹木にからみつきながら非常に高い位置まで生長していた (図 3)。生薬の原料として使用される当年枝は柔らかく、非木質であった。なお、地上部の採取を 7 月に行ったのは、これまでに成木において当該月の MIAs 含量が最も高いことが報告されているためである [34]。2 個体から採取した種子を、無菌条件下で発芽させた。

無菌培養系を確立するために、ゲル化剤として 8 g L^{-1} 寒天と 2 g L^{-1} ゲランガムを比較した。両固体培地は発芽において有意な差を示さなかったが、ゲランガム培地は培養過程で不安定となり、後に植物体のガラス化を引き起こした。したがって、本研究では寒天を選択した。

種子は無菌培養下において播種後 12~14 日で発芽した。発芽後 2 ヶ月の植物体の乾燥重量は約 3 mg であった。重量は安定して増加し、発芽後 3 ヶ月で 15 mg、発芽後 10 ヶ月で 20 mg を超えた。発芽後の枯死はほとんどなく、植物は良好に生育した (図 4)。この傾向は継代培養後も持続し、継代可能な *in vitro* 培養系の確立に成功した (図 5)。

一方で生薬として利用されるとげは、培養植物では形成されなかった。成木における鉤状のとげは当年に伸長した主茎から出枝した側枝につき、発生学的に茎の変形とされる (図 6)。したがって、無菌植物体の茎は、成木のとげと同様の代謝物の特性を持つと予想した。



図 3 カギカズラ自生の様子（撮影：2024年7月）

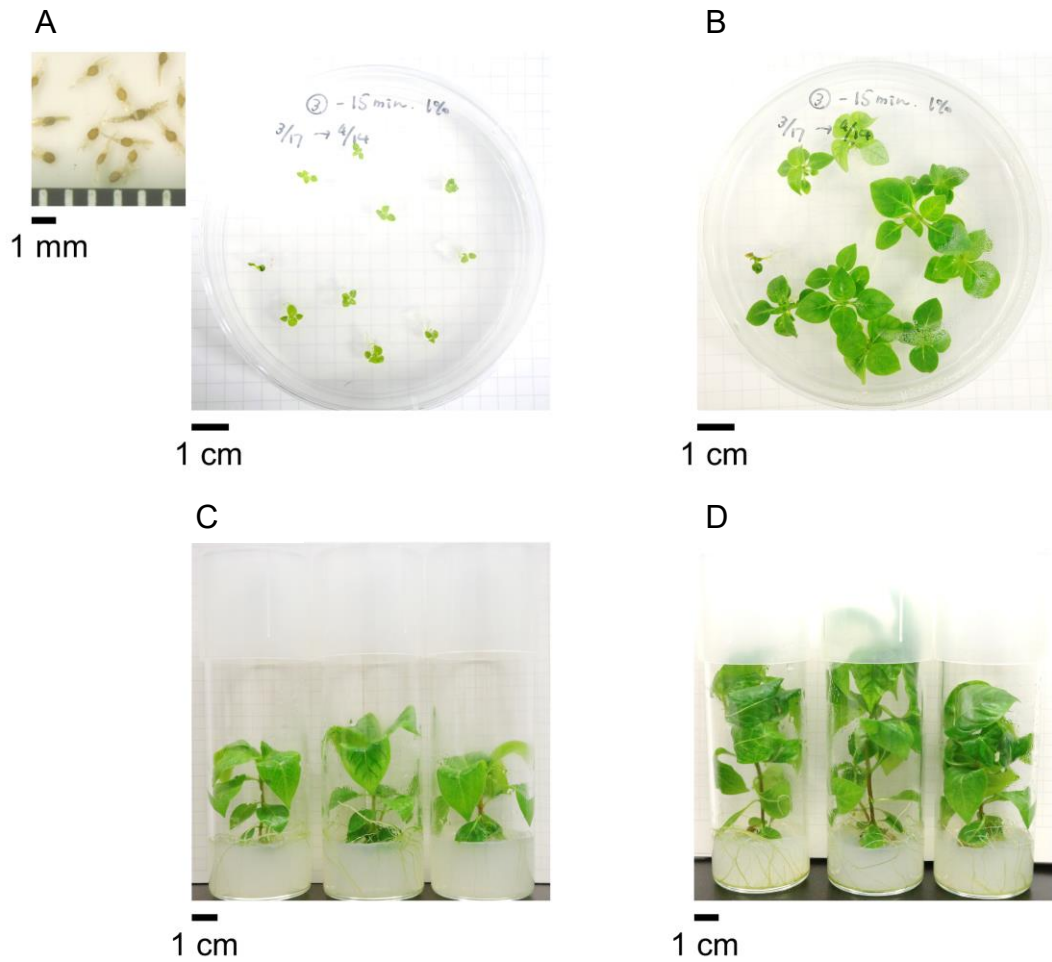


図 4 無菌植物体の生育過程

A：種子および発芽後 16 日の植物体 B：発芽後 58 日の植物体
 C：発芽後 93 日の植物体 D：発芽後 155 日の植物体

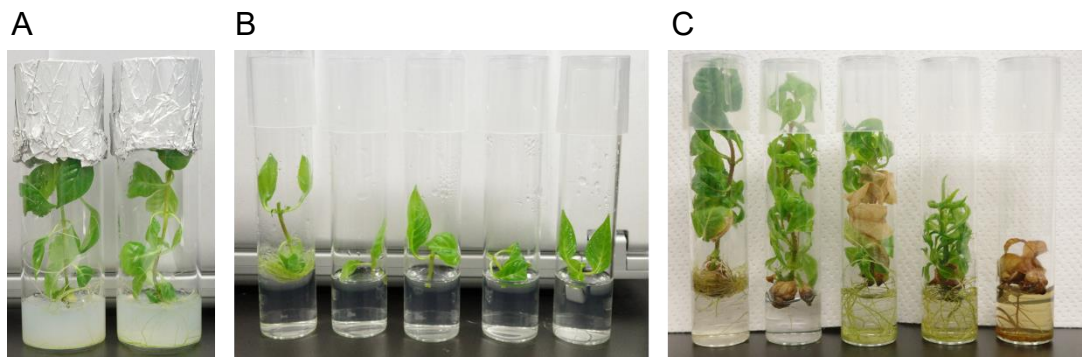


図 5 継代培養時の生育過程
 A：継代前の植物体（右） B：継代初日の植物体
 C：継代後 106 日の植物体

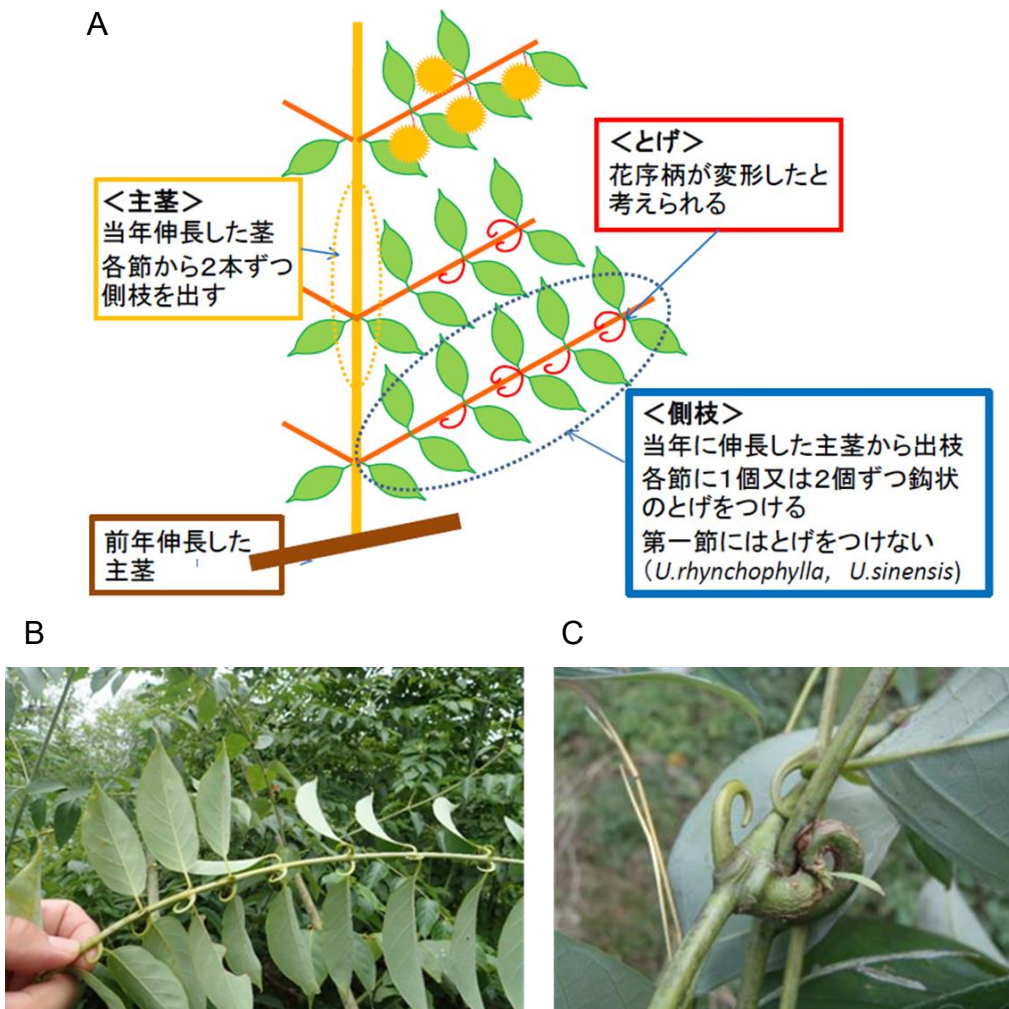


図 6 カギカズラ成木の地上部
 A：地上部の構成 B：側枝の様子 C：とげの様子

1.2.2 生薬品質保証を目的とした無菌植物体の有用性評価

無菌植物体と成木の組織部位における代謝物プロファイルの違いを評価した。主要代謝物の分布パターンを把握するため、LC-MS 分析から得られた総イオン電流クロマトグラム（以下、TICC）を比較した（図 7A、B）。無菌植物体の TICC は発芽後 10 カ月の植物体のデータを使用した。

本研究で定量した MIAs（図 7C）に対応するピークは、ほぼすべてのサンプルで検出でき、無菌植物体の茎頂や成木の茎の先端で強度が高かった。無菌植物体では、茎頂、茎、葉の主要代謝物の分布パターンは類似しているのに対し、根は異なる傾向を示した。成木では、茎、とげ、および果実の主要代謝物の分布パターンは類似していた。本傾向は、成木において果実は茎やとげと異なる代謝物の分布パターンを示す、という先行研究の結果と一致しなかった [35]。この不一致は果実の熟度の違いに起因し、著者らは 10 月に収穫された成熟果実を使用した。本研究では 7 月に収集された未成熟果実を使用したことによる影響が示唆された。以上のように、各組織部位に対して TICC は明確な特徴を示したが、無菌植物体の茎ならびに、生薬として用いる成木の茎ととげの主要代謝物の分布パターンは類似していることを確認した。

さらに、主成分分析（以下、PCA）を用いて無菌植物体（発芽後 10 および 12 ケ月の植物体）と成木の代謝物プロファイルを比較した。PCA は多次元データを視覚化し、データの構造を理解するための手法であり、元のデータの次元を減少させ、データの変動を最もよく説明する新しい軸（主成分）を作成する。本解析には、比較的高い強度閾値を持つ非ターゲットメタボローム分析により検出された 812 ピークを用いた。これらのピークはアルカロイド、フラボノイド、ステロールを含むと推定された。また、Component 1 および Component 2 は、PCA によって得られた主成分であるが、本解析において Component 1 はデータの 19.9% の変動を、Component 2 は 13.4% の変動を説明した。PCA のスコアプロットでは、各点がサンプルを表しており、点の位置はそれぞれのサンプルの主成分に基づく特徴を示す。点が近いほど、それらのサンプルは類似した特性を持つことを示唆し、図中の色や形は、異なるサンプルグループを区別するために使用してい

る。また、95%信頼区間は、各グループのデータがどの程度の範囲に分布しているかを示し、グループ間の差異を視覚的に確認するのに役立つ。無菌植物体と成木サンプルを含むPCAのスコアプロットでは、両者の95%信頼区間が明確に区別された。一方、無菌植物体の茎と、成木の茎ととげは近い位置にプロットされ、両者の代謝物の類似性が確認された(図8)。以上より、釣藤鈎含有MIAsの生合成経路解明のための評価モデルとして、無菌植物体が有用であることが示唆された。

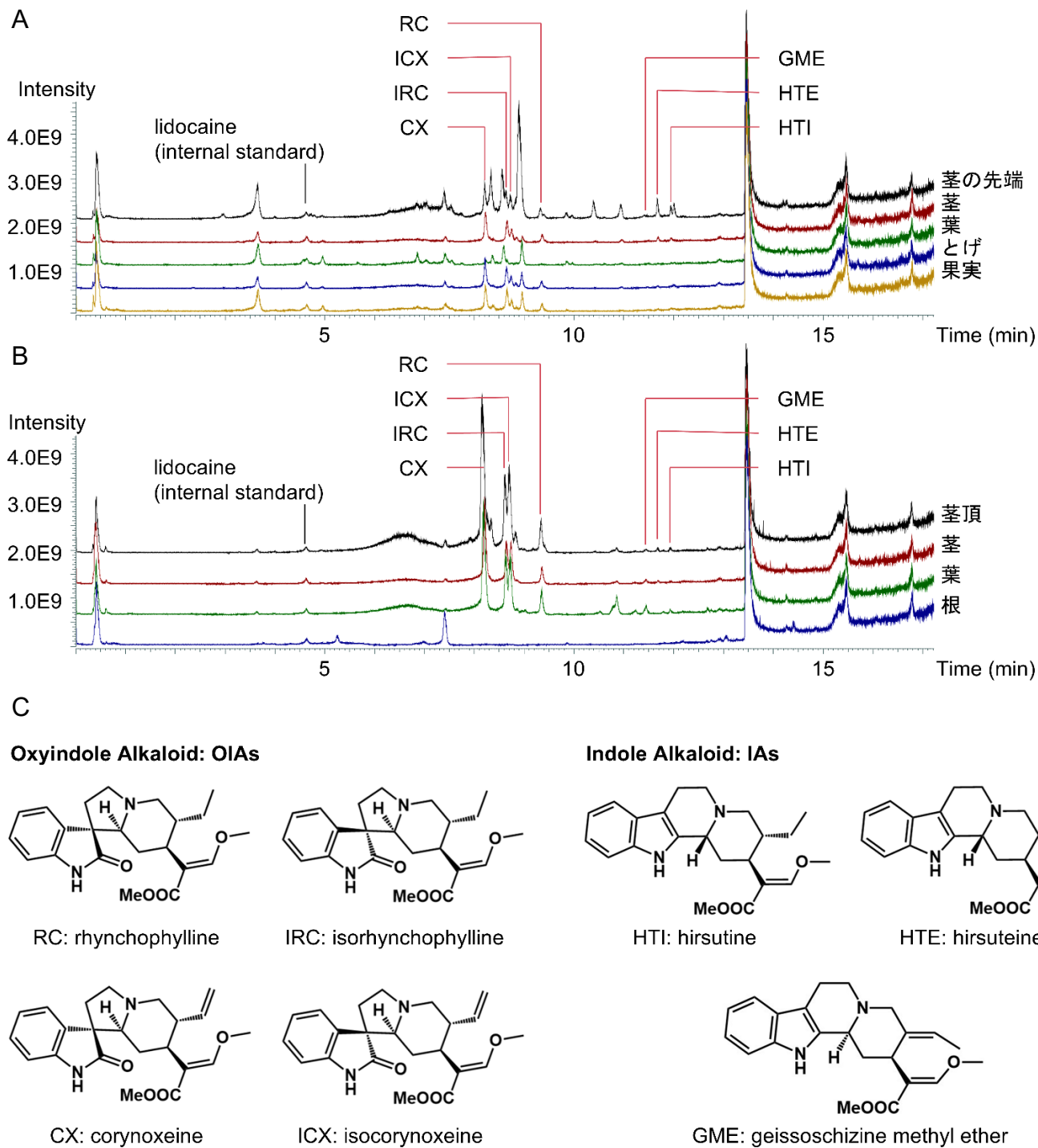


図 7 各組織部位における代謝物の分布パターン
 A : 成木の TICC B : 発芽後 10 ヶ月の無菌植物体の TICC C : 代表的な MIAAs

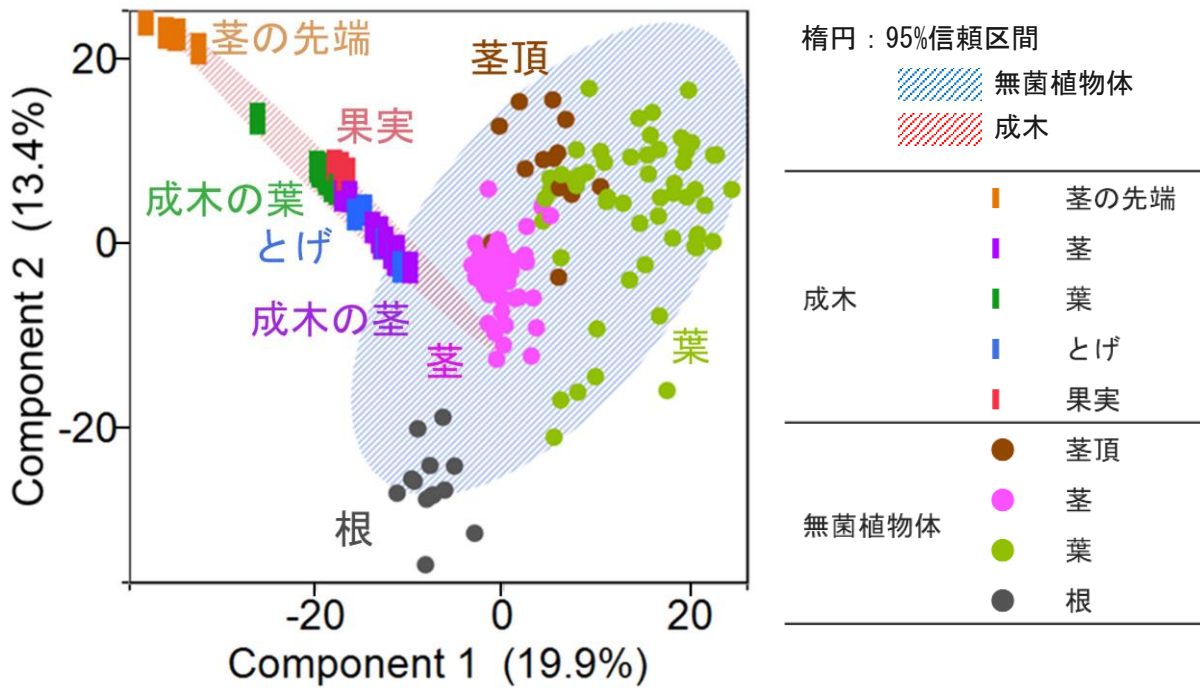


図 8 無菌植物体（発芽後 10 および 12 ヶ月）と成木の各組織部位における PCA スコアプロット

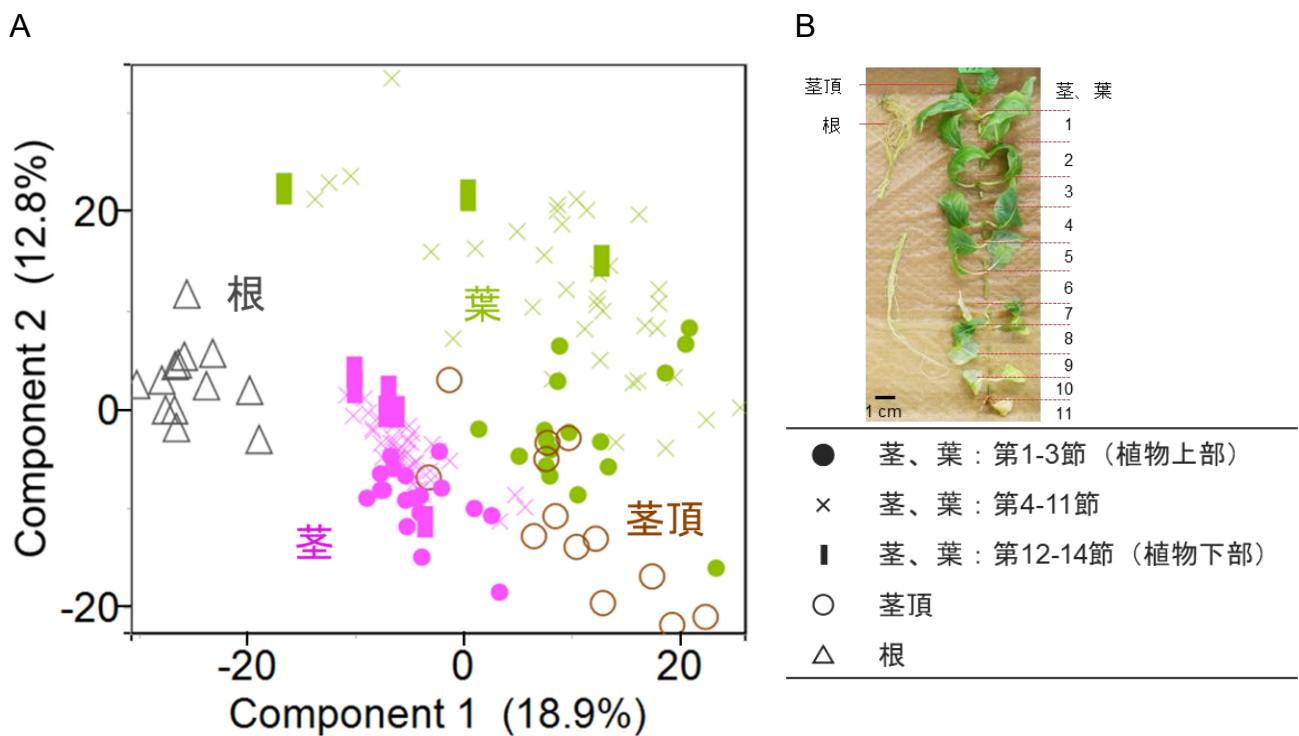


図 9 無菌植物体（発芽後 10 および 12 ヶ月）の各組織部位における PCA スコアプロット

A：スコアプロット B：組織部位区分の詳細

1.2.3 無菌植物体を用いたメタボローム解析

無菌植物体における代謝物プロファイルに焦点を当て、無菌植物体（発芽後 10 および 12 ケ月の植物体）の組織部位による傾向を PCA により検証した（図 9）。スコアプロットは茎頂、葉、茎、根で明確に分離された。さらに茎と葉については、植物の上部にあたる 1-3 節は茎頂と、植物の下部にあたる 12-14 節は根と近い位置にプロットされた。

続いて、無菌植物体（発芽後 10 および 12 ケ月の植物体）の組織部位間における代謝物の相対濃度の類似性と均一性を確認するため、階層的クラスタ分析（以下、HCA）を実施した。カギカズラに含まれる主要な 22 成分 [36] について、組織部位でわけたヒートマップを生成した（表 1、図 10）。22 成分は、その性質に基づいて 7 グループにわけ、色別に表示した。HCA に基づき、cadambine alkaloids（cadambine および 3 α -dihydrocadambine）および unknown alkaloid glycosides は他のパラメータから区別され、独立したクラスターを形成し、根に蓄積することを確認した。残りの成分は 5 つのクラスターに分けられた。tetracyclic monoterpene oxidized indole alkaloids のうち RC、isorhynchophylline（以下、IRC）、corynoxine（以下、CX）、isocorynoxine（以下、ICX）は、茎頂および葉の上部に蓄積していた。tetracyclic monoterpene indole alkaloids である、corynanthine、HTI、hirsutine（以下、HTE）、geissoschizine methyl ether（以下、GME）は、茎の上部、茎頂、および根に蓄積していた。日局にて総アルカロイドと規定される RC と HTI は異なる挙動を示すことを確認した。

また、important biosynthetic intermediates である strictosidine や、pentacyclic monoterpene indole alkaloids である vincoside lactam、strictosamide は、特に茎頂に蓄積していた。tetracyclic monoterpene oxidized indole alkaloids の rhynchophyllic acid、isorhynchophyllic acid、および primary biosynthetic intermediate である L-tryptophan は葉の下側に蓄積していた。

表 1 アノテーションした 22 成分
No.1~11、14~19 : 標準物質を用いて同定 No.12、13、20~22 : 推定

		Molecular formula	Monoisotopic mass 「M+H」 ⁺	Detected mass 「M+H」 ⁺	Mass difference (ppm)	Retention time (min)
Primary biosynthetic intermediate						
1	L-tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0972	205.0971	-0.23	2.39
Important biosynthetic intermediates (β-carboline alkaloids)						
2	strictosidine	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₉	531.2337	531.2332	-1.04	8.36
3	5β-carboxystrictosidine	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₁₁	575.2235	575.2228	-1.32	7.44
Pentacyclic monoterpene indole alkaloids						
4	vincoside lactam	C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₈	499.2075	499.2065	-2.02	12.01
5	strictosamide	C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₈	499.2075	499.2068	-1.47	11.34
Tetracyclic monoterpene oxidized indole alkaloids						
6	RC: rhynchophylline	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	385.2122	385.2121	-0.15	9.29
7	IRC: isorhynchophylline	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	385.2122	385.2122	-0.07	8.69
8	CX: corynoxine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	383.1965	383.1965	-0.16	8.21
9	ICX: isocorynoxine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	383.1965	383.1961	-1.12	8.18
10	corynoxine B	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	385.2122	385.2117	-1.25	8.87
11	corynoxine	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	385.2122	385.2120	-0.54	8.78
12	rhynchophyllic acid*	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄	371.1965	371.1970	1.15	5.99
13	isorhynchophyllic acid*	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄	371.1965	371.1972	1.72	7.50
Tetracyclic monoterpene indole alkaloids						
14	HTI: hirsutine	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃	369.2173	369.2170	-0.78	11.91
15	HTE: hirsuteine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	367.2016	367.2015	-0.30	11.64
16	corynantheine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	367.2016	367.2014	-0.72	10.33
17	GME: geissoschizine methyl ether	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	367.2016	367.2015	-0.39	11.43
Cadambine alkaloids						
18	cadambine	C ₂₇ H ₃₂ N ₂ O ₁₀	545.2130	545.2128	-0.37	6.99
19	3α-dihydrocadambine	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₁₀	547.2286	547.2283	-0.64	7.41
Unknown alkaloid glycosides						
20	unknown glycoside 1	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₁₁	563.2235	563.2225	-1.78	5.25
21	unknown glycoside 2	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₁₁	563.2235	563.2260	4.40	6.81
22	unknown glycoside 3	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₁₁	563.2235	563.2252	2.88	6.96

A



B

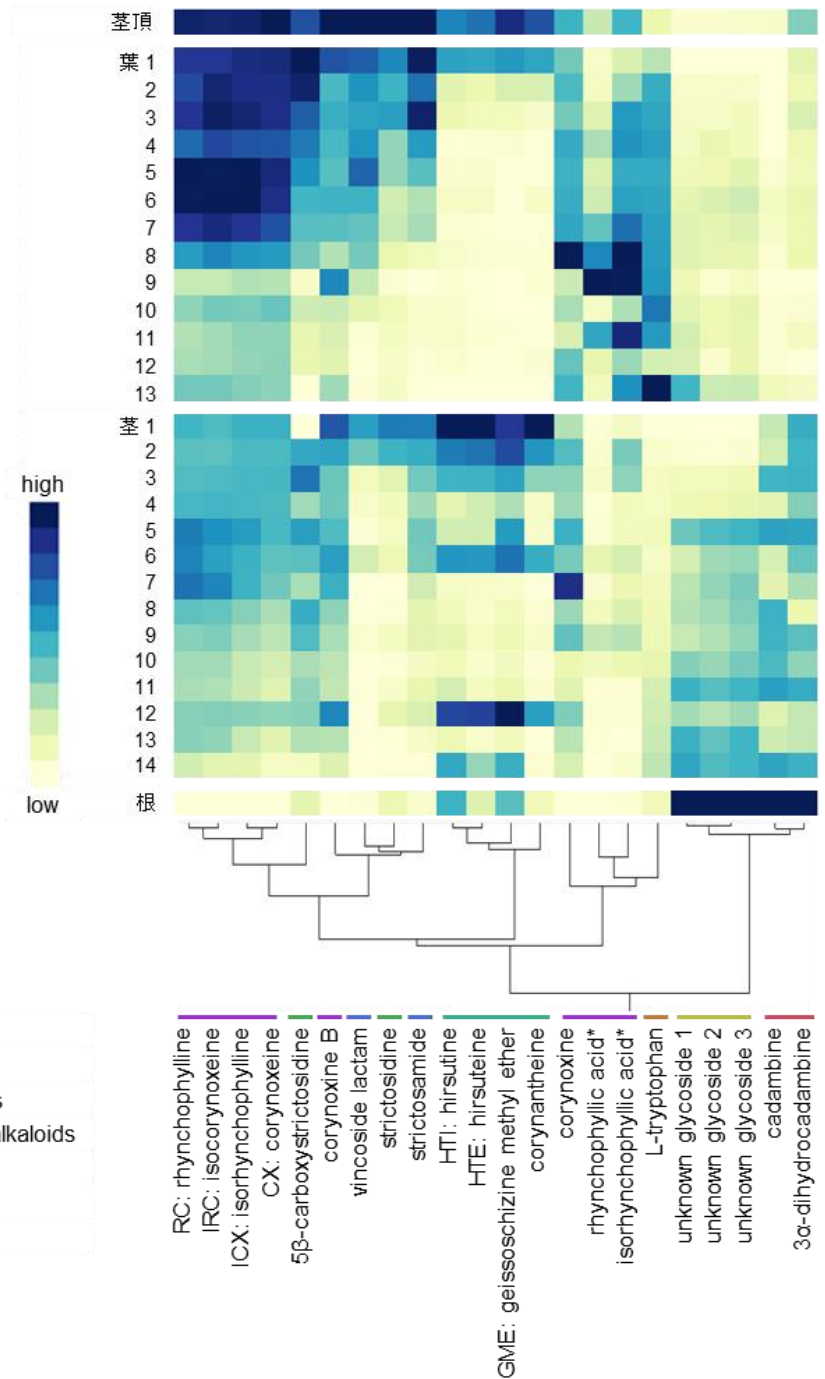


図 10 無菌植物体（発芽後 10 および 12 ヶ月）の各組織部位における HCA の結果
 A : 組織部位区分の詳細 B : ヒートマップ

1.2.4 無菌植物体および成木を用いた MIAs 含量比較

無菌植物体（発芽後 1-10 および 12 ヶ月）と成木を用いて、oxyindole alkaloids（以下、OIAs）4 成分（RC、IRC、CX、ICX）、indole alkaloids（以下、IAs）3 成分（HTI、HTE、GME）の乾燥重要あたりの含量（%）を内部標準法により算出した。定量に用いた検量線は良好な線形性を示した（表 2）。

すべての植物体において、OIAs は IAs よりも高含量であった。無菌植物体は 0.03～3.89%の OIAs および 0～0.08%の IAs を含んでいた。成木は 0.04～0.92%の OIAs および 0～0.27%の IAs を含んでいた。生育ステージで比較すると、無菌植物体における OIAs は成木よりも高含量であり、成木における IAs は無菌植物体よりも高含量であった。OIAs の中では CX が最も高い含量を示し、IAs の中では HTE が最も高い含量を示した（図 11、表 3、表 4）。カギカズラはその自生地によって異なる代謝物プロファイルを持ち、RC が豊富なタイプと、HTI および GME が豊富なタイプがあることが報告されている [37]。また、日本のカギカズラ由来の釣藤鈎の HTI と RC の含量を比較すると RC が優勢であることが知られている [38]。本研究においても、釣藤鈎として用いる成木の茎とかぎについて、RC は 0.03～0.09%、HTI は 0～0.04%であり、RC が確かに優勢であることが確認され、先行研究で観察された傾向と一致した。

組織部位に関して、無菌植物体では茎頂および葉と茎の上部において、OIAs と IAs が高含量であった（図 11B）。成木では茎の先端、植物の上部に位置するとげおよび茎において、OIAs と IAs が高含量であった（図 11A）。先行研究では、成木における OIAs は主に地上部分に存在し、IAs は主に地下部分に存在すると報告されている [39]。しかし、本研究の無菌植物体においては、IAs が根ではなく茎頂に蓄積されることが確認された。本研究と先行研究は、用いた植物体の生育ステージが異なるため、結果に影響を与えた可能性が示唆された。さらに、とげから誘導したシュートを培養した植物体において、RC および IRC が葉や茎に高含量で存在し、HTI は根に高濃度で存在することが報告されている [40]。本研究で得られた無菌植物体の RC および IRC は先行研究よりも低含量であるものの、組織部位における代謝物の蓄積傾向は一致していた。含量の差異は、個

体差や種子から無菌植物体を生育したことに起因する可能性が示唆された。

無菌植物体における経時的な含量の変動についても評価した（図 11C）。葉の OIAs の含量は発達段階に応じて増加する傾向を示したが、他の組織部位における OIAs 含量および IAs 含量は有意な差はなく明確な傾向は見られなかった。

表 2 MIAs の検量線

	調製濃度 (ng mL ⁻¹)						図 11A、B		図 11C	
	1	2	3	4	5	6	検量線	決定係数	検量線	決定係数
RC	5000.00	2500.00	1000.00	500.00	50.00	5.00	$y = 5.426e^{-3}x$	0.9998	$y = 5.000e^{-3}x$	0.9986
IRC	5040.00	2520.00	1008.00	504.00	50.40	5.04	$y = 4.888e^{-3}x$	0.9990	$y = 4.386e^{-3}x$	0.9998
CX	5035.00	2517.50	1007.00	503.50	50.35	5.04	$y = 4.839e^{-3}x$	0.9992	$y = 4.642e^{-3}x$	0.9996
ICX	5010.00	2505.00	1002.00	501.00	50.10	5.01	$y = 3.450e^{-3}x$	0.9991	$y = 3.324e^{-3}x$	0.9999
HTI	502.50	201.00	100.50	50.25	10.05	-	$y = 1.010e^{-2}x$	0.9992	$y = 1.034e^{-2}x$	0.9998
HTE	212.00	84.80	42.40	21.20	4.24	-	$y = 6.448e^{-3}x$	0.9995	$y = 6.846e^{-3}x$	0.9998
GME	287.00	114.80	57.40	28.70	5.74	-	$y = 7.698e^{-3}x$	0.9999	$y = 8.231e^{-3}x$	0.9993

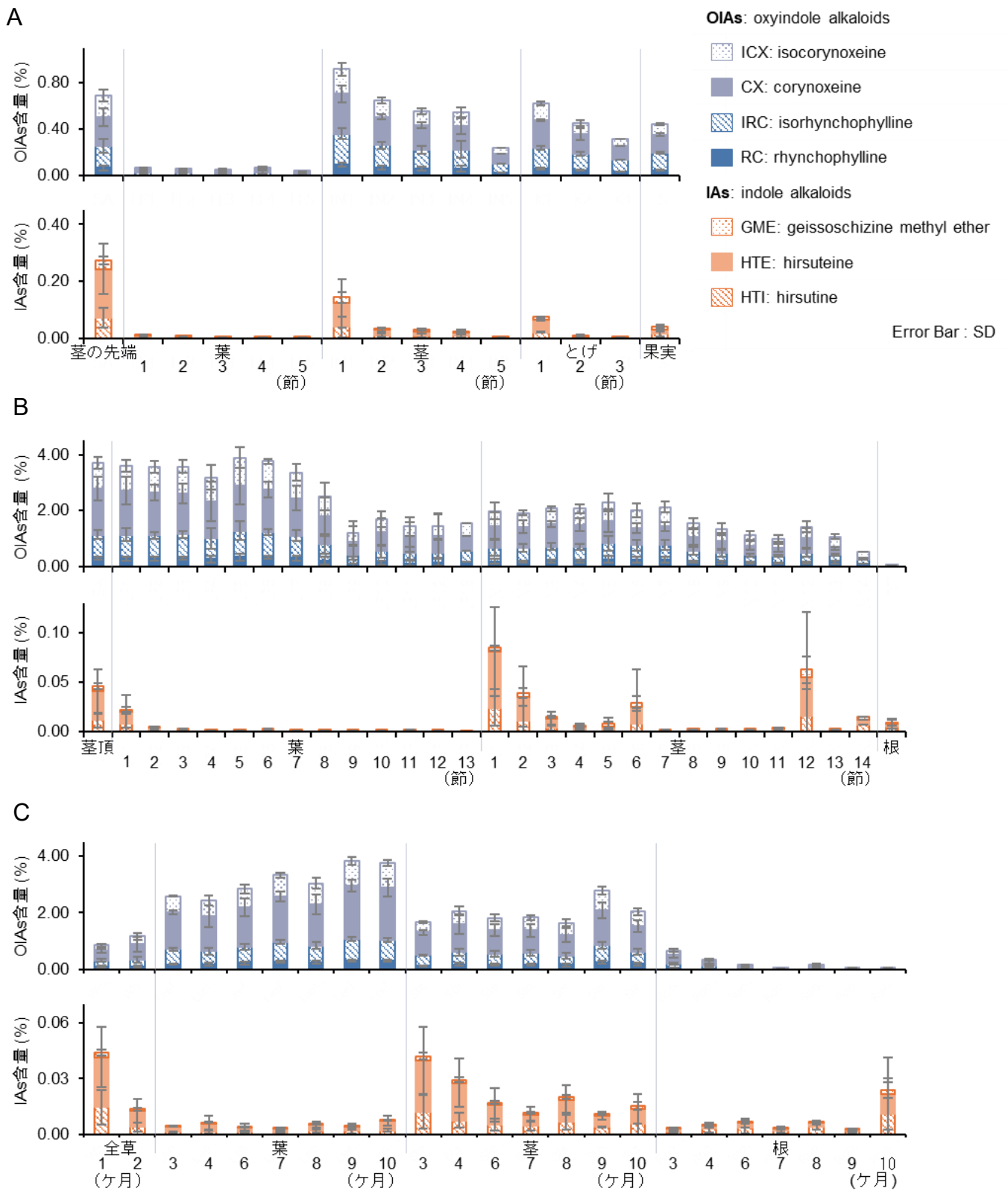


図 11 組織部位、生育ステージにおける乾燥重要あたりの MIAs 含量 (%) の比較 (上段: OIAs、下段: IAs)
 A: 成木の組織部位別 B: 無菌植物体 (発芽後 10 および 12 ヶ月) の組織部位別
 C: 無菌植物体 (発芽後 1~10 ヶ月) の組織部位および経時別

表 4 無菌植物体（発芽後 1~10 ヶ月）の組織部位および経時別の MIAs 含量（%）

N	OIAs						IAs						OIAs(%)		IAs(%)		
	RC:		IRC:		CX:		ICX:		HTI:		HTE:		GWL:		Sum	Sum	
	rhynchophylline(%)	SD	isorhynchophylline(%)	SD	corynoxine(%)	SD	isocorynoxine(%)	SD	hirsutine(%)	SD	hirsutine(%)	SD	geissoschizine methyl	SD	Sum	Sum	
全草 1ヶ月	0.0946	0.0214	0.2152	0.0495	0.3356	0.0705	0.2073	0.0412	0.0093	0.0270	0.0164	0.0027	0.0017	0.8471	0.0442	0.8471	0.0442
全草 2ヶ月	0.0954	0.0357	0.2463	0.0974	0.5422	0.2641	0.2773	0.1187	0.0039	0.0086	0.0063	0.0010	0.0007	1.1612	0.0135	1.1612	0.0135
葉 3ヶ月	0.1754	0.0131	0.5387	0.0430	1.3137	0.0676	0.5619	0.0218	0.0013	0.0029	0.0002	0.0003	0.0000	2.5898	0.0045	2.5898	0.0045
葉 4ヶ月	0.1718	0.0488	0.4788	0.1193	1.2247	0.3992	0.5578	0.1832	0.0015	0.0044	0.0040	0.0004	0.0003	2.4330	0.0063	2.4330	0.0063
葉 6ヶ月	0.2184	0.0515	0.5730	0.1113	1.4114	0.3144	0.6393	0.1491	0.0012	0.0008	0.0025	0.0003	0.0003	2.8421	0.0041	2.8421	0.0041
葉 7ヶ月	0.2683	0.0344	0.6931	0.0785	1.6211	0.1759	0.7554	0.0841	0.0010	0.0005	0.0018	0.0002	0.0001	3.3379	0.0030	3.3379	0.0030
葉 8ヶ月	0.2405	0.0543	0.6060	0.1336	1.4487	0.3588	0.7433	0.1882	0.0018	0.0008	0.0016	0.0003	0.0002	3.0384	0.0056	3.0384	0.0056
葉 9ヶ月	0.3025	0.0411	0.7743	0.0734	1.8748	0.2025	0.8760	0.1479	0.0018	0.0013	0.0024	0.0004	0.0002	3.8275	0.0045	3.8275	0.0045
葉 10ヶ月	0.2975	0.0335	0.7404	0.0734	1.8509	0.3108	0.8776	0.1113	0.0021	0.0009	0.0052	0.0006	0.0002	3.7664	0.0073	3.7664	0.0073
茎 3ヶ月	0.1332	0.0096	0.3752	0.0193	0.7938	0.0748	0.3694	0.0342	0.0123	0.0093	0.0183	0.0025	0.0018	1.6716	0.0421	1.6716	0.0421
茎 4ヶ月	0.1740	0.0577	0.4385	0.1213	0.9905	0.3436	0.4647	0.1429	0.0074	0.0203	0.0130	0.0016	0.0013	2.0677	0.0293	2.0677	0.0293
茎 6ヶ月	0.1623	0.0436	0.3949	0.0987	0.8248	0.2053	0.4356	0.1167	0.0052	0.0034	0.0106	0.0012	0.0009	1.8177	0.0171	1.8177	0.0171
茎 7ヶ月	0.1708	0.0343	0.4027	0.0984	0.8058	0.2250	0.4457	0.0901	0.0045	0.0027	0.0063	0.0009	0.0004	1.8250	0.0116	1.8250	0.0116
茎 8ヶ月	0.1481	0.0447	0.3458	0.1038	0.7178	0.2572	0.4210	0.1223	0.0069	0.0046	0.0116	0.0014	0.0011	1.6327	0.0200	1.6327	0.0200
茎 9ヶ月	0.2508	0.0457	0.5964	0.1187	1.2390	0.2942	0.6938	0.1415	0.0039	0.0060	0.0022	0.0010	0.0000	2.7801	0.0109	2.7801	0.0109
茎 10ヶ月	0.1841	0.0385	0.4341	0.0910	0.9063	0.2212	0.5239	0.1230	0.0056	0.0077	0.0080	0.0019	0.0022	2.0484	0.0154	2.0484	0.0154
根 3ヶ月	0.0570	0.0142	0.1515	0.0354	0.3056	0.1023	0.1490	0.0474	0.0016	0.0005	0.0015	0.0003	0.0001	0.6631	0.0033	0.6631	0.0033
根 4ヶ月	0.0354	0.0125	0.0852	0.0328	0.1445	0.0663	0.0847	0.0359	0.0019	0.0019	0.0016	0.0003	0.0002	0.3497	0.0052	0.3497	0.0052
根 6ヶ月	0.0162	0.0117	0.0403	0.0305	0.0582	0.0554	0.0340	0.0291	0.0036	0.0033	0.0024	0.0006	0.0007	0.1486	0.0065	0.1486	0.0065
根 7ヶ月	0.0042	0.0032	0.0113	0.0087	0.0127	0.0111	0.0072	0.0059	0.0021	0.0013	0.0010	0.0002	0.0001	0.0354	0.0034	0.0354	0.0034
根 8ヶ月	0.0167	0.0122	0.0382	0.0238	0.0567	0.0341	0.0416	0.0315	0.0041	0.0018	0.0009	0.0003	0.0003	0.1532	0.0065	0.1532	0.0065
根 9ヶ月	0.0050	0.0010	0.0132	0.0022	0.0161	0.0021	0.0096	0.0001	0.0018	0.0007	0.0004	0.0002	0.0001	0.0439	0.0028	0.0439	0.0028
根 10ヶ月	0.0043	0.0012	0.0158	0.0048	0.0201	0.0100	0.0080	0.0018	0.0113	0.0191	0.0106	0.0022	0.0042	0.0481	0.0240	0.0481	0.0240

min	0.0042	0.0113	0.0127	0.0072	0.0010	0.0007	0.0002	0.0354	0.0028
max	0.3025	0.7743	1.8748	0.8776	0.0146	0.0273	0.0027	3.8275	0.0442

1.3 考察

カギカズラの *in vitro* の無菌培養系を確立に成功し、無菌植物体の茎と、釣藤鈎として用いる成木のとげおよび茎の代謝物の類似性を確認した。本結果は、カギカズラが無菌条件下でも一貫して MIAs を生合成できることを示しており、無菌植物体を用いた MIAs 生合成研究が、釣藤鈎の品質を保証するための信頼できるモデルシステムとして機能する可能性を強調した。

OIAs は IAs から酸化が進むと考えられるが、成木と比べて無菌植物体における OIAs が高含量であった。この現象の理由として、*in vitro* 条件下における環境ストレスにより酸化が進行した可能性が考えられる。また、茎に着目すると、無菌植物体および成木のいずれにおいても、新しい組織である第 1 節が、無菌植物体では第 14 節、成木では第 5 節が該当する古い組織よりも高い OIAs 含量を示した。この結果からは、IAs から OIAs に変わる代謝の制御が生育ステージによる変化することや、生育ステージの若い植物体の方が古い植物体よりも酸化活性が高い可能性が推察された。一方で、今回用いた成木サンプルは当年枝であり、生育時間を考慮すると無菌植物体と生育期間はほぼ同等である。このことから、無菌植物体の茎と、釣藤鈎として用いる成木のとげおよび茎の代謝物が類似したと推察される。時間軸を考慮した条件設定によりこの点は明らかになると考える。

カギカズラ含有 MIAs の生合成に焦点をあてると、他の植物における MIAs と同様に前駆体は *strictosidine* であるが [41-43]、その全体像は未だ十分に解明されていない。このため、生合成経路の解明は釣藤鈎の品質保証において有用なアプローチになりうる。しかしながら、カギカズラの成木は大型のつる性植物であり生育に長期間を要するため栽培管理が難しく、実験材料としての扱いやすさに課題がある。一方、*in vitro* の無菌培養系は、制御された生育条件下で遺伝的に均一な植物を短期間に大量に生産することができ、代謝物の生合成経路の解明を容易にする効果的なツールである。カギカズラは育種研究分野において、成木を用いたクローン増殖等の組織培養法開発や、クローン植物を用いた MIAs を含む代謝物の定量的アッセイが行われきたが [44-47]、*in vitro* の無菌

植物体を用いた生合成に関する先行研究はない。培養植物を活用した生合成経路解明による生薬品質向上の例としては「黄連」の研究があり [48]、基原植物 *Coptis japonica* Makino における Benzyloisoquinoline alkaloid 生合成経路の解明を通じて、関連する代謝物や制御する遺伝子を特定し、優良系統の選抜や代謝工学を応用した目的成分の効率的な生産研究が進展している。木本植物を研究材料として使用することは難しいが、カギカズラでは本モデルシステムの活用することにより、MIAs 生合成解明において、新たな知見をもたらすと考えられる。これにより、釣藤鈎における RC や HTI の代謝制御解明等の基礎研究に貢献することが示唆された。

無菌植物体を用いたメタボローム分析からは、組織部位や異なる生育ステージにおける主要 MIAs の蓄積の特徴が確認された。MIAs の生合成に関しては、*Catharanthus roseus* (L.) G. Don において、葉の異なる種類の細胞で多段階の酵素反応を通じて合成され、発達や成長に関連する調節機構が存在することが示唆されている [49-51]。カギカズラの MIAs についても、茎頂や茎、葉の上部で高含量であること、葉における OIAs が経時的に増加する傾向が確認されたことから、これらの組織について生合成における役割の検証が必要であると考えられる。

さらに、生薬の使用部位に関して考察すると、成木のとげと茎の代謝物のプロファイルは類似しており、RC をはじめとした OIAs、HTI をはじめとした IAs はいずれの組織にも含まれていた。加えて、無菌植物体において、茎における経時的な MIAs 含量の変動が小さいことが示された。釣藤鈎の使用部位としてとげを用いることについては、本草考証による検証が行われてきたが [52]、本結果は成木のとげと茎の品質の類似性や、品質の一貫した安定性を示しており、品質管理の観点からも生薬の原料としての適性が示唆された。

本研究では、生薬含有成分のバラつきを生み出す内因性要因に対処するためにカギカズラの *in vitro* の無菌培養系を確立した。また、無菌植物体を用いてメタボローム解析を行い、MIAs の生合成に関する基盤情報と考察を得た。メタボローム解析により生薬品

質の多面的な側面が補完される可能性を示したことは、生薬の品質保証におけるひとつの有効な手段になることを示唆した。MIAs の代謝については直接的に論じることはなかったが、今後、無菌植物体を材料として安定同位体標識を用いた代謝物の経時的変化の解析や新規中間体の候補化合物探索、さらに遺伝子発現量の評価を行うことで、本研究の結果を検証する知見が得られると期待される。

第2部

シナニッケイに関するメタデータを用いた多変量解析

2.1 緒言

生薬含有成分の組成および含量は多岐にわたる要因により変動し、外因性要因としては、生育環境（土壌、温度、水分、pH 等）や、収穫時期、収穫後処理等が挙げられる。ここでは、桂皮の含有成分に影響を及ぼす外因性要因に対処するため、栽培条件、形態および品質に関するメタデータを取得し、多変量解析を用いて成分変動要因の探索を行った。

最初に、桂皮の主要産地である東興、西江および広南地域において、シナニッケイの形態および成分含量を比較し、主要な3産地における区別点を把握した。続いて、CAL含量の変動要因を検証することにより、栽培環境や形態データを用いた桂皮の品質管理における指標に関する知見を得ることを目指した。

2.2 結果

2.2.1 産地、樹齢による形態および成分含量の変化

現地調査は、2019年4月に実施した。中国産桂皮の産地として東興（広西壮族自治区防城港市東興市）、西江（広西壮族自治区玉林市容県）、広南（広東省肇慶市高要区）の3地点を選定した。現地調査では、畑で育てた苗を山の斜面に定植し、林として栽培管理が行われている様子を確認した。樹皮の剥皮は刃物と水牛の角を加工した道具を用いた（図 12）。東興桂皮として1~18年生の61サンプル、西江桂皮として1~21年生の74サンプル、広南桂皮として1~20年生の73サンプル、合計208サンプルを採取した（表 5）。

メタデータとしては、37項目を取得した（表 6）。栽培環境データとして標高および土壌に関する24項目、形態データとして樹高、幹周、樹皮の厚み、油層の厚み、および油層の割合を取得した。本研究における油層は、桂皮を横切した際の、内側の黒変部位をさす（図 13）。また、成分データとして、換算したサンプルの乾燥物に対する桂皮含有主要5成分[53]（cinnamic acid、CAL、2-methoxycinnamaldehyde、2-hydroxycinnamaldehyde、coumarin）（図 14）の含量と乾燥減量値を取得した。

取得したデータについて、シナニッケイの産地および樹齢による変化を評価した。データは箱ひげ図で示した。

形態データに関して、樹高、幹周、樹皮の厚みは樹齢と共に増加した。一方で油層は、収穫される5~8年生にて形成され始め、その後やや増加する傾向がみられた。いずれの形態データにおいても、3産地間差は小さいことを確認した（図 15）。

成分データに関して、cinnamic acidは樹齢が若いほど高含量であり、CALは樹齢と共に高含量化する傾向がみられた。2-methoxycinnamaldehyde、2-hydroxycinnamaldehyde、coumarinについては、各樹齢における含量のバラつきが大きく、顕著な傾向は確認できなかった。15-17年生の東興桂皮のサンプルの中に2-methoxycinnamaldehydeが高含量のものが存在したが、いずれの成分データも3産地間差は小さいことを確認した（図 16）。

A



B



C



D



E



F



図 12 現地調査の様子

A : 育苗中の畑 B : シナニッケイの林-1 C : シナニッケイの林-2
D : サンプルングに用いた道具 E : サンプルング F : 樹高データの収集

表 5 シナニッケイのサンプル一覧

	樹齢（年）																				合計数
	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
東興	4	-	-	3	10	7	4	10	3	1	-	1	-	4	4	7	3	-	-	-	61
西江	1	4	-	1	8	1	3	10	6	7	6	8	1	4	5	1	4	3	-	1	74
広南	1	-	1	1	9	1	3	10	7	7	5	6	4	8	3	3	2	1	1	-	73

表 6 取得したメタデータ一覧

データの分類	方法	項目
栽培環境	現地調査	<ul style="list-style-type: none"> ・ 標高 (m) ・ 樹齢 (年) ・ 土壌 24 項目*
形態	現地調査	<ul style="list-style-type: none"> ・ 樹高 (m) ・ 幹周 (cm)
	ラボ実験	<ul style="list-style-type: none"> ・ 樹皮の厚み (cm) ・ 油層の厚み (cm) ・ 油層の割合
成分	ラボ実験	<u>乾燥重量あたりの桂皮主要成分含量 (%)</u> <ul style="list-style-type: none"> ・ cinnamic acid: CA ・ cinnamaldehyde: CAL ・ 2-methoxycinnamaldehyde: MCAL ・ 2-hydroxycinnamaldehyde: HCAL ・ coumarin <u>関連項目</u> <ul style="list-style-type: none"> ・ 乾燥減量 (%)

*土壌評価項目の詳細

基本情報

pH(活性酸性度)、全酸性度、電気伝導度(mmho/cm)、
陽イオン交換容量(me/100g ; 保肥力)

成分含量 (%、ppm)

有機物、NO3-N、P、K、SO4-S、Zn、
Fe、Mn、Cu、Ca、Mg、Na

土壌における各成分の飽和度 (%)

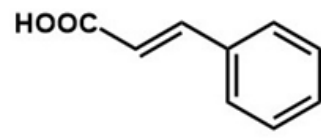
飽和 H、飽和 K、飽和 Ca、飽和 Mg、飽和 Na

土壌における各土質の割合 (%)

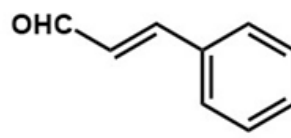
砂の割合、シルトの割合、粘土の割合



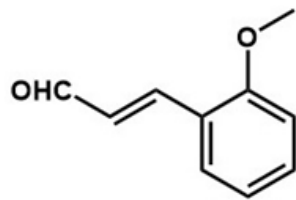
図 13 桂皮油層の様子；樹皮内側の黒変部位



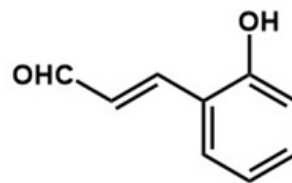
cinnamic acid



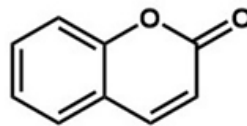
cinnamaldehyde



2-methoxycinnamaldehyde



2-hydroxycinnamaldehyde



coumarin

図 14 桂皮に含まれる主要 5 成分

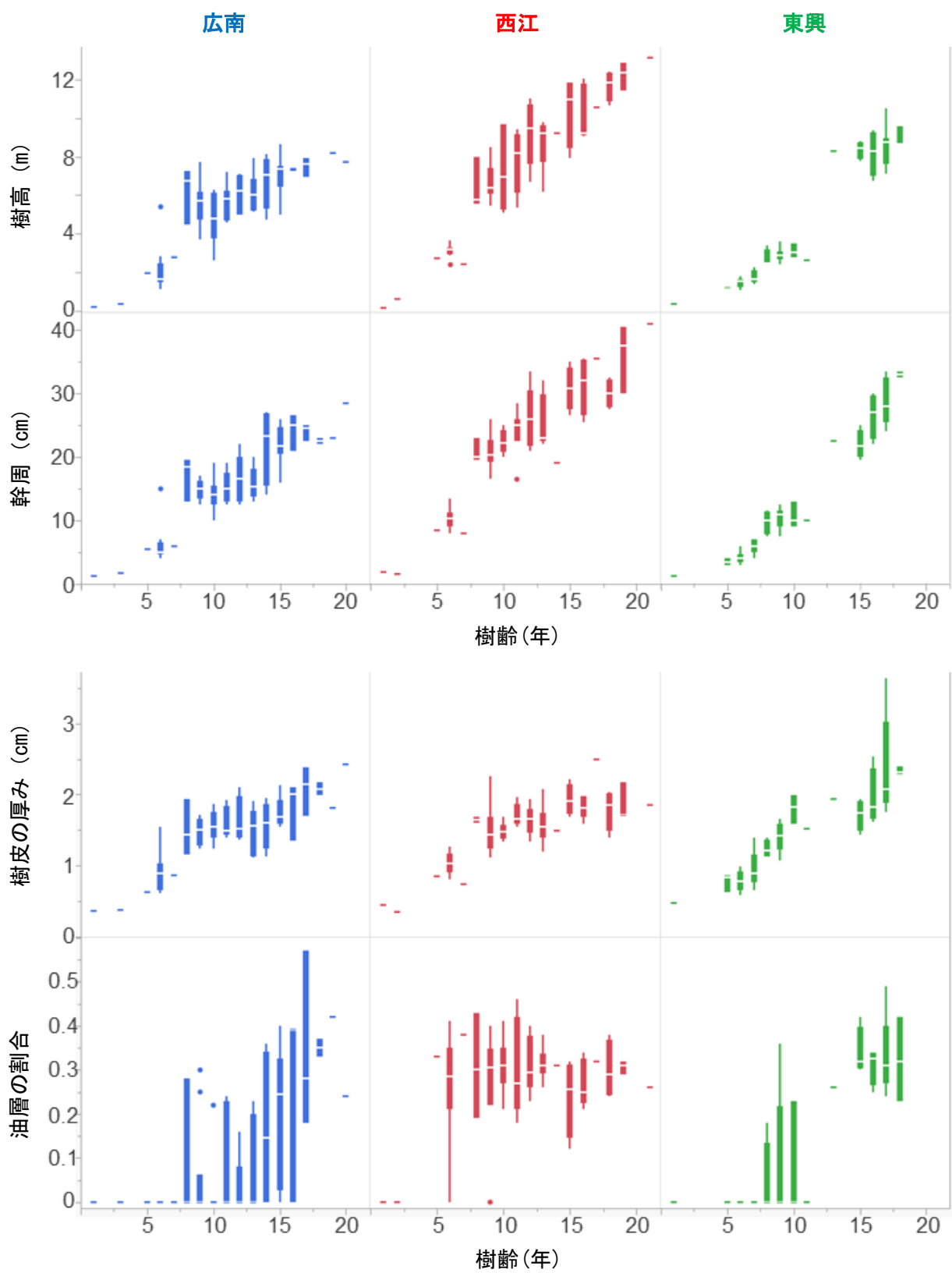


図 15 シナニッケイの産地、樹齡による形態の変化

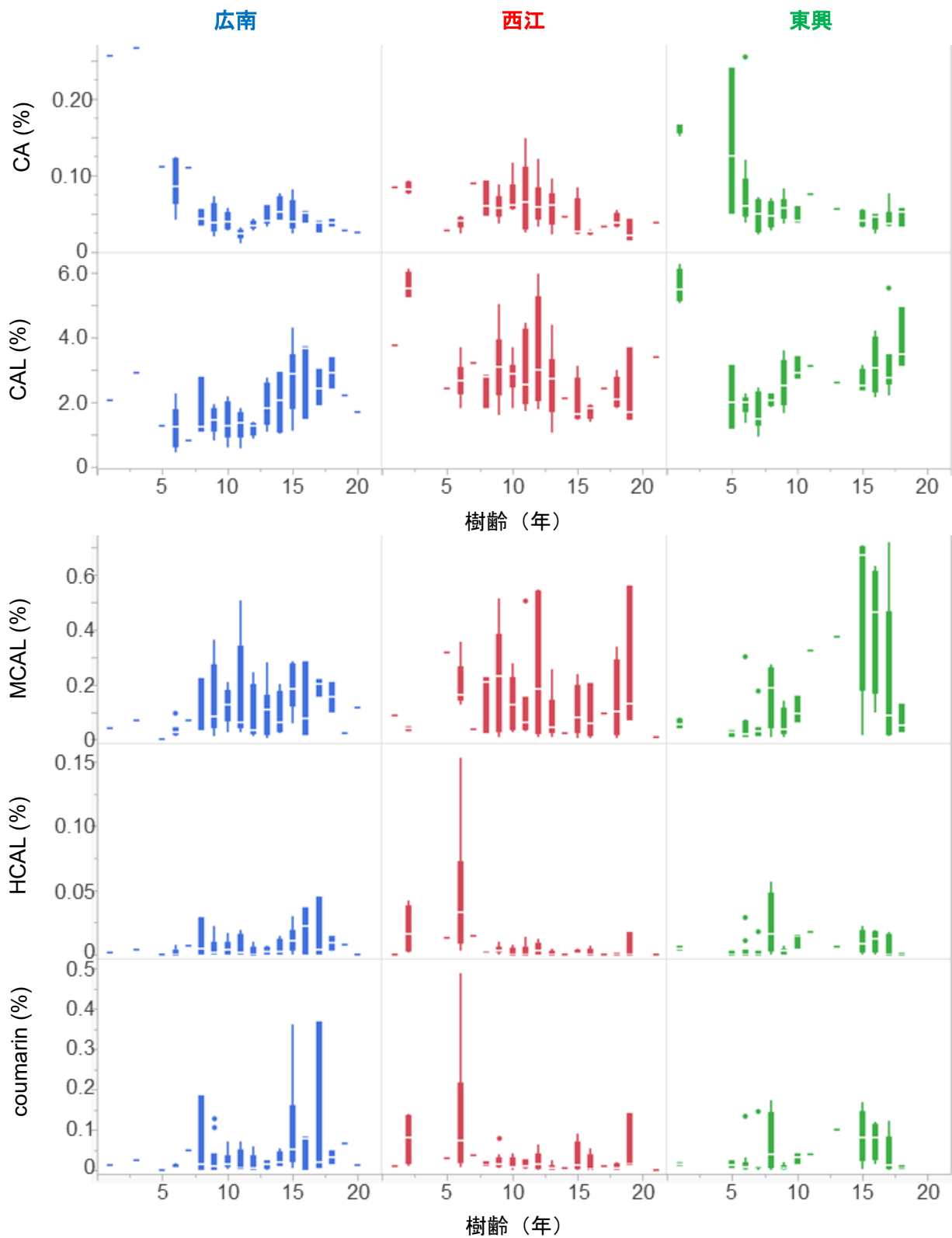


図 16 シナニッケイの産地、樹齢による乾燥重要あたりの成分含量 (%) の変化
 CA : cinnamic acid、CAL : cinnamaldehyde、
 MCAL : 2-methoxycinnamaldehyde、HCAL : 2-hydroxycinnamaldehyde

2.2.2 産地間における区別点の解析

取得した 37 項目×208 サンプルのデータセットを作成し、多変量解析を行った。最初に、3 産地のシナニッケイにおける区別点を解析するために、t-分布型確率的近傍埋め込み法（以下、t-SNE）を実施した。t-SNE は 2008 年頃に開発されたデータのクラスタリングやパターンを把握する手法の 1 つであり、高次元データを圧縮して可視化することができる。その際、非線形な構造を保持しつつ、データの局所的な構造を強調できるため、似た特性を持つデータポイントを近くに位置する近接性を強調することができ、データの分布やパターンの直感的な理解が可能である。遺伝子データ、テキストデータ、画像データ等の特徴量が多いデータセットに使用され、食品栄養成分の視覚化にも応用されている [54]。今回はデータを二次元マップに圧縮した。

t-SNE によるクラスタリングの結果、スコアプロットにおいて、3 産地のシナニッケイは区別されたが、産地内でも複数のグルーピングが見られ、一貫した傾向は確認されなかった（図 17）。そこで、クラスタリングされた変動要因を判別するためにローディングプロットを確認した。ローディングプロットでは、どの変動要因がクラスタリングに寄与しているかを確認でき、原点から離れるほど寄与が大きいことを示している。原点周辺に形態データや成分データが集まり、原点から離れたところに栽培環境データがプロットされていることが確認された（図 18）。このことから、形態データや成分データよりも栽培環境データの影響を受けてクラスタリングされていることが示唆された。すなわち、3 産地は栽培環境データで区別されていることが確認された。産地の違いが栽培環境データで区別されていることから、本結果に矛盾はないと考える。箱ひげ図を用いた比較と同様に、t-SNE においても 3 産地間で形態や品質に差異はないことが示唆された。

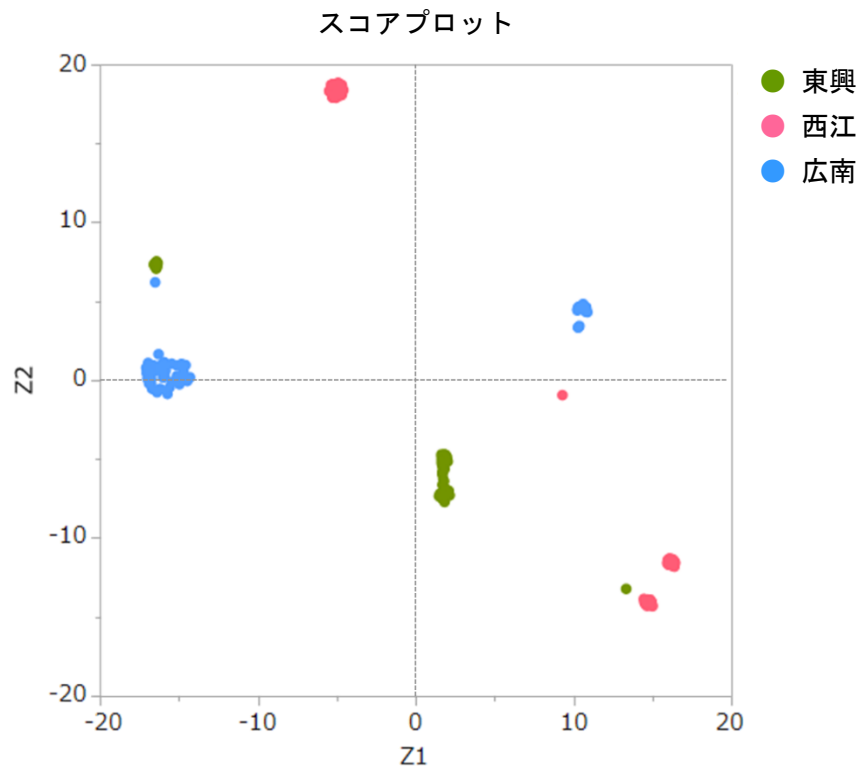


図 17 t-SNE によるクラスタリングの結果；スコアプロット

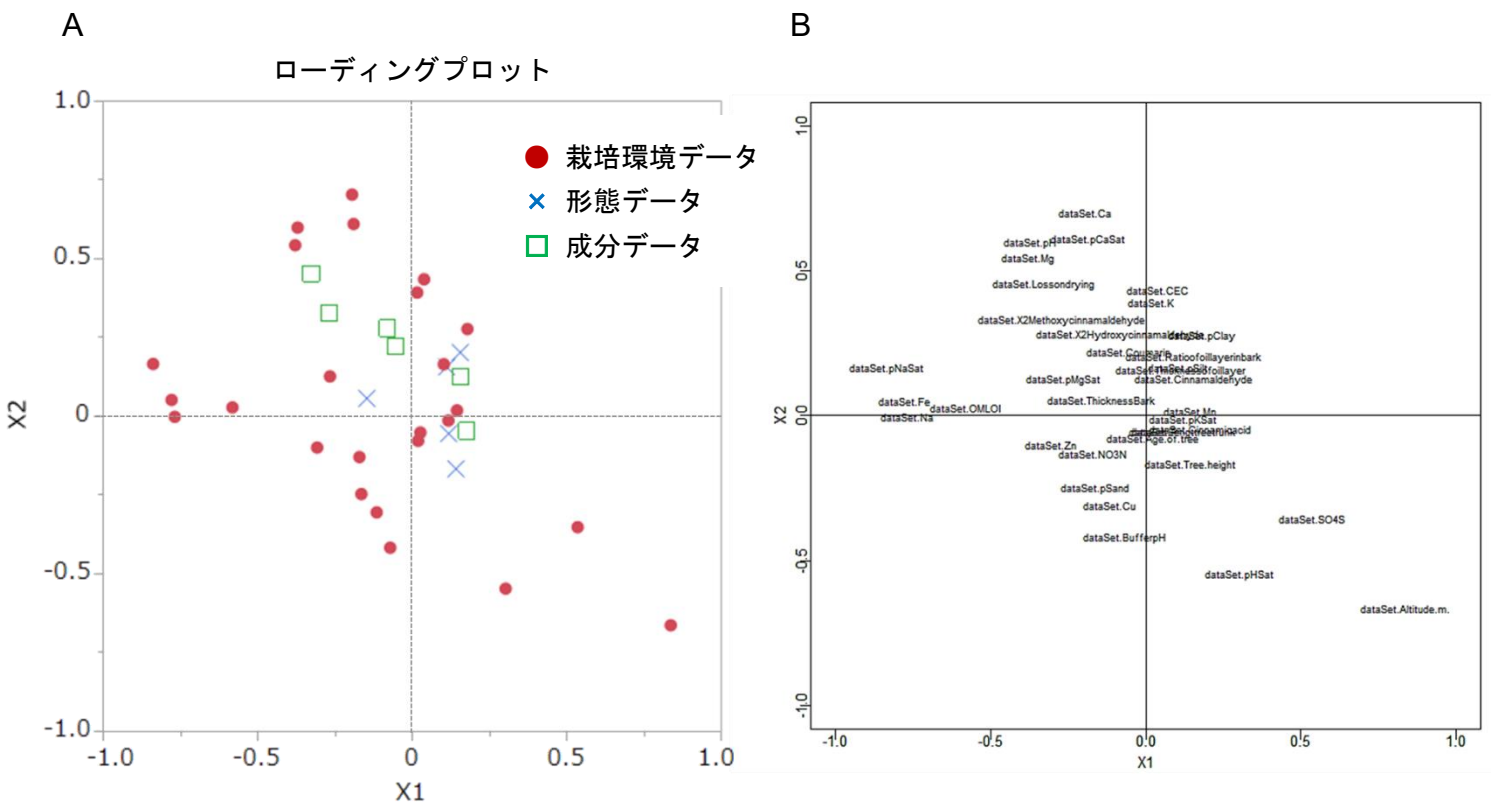


図 18 t-SNE によるクラスタリングの結果；ローディングプロット

A：データ分類別プロット B：プロットの詳細

2.2.3 成分含量の変動要因の解析

シナニッケイにおける成分含量の変動要因を解析するため、成分データとして取得した5成分について部分最小二乗法（以下、PLS）を実施し、含量値の予測モデルを作成した。PLSは回帰分析の一種であり、変数間の関係性をモデル化する手法である。特に、複数の変数間の関係を同時に考慮することができる点が特徴である。さらに、説明変数同士に相関が見られる多重共線性への耐性が強く、第二種の過誤を避けることができるため、PLSを選択した。また、成分データにおいて3産地間の差異はないことから、解析は産地を区別せずに行った。

本解析では、全てのデータをモデル構築用の訓練データおよびテストデータとして利用し、クロスバリデーションを用いることで作成したモデルの信頼性を確認した。Q²値はモデルの汎化能力を評価する指標であり、値が1に近いほど高い予測性能を意味する。一方、R²値は作成したモデルがデータの変動をどれだけ説明できているか、その適合度を示す指標であり、1に近いほどモデルの説明力が高いことを意味する。本解析においては、R²値はテストデータに対する予測性能を評価するために計算した。R²値の算出は予測残差平方和を基に行い、最適な成分数（以下、best comp.）のもとで評価した。PLSにおけるbest comp.とは、オーバーフィッティング、すなわち訓練データに対する性能は高くなるがテストデータに対する予測性能が低下する事態を避けるために選ばれる成分数を指し、モデルがデータを最も効果的に説明し、予測性能を最大化するために重要な役割を果たす。

回帰分析を行った結果、CAL含量の予測モデルはQ²値が0.539、R²値が0.675であり、cinnamic acid、2-methoxycinnamaldehyde、coumarinよりも値が高いことが確認された（表7）。さらに、best comp.に基づいて、実測値をzスコア化したY originalと、PLSモデルから得た予測値Y predの散布図を描くと、CALの相関係数(r)は0.821であり、良好な線形性が得られた（図19）。2-hydroxycinnamaldehydeについては良好な含量予測モデルが作成されたが、本試験で用いたサンプルの約4割において定量値が0%であり、訓練データ数が不足していたため解析が不十分であったと推察された。

CAL 含量の予測モデルにおける説明変数の重要度を評価するため、PLS 係数を算出し、棒グラフにまとめた (図 20)。PLS 係数とは回帰係数を指し、各説明変数が応答変数に与える影響の大きさを表す。数字が大きいほど影響度が高く、正の値は正の相関、負の値は負の相関を示す。栽培環境データの土壌 pH、標高、形態データの油層の割合、および乾燥減量値は正の相関を持ち、栽培環境データの土壌中の Cu および Zn 濃度が負の相関を持つことが確認され、CAL 含量に寄与することが示唆された。

表 7 各予測モデルにおける Q² 値、R² 値、および best comp. の一覧

	Q ²	R ²	best comp.
cinnamic acid	0.448 r= 0.670	0.491 r= 0.700	4
cinnamaldehyde	0.539 r= 0.746	0.675 r= 0.821	5
2-methoxycinnamaldehyde	0.214 r= 0.471	0.321 r= 0.567	8
2-hydroxycinnamaldehyde	0.915 r= 0.957	0.942 r= 0.970	4
coumarin	0.025 r= 0.229	0.142 r= 0.378	4

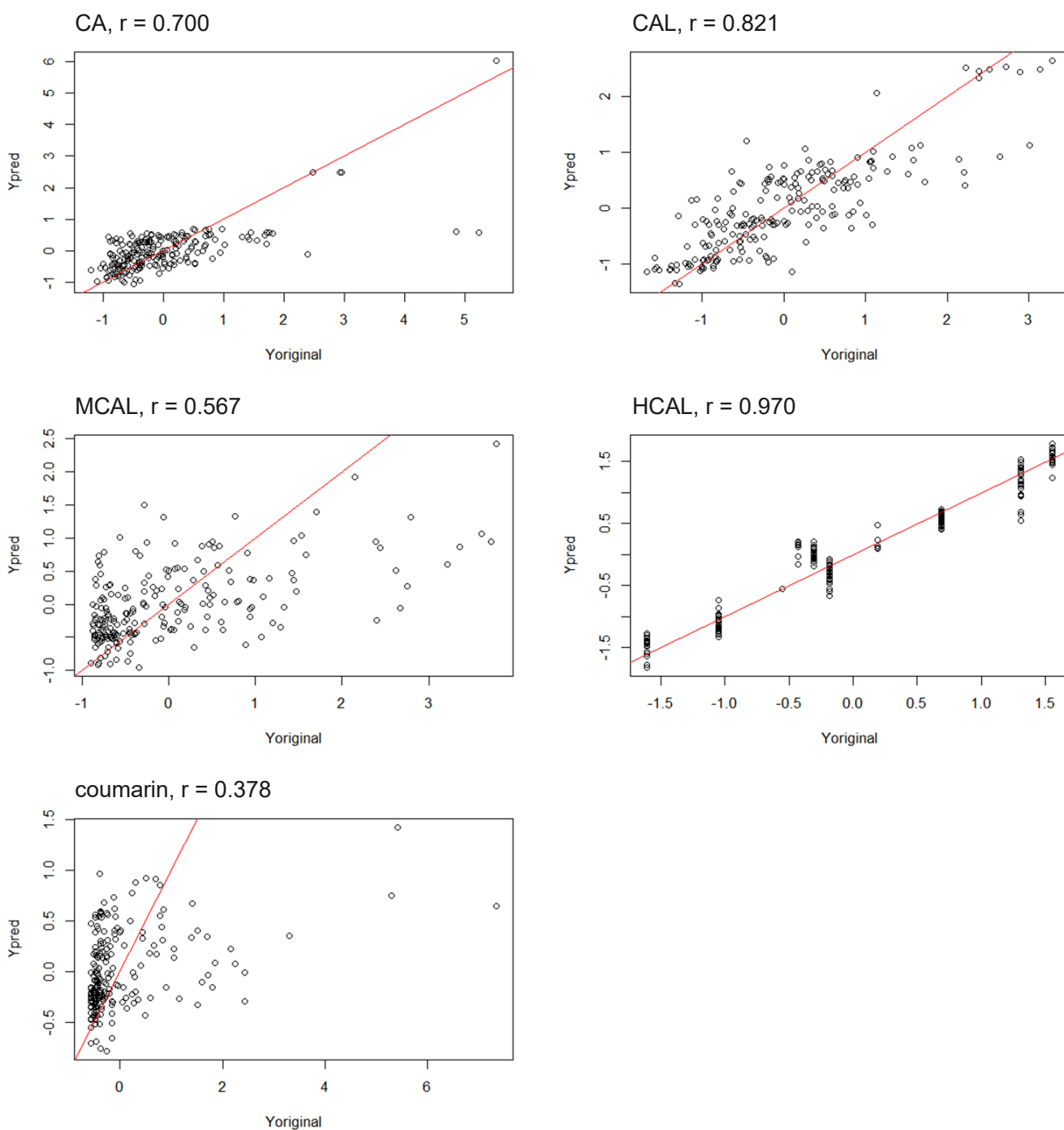


図 19 各成分の実測値と予測値の散布図 (X 軸 : z スコア化した実測値、Y 軸 : 予測値)
 CA : cinnamic acid、CAL : cinnamaldehyde、
 MCAL : 2-methoxycinnamaldehyde、HCAL : 2-hydroxycinnamaldehyde

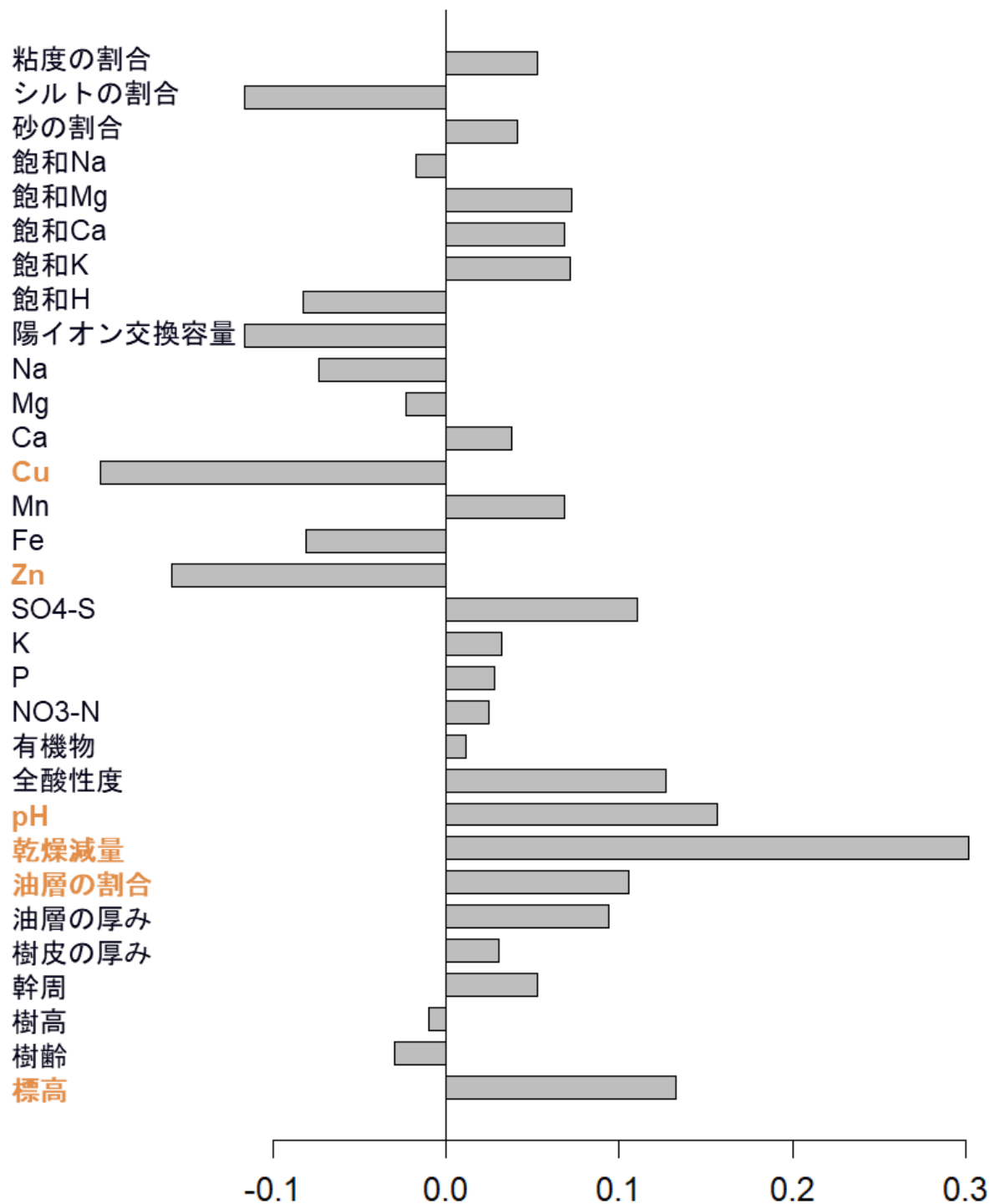


図 20 CAL 含量に対する PLS 係数

2.3 考察

各解析により、3産地のシナニッケイの形態や成分含量の差異は小さく、栽培環境でクラスタリングされたことが確認された。これにより、中国3産地間で品質に明確な区別点はないことが示唆された。また、CAL含量に影響を与える要因として、標高、土壤中のCu/Zn含量、土壌pHが挙げられた。これらの栽培環境データは定植前に確認できるため、検証を進めることで、栽培適地の選定につながる可能性が示唆された。土壌に関してシナニッケイは林で管理していることから、客土のような土壌の入れ替えは非常に大掛かりであり、また施肥による土壌改良は効果が不確実であるため、育苗時や定植時の判断基準として活用することが望ましいと考える。このため、土壌は環境の影響を大きく受けることを考慮し、年間を通じた変動確認等の追加の検証が必要である。

現地での聞き取り調査から、現地採取者は桂皮の品質を判断する際に油層の色と厚みを確認していることがわかった。本解析では、油層の割合とCAL含量に正の相関があることが確認され、油層を用いた経験に基づく品質判断がデータとして実証された。油層の割合は、実験設備を必要とせず誰でも即時に確認することができるため、収穫した桂皮の品質管理において重要な指標となる。具体的には、CAL含量のバラつきを抑え、製品の均一性を保つことが可能である。また、油層の厚みが一定の基準を満たしている場合、製品の市場価値を高めることにも寄与する。このように、油層の厚みは品質管理において実用的かつ簡便な指標として活用できることが示された。

さらに、油層の形成時期が5~8年生であり、現行の中国産シナニッケイの収穫時期は妥当であると考えられた。樹齢に伴う成分含量の変化として、cinnamic acidは樹齢が若いほど高含量であり、CALは樹齢と共に増加する傾向がみられたが、シナニッケイの生合成において、cinnamic acidがCALの前駆体であるため矛盾はない[55]。さらに、生合成の観点では、6年生のシナニッケイにおいてphenylpropanoidを合成する遺伝子が高い発現を示す報告もされている[56]。一方で、本研究ではCAL含量は樹齢と共に高くなる傾向があり、また、10年生のシナニッケイにおいてCAL含量が最も高くなると報告した先行研究もある[57]。したがって、収穫適期については樹木の栽培管理の手間や

得られる収量、病気や枯死のリスクなどを考慮し、慎重に検討する必要があると考える。

また、乾燥減量値と CAL 含量に正の相関があったことは、収穫後の加工工程の最適化により、CAL 含量が維持される可能性を示唆している。過度な乾燥により、桂皮の主たる揮発性成分である CAL の含量を低下させる可能性があるため、乾燥方法を最適化することにより CAL 含量を管理できると考えられる。乾燥工程における温度や時間の調整、湿度管理等について検討することで、より高品質な桂皮の生産が可能になると期待される。

本研究では、生薬含有成分のバラつきを生み出す外因性要因への対処するため、シナニッケイの栽培環境、形態、成分に関するメタデータの多変量解析を行い、CAL 含量の変動要因を探索した。また、最適な生産条件や経験的な品質の良否判断に関する考察を行った。多変量解析によって、メタデータ間の関係性を示すことができたことは、生薬品質の管理体制が強化される可能性を示しており、シナニッケイの生薬原料としての品質保証における有効な手段となることが期待される。今後は、栽培環境データのさらなる積み増しと、加工工程も含めたメタデータを収集、解析することで、本研究の結果を検証し、求める品質を満たし、均一な品質のシナニッケイの生産に向けた知見が得られると考えられる。

総括

生薬含有成分に影響を及ぼす内因性および外因性要因に対処し、原料生薬の生産工程において望ましい品質を保証するため、含有成分の管理に関する知見を構築することを目的とし、オミクスデータおよびメタデータを活用したアプローチを提案した。

第1部「カギカズラ無菌植物体におけるメタボローム解析」では、カギカズラの *in vitro* 無菌培養系を確立し、MIAs の組織部位や生育ステージによる含量変動を評価した。この結果、MIAs の動態を考察し、生合成に関する基盤情報を得ることができた。第2部「シナニッケイに関するメタデータを用いた多変量解析」では、栽培、形態および成分に関するメタデータを取得し、中国主要産地における形態および成分含量を比較することにより、主要な3産地間における区別点を把握した。また、CAL 含量の変動要因を検証し、栽培環境や形態データを用いた桂皮の品質管理における指標に関する知見を得た。

我が国において生薬は法的規制である日局のもとで管理されているが、医薬品として利用するにはその特性を理解し、適切に活用する必要がある。生薬成分は天然由来の化合物から成り、化合物同士が相互に作用することで効果を発揮するため、多成分系であることを踏まえた品質管理が重要である。本研究では、メタボローム解析を通じて生合成研究を行い、メタデータを用いた多変量解析により成分の変動要因を解明することが、生薬の生産工程における品質保証、特に含有成分の管理に関して有益な知見を提供する可能性を示唆した。さらに、オミクスデータの一環としてゲノミクスやトランスクリプトミクスを取り入れることで、基原植物の遺伝的特性を考慮した品質管理が可能となり、より効果的な生薬生産が促進されることが期待される。

また、オミクスデータやメタデータの活用は、釣藤鈎や桂皮以外の生薬にも展開可能であり、生薬の品質向上にとどまらず、漢方薬の品質向上にも寄与する可能性がある。今後、漢方処方品質データや、生薬および漢方処方の薬理データ、患者の投薬情報やバイタルデータ等のさらなるデータを収集し、分析および解析技術の高度化を進めることで、伝統医学における科学的理解の深化が期待される。本研究が、今後の漢方医学における生薬および漢方薬の品質保証に新たな視点をもたらすことを期待する。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始温かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院遺伝子資源応用研究室教授 山崎真巳博士に、心から感謝の意を表します。また、貴重なご助言をいただき、多くの指導をしてくださった同助教 杉山龍介博士、数々の有意義な討論を通じて支えてくださった同研究室の皆様にも、深く感謝申し上げます。

実験の実施および本論文の取りまとめに際し、多大なるご支援と激励をいただいた星薬科大学植物学研究室准教授 須藤浩博士、奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科教授 金谷重彦博士、南京農業大学園芸学部中药材研究所副教授 汪涛博士に、深く御礼申し上げます。さらに、本研究を行う機会を与えてくださった株式会社ツムラ 執行役員 渡邊義春氏、生薬本部本部長 平手豪巳氏、前生薬研究所所長 松浦匡氏、ならびに生薬研究所所長 青木勝之博士に、心より感謝申し上げます。

また、実験において植物サンプルの採取にご協力いただいた千葉県内浦山県民の森管理事務所所長 大井淑義氏、株式会社ツムラ 富田武志氏、石本玄氏、試験法の開発に関してご助言とご協力をいただいた株式会社ツムラ 青木陽一氏、西村宗一郎氏、成分分析にご協力いただいた株式会社ツムラ 飯塚裕司氏、村崎幸恵氏、小嶋千晴氏、宅間真弓氏、成分同定に尽力してくださった株式会社ツムラ 小関雄太氏に、厚く御礼申し上げます。

本研究を実施するための環境を整えてくださった株式会社ツムラ 松村郁江氏に謹んで深謝いたします。さらに、終始温かい励ましをくださった牧野文昌博士、西村浩昭博士、株式会社ツムラ 大竹真弓氏、隠岐実氏、小沢彩氏、櫻井美希氏、小栗志織氏、須賀拓弥博士、鈴木梓博士、小栗一輝博士、曾根美佳子博士、樋山肇博士、津坂宜宏博士に、心から感謝申し上げます。

最後に、今日までの学生生活を温かく見守り、いつも変わらず支えてくれた家族に、深い感謝の気持ちを込めて謝辞といたします。

実験の部

第1部

植物材料

千葉県鴨川市に自生しているカギカズラ 2 個体から、果実（種子を含む）と地上部を採取した。果実は 2022 年 11 月に、成木の地上部は 2024 年 7 月に同じ木から採取した。採取した標本（THS 110225、110226）は、(株)ツムラ生薬標本庫に保管されている。

培養

カギカズラの果実は 40 °C で一晩風乾し、乳鉢と乳棒を用いて脱種した。種子はふるいをを用いて精製した後、1~2%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸して表面を滅菌するために 10~15 分間振とうし、滅菌水で 3 回洗浄した。その後 1/2 濃度のムラシゲーストック無機塩類、1/2 濃度の B5 ビタミン、15 g L⁻¹ のスクロース、8 g L⁻¹ の寒天を含む固体培地をいれた φ90 mm のペトリ皿に播種した。2 ヶ月の培養後、苗は φ40 mm のガラスチューブに移した(図 21)。植物は生育に応じて継代培養した。*in vitro* 植物体は温度 25°C、日長 16 時間、蛍光灯 (50 μmol m⁻² S⁻¹) の下で維持した。



図 21 無菌培養の手順

実験材料

・植物サンプル

成木の地上部は、茎先端、葉、茎、とげ、および果実の5つの組織に分けた(図 22A、丸で囲んだ部位を使用)。 *in vitro* 植物体は継代していない植物を使用した。発芽後1ヶ月および2ヶ月の苗は、全草をサンプリングした(図 22B、N=6 および 10: 写真は発芽後2ヶ月)。発芽後3~10ヶ月の植物は、葉、茎、根の組織に分けた(図 22C、N= 2~9: 写真は発芽後10ヶ月)。発芽後10ヶ月および12ヶ月の植物(図 22D、N=6: 写真は発芽後10ヶ月)は、組織をさらに茎頂、葉、茎、根に分けた。葉と茎については、植物の茎頂側を第1節として節ごとに付番した。

すべてのサンプルはディープフリーザーにより-80℃で予備凍結し、凍結乾燥機を用いて乾燥した。

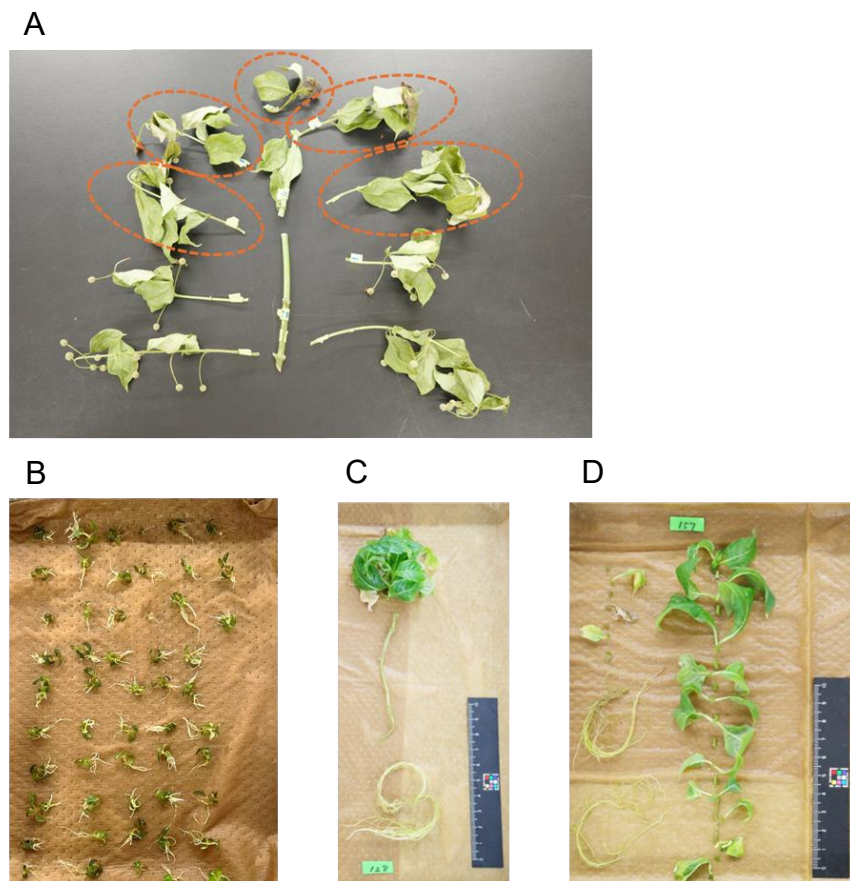


図 22 サンプリング方法の詳細

A: 成木 B: 発芽後2ヶ月の植物体

C: 発芽後10カ月の植物体 D: 発芽後10カ月の植物体

・試薬、試液

研究に用いたすべての試薬は、特級あるいは LC-MS グレード以上である。標準物質は以下の供給元から購入し、精製を行わずに使用した。rhynchophylline (RC) および hirsutine (HTI) は富士フィルム和光純薬(株)から、isorhynchophylline (IRC) は Toronto Research Chems, Inc. から、corynoxine (CX)、isocorynoxine (ICX)、corynoxine B、corynoxine、hirsuteine (HTE)、および geissoschizine methyl ether (GME) は Med Chem Express LCC から入手した。strictosidine、5 β -carboxystrictosidine、vincoside lactam、strictosamide、corynantheine、cadambine、および 3 α -dihydrocadambine は生薬釣藤鈎から単離、精製したものをを用いた。

LC-MS/MS 分析

・溶液調製

乾燥した植物サンプル 1~8 mg を ϕ 2.3 mm のセラミックビーズを含む 2.0 mL のチューブに量りとり、TissueLyser II (QIAGEN K.K.) を使用して 30 Hz で 5 分間粉碎した。抽出溶媒として、80%(v/v) methanol に 0.1%(v/v) formic acid を加えたものを使用し、4 mg mL⁻¹の濃度になるように添加した。その後、TissueLyser II を用いて 10 Hz で 20 分間振とうし、代謝物を抽出した。抽出液は 11,700 \times g で 5 分間遠心分離した後、上清の 10~100 μ L を新しい 2.0 mL のチューブに移し、遠心エバポレーターを用いて乾固した。残渣は、内部標準物質として 1 mM lidocaine を含む 10 倍量の抽出溶媒に溶解し、最終的な抽出液の濃度を 0.4 mg mL⁻¹に調製した。ブランク溶液は、植物サンプルをいれずに同じ手順で準備した。標準物質は 80%(v/v) methanol を用いて溶解した。定量に用いた 7 成分については、段階希釈し、各希釈液に 1 mM lidocaine を加えた。RC、IRC、CX、および ICX は 6 段階希釈、HTI、HTE、および GME は 5 段階希釈し、標準溶液とした。これらを Ultra-Free MC Hydrophilic PTFE (Merck K.K.) フィルターを通してろ過した後、分析に供した。

・分析条件

調製した溶液は、Vanquish UPLC システムおよび orbitrap 型質量分析計 Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific K.K.) を使用して分析を行った。分析中の検出感度の変動を考慮するため、10 サンプルごとに QC サンプルを 1 回分析した。測定条件は以下の通りである。

カラム	:	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 × 100 mm、粒子径 1.8 μm、Agilent Technologies K.K.)
移動相	:	A ; H ₂ O : formic acid = 1000 : 1 B ; acetonitrile : H ₂ O : formic acid = 1000 : 100 : 1
分析条件	:	0-0.5 min. ; 5% B、0.5-10 min. ; 30% B、10-17 min. ; 99.5%B、 17-18.5 min. ; 99.5% B、18.5-18.6 min. ; 5% B、 18.6-20 min. ; 5% B (Linear gradient conditions)
流速	:	0-17 min. ; 0.6 mL min. ⁻¹ 、17-18.5 min. ; 1 mL min. ⁻¹ 、 18.5-20 min. ; 0.6 mL min. ⁻¹
オープン温度	:	40 °C
注入量	:	10 μL

質量スペクトルは、以下のパラメータの下でエレクトロスプレーイオン化 (ESI) によって取得した。

Spray Voltage	:	Positive Ion ; 3,500 V Negative Ion ; 2,500 V
Sheath Gas	:	60 arbitrary units
Aux Gas	:	15 arbitrary units
Ion Transfer Tube Temp.	:	350 °C
Vaporizer Temp.	:	
MS 設定	:	Polarity ; Positive Orbitrap Resolution ; 30,000 Scan Range ; <i>m/z</i> 120-1,200
MS/MS 設定	:	Full scan-Data Dependent MS ² でデータ取得した Polarity ; Positive Orbitrap Resolution ; 15,000 Scan Range ; <i>m/z</i> 120-1,200 Data Dependent Mode ; Cycle Time Time between Master Scan ; 1 sec. Collision Energy ; normalized 10、30 and 50%

・多変量解析

LC-MS 分析により得られたピークは、保持時間 (0.5-17 min.) および面積値 ($> 10^6$) に基づいて選択した。データの補正はブランク溶液およびQCサンプルを使用して行い、保持時間および m/z 情報を用いてアライメントを実施した。データ取得には Compound Discoverer 3.3 (Thermo Fisher Scientific K.K.) を使用した。取得した 812 ピークの面積値は内部標準物質の面積値で除算した後に多変量解析に用いた。

主成分分析 (PCA) は、検出されたすべてのピークを用いて実施し、データは z スコアとして正規化した。解析結果は、JMP 17.2.0 (SAS Institute Japan Ltd.) Principal Components プラットフォームを使用して図示した。さらに、17 成分 (No. 1~11、14~19) は標準物質を用いてピーク同定を行い、ピークは MS スペクトル (m/z)、推定分子式、フラグメントイオン、および保持時間に基づいて同定した。残りの 5 成分 (No. 12、13、20~22) は MS スペクトル (m/z)、推定分子式、保持時間から推定した。アノテーションした成分について、各サンプルの平均値を z スコア化した後、HCA を実施した。HCA は Ward 法を用いてクラスタリングを行い、ヒートマップを作成した。これらの解析結果は、JMP の Hierarchical Cluster プラットフォームを使用して図示した。

・アルカロイド定量

LC-MS 分析から得られたピーク面積値を用いて内部標準法により定量を行った。定量に用いた RC、IRC、CX、ICX、HTI、THE、および GME の純度は 100% であると仮定した。ピークの確認は Free Style 1.8 (Thermo Fisher Scientific K.K.) を使用した。すべての検量線は原点を通過させ、定量値を Trace Finder 5.1 (Thermo Fisher Scientific K.K.) を使用して計算した。その後、Excel ver.2409 (Microsoft) を使用して植物サンプルの乾燥重量あたりの含量を算出し、百分率で表した。

第2部

実験材料

・植物サンプル

シナニッケイの樹皮は、地面から高さ 110~150 cm の部位を剥皮した。サンプル量を確保するため、3 年生は木全体から樹皮を剥がし 30 個体を合わせて 1 サンプルとした。1、2 年生は苗全体から樹皮を剥がし、100 個体を合わせて 1 サンプルとした。すべてのサンプルは現地で乾燥処理後、日本へ送付した。サンプルは㈱ツムラに保管されている。

・試薬試液

研究に用いたすべての試薬は、特級あるいは HPLC グレード以上である。標準物質は以下の供給元から購入し、精製を行わずに使用した。cinnamic acid (CA)、cinnamaldehyde (CAL)、および 2-methoxycinnamaldehyde (MCAL) は富士フィルム和光純薬㈱から、2-hydroxycinnamaldehyde (HCAL) および coumarin は東京化成工業㈱から入手した。

データ取得

・栽培環境データ

標高は、気圧センサー内蔵のスマートフォンまたはスマートウォッチを用いてデータを取得した。樹齢は、栽培管理を行っている農民への聞き込みと目視による年輪の確認により決定した。土壌は、落ち葉と 1~2 cm の表土を取り除き、植物の根が含まれない状態で 20~30 g を採集した。この作業を 1 地点につき 5 ケ所で繰り返し、1 サンプルとした。自然乾燥させた土は現地から Ward Laboratories, Inc. に送付し、24 項目の土壌データを入手した。詳細は以下の通りである：pH、Buffer pH（土壌の全酸性度）、EC（土壌の電気伝導度）、CEC（陽イオン交換容量）、土壌における各成分の含量（有機物、NO³-N、P、K、SO⁴-S、Zn、Fe、Mn、Cu、Ca、Mg、Na）、土壌における各成分の飽和度（H、K、Ca、Mg、Na）、および土壌における各土質の割合（砂、シルト、粘土）

・形態データ

樹高は、木を切り倒した場合には根元から最も高いところまでの実測値を取得した。それ以外の場合、レーザー距離計を用いて樹高を推定した。幹周は、高さ 120 cm で測定した。高さが 120 cm 未満の場合、最も太い部分を測定した。樹皮の厚みおよび油層の厚みは、ノギスを用いて 1 検体につき 3 点以上測定し、平均値を代表値とした。油層の厚みは樹皮を横切して直ちに計測した。油層の割合は油層の厚みを樹皮の厚みで除算した。

・成分データ

乾燥減量は、日局 185.01 生薬試験法に準拠して取得した。すなわち、試料 2 g をあらかじめ質量を量ったはかり瓶にとり、その質量を精密に量り 105°C で 6 時間乾燥し、デシケーターで放冷した後、質量を精密に量り、その減量を乾燥減量(%)とした。主要 5 成分の定量値は、LC-UV 分析から得られたピーク面積値を用いて、外部標準法により取得した。

LC-UV 分析

・溶液調製

粉碎したサンプル 0.25 g を遠沈管に量りとり、抽出溶媒として、 $\text{H}_2\text{O} : \text{acetonitrile} = 1 : 1$ 混液を使用し、20mL を添加した。その後振とう速度 200 r min^{-1} で 10 分間振とうし、遠心分離後、上清を 50mL のメスフラスコに取った。残留物に対し同様の操作をし、抽出液を合わせた後、抽出溶媒を加えて正確に 50 mL とし、試料溶液とした。ブランク溶液は、抽出溶媒を用いた。標準物質は、以下の手順で操作し、標準溶液とした。

- CA : 約 13 mg を量り、 $\text{H}_2\text{O} : \text{methanol} = 1 : 1$ 混液に溶かして正確に 200 mL とした。 $\text{H}_2\text{O} : \text{methanol} = 1 : 1$ 混液を用いてこの液を 20 倍希釈した。
- CAL : 約 200 mg を量り、methanol に溶かして正確に 200 mL とした。methanol を用いてこの液を 5 倍希釈した。
- MCAL : 約 15 mg を量り、methanol に溶かして正確に 100 mL とした。methanol を

用いてこの液を 10 倍希釈した。

HCAL : 約 2 mg を量り、methanol に溶かして正確に 100 mL とした。methanol を用いて 10 倍、50 倍、200 倍で希釈した。

coumarin : 約 25 mg を量り、methanol に溶かして正確に 100 mL とした。H₂O : methanol = 1 : 1 混液を用いてこの液を 5 倍希釈した。

試料溶液、ブランク溶液、標準溶液の一部を取り、11,700 × g で 5 分間遠心分離した後、分析に供した。

・分析条件

調製した溶液は、ACQUITY™ UPLC® H-Class システム (Nihon Waters K.K.) を使用して分析を行った。測定条件は以下の通りである。

【CA、CAL および MCAL】

カラム : ACQUITY™ UPLC® HSS T3
(2.1 × 100 mm、粒子径 1.8 μm、Nihon Waters K.K.)

移動相 : A ; H₂O : acetic acid (100) = 79 : 5
B ; acetonitrile

分析条件 : A : B = 4 : 1 (Isocratic conditions、15 min.)

流速 : 0.45 mL min.⁻¹

オーブン温度 : 40 °C

注入量 : 1.5 μL

測定波長 : 272 nm

【HCAL および coumarin】

カラム : ACQUITY™ UPLC® HSS T3
(2.1 × 100 mm、粒子径 1.8 μm、Nihon Waters K.K.)

移動相 : A ; H₂O : acetic acid (100) = 79 : 5
B ; acetonitrile

分析条件 : 0-15 min. ; 10% B、15-20 min. ; 95% B、20-30 min. ; 10 %B
(Linear gradient conditions、30 min.)

流速 : 0.45 mL min.⁻¹

オーブン温度 : 30 °C

注入量 : 5.0 μL

測定波長 : 272 nm

・主要成分定量

LC-UV 分析から得られたピーク面積値を用いて外部標準法により定量を行った。CA、CAL、MCAL および coumarin は一点検量線、HCAL は多点検量線（4 点）を定量に用いた。CA、CAL、MCAL、coumarin の純度は、UV スペクトルにおける 272 nm でのピークの総面積を基に算出し、HCAL は純度が 98% で保証されているため、当該値を用いて、補正を行った。ピーク面積値の確認には、Empower 3 (Nihon Waters K.K.) をした。その後、Excel ver.2409 (Microsoft) を使用してサンプルの乾燥重量あたりの含量を算出し、百分率で表した。CA、CAL、MCAL、coumarin は以下の計算式に沿って算出した。

$$\text{CA 含量 (\%)} = M_{S1} \times A_{T1} / A_{S1} / (M_T \times 2) / 40 / f_d \times 100$$

$$\text{CAL 含量 (\%)} = M_{S2} \times A_{T2} / A_{S2} / (M_T \times 2) / 10 / f_d \times 100$$

$$\text{MCAL 含量 (\%)} = M_{S3} \times A_{T3} / A_{S3} / (M_T \times 2) / 10 / f_d \times 100$$

$$\text{coumarin 含量 (\%)} = M_{S4} \times A_{T4} / A_{S4} / (M_T \times 2) / 5 / f_d \times 100$$

M_{S1-4} : 純度補正をした標準物質の秤取量(g)

M_T : シナニッケイの秤取量(g)

A_{T1-4} : 試料溶液における定量成分のピーク面積(μ V 秒)

A_{S1-4} : 標準溶液のピーク面積(μ V 秒) ※システム適合性 6 回注入のピーク面積の平均値

f_d : 乾燥減量換算係数 ※乾燥減量換算係数 = (100 - 乾燥減量値(%)) / 100

・試験成立要件

CA、CAL、および MCAL についてはシステム適合性試験として、各標準溶液 1.5 μ L を用い、上記の分析条件で試験を 6 回繰り返した際にピーク面積の相対標準偏差が 1.5% 以下である場合、coumarin についてはシステム適合性試験として、各標準溶液 5.0 μ L を用い、上記の分析条件で試験を 6 回繰り返した際にピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以

下である場合、HCAL については、得られた検量線の相関係数が 0.999 以上である場合に、データを採用した。

多変量解析

多変量解析は、R パッケージ (ver 4.2.2) をインストールし、以下の手順に沿って実施した。

・ t-分布型確率的近傍埋め込み法 (t-SNE) : コマンドプロンプト A

① 高次元空間での確率的類似度の計算 :

行にサンプル、列にメタデータをまとめたデータセットを作成し、ガウス確率分布を用いて、高次元空間での各データポイントの近さを計算し、類似度を算出した。

② 低次元空間での確率的類似度の計算 :

低次元空間において、t-分布を用いた各データポイント間の類似度を計算した。

③ KL ダイバージェンスの最小化 :

①で得た高次元空間での確率的類似度と②で得た低次元空間での確率的類似度の差が最小化になるように、低次元空間のデータポイントの配置を調整した。最小化には勾配降下法を用いた。

④ データの可視化 :

最適化された低次元空間において、メタデータを示す埋め込み記述子を取得し、データポイントの位置が決定した後、2次元マップを作成した。

・ 部分最小二乗法 (PLS) : コマンドプロンプト B

① データの前処理 :

行にサンプル、列にメタデータをまとめたデータセットを作成し、欠損値を除去した後、標準偏差が 0 の列を除外した。

② データセットの再構築 :

応答変数として主要 5 成分の含量値を定義し標準化した後、説明変数として設定した

その他のメタデータとともにデータセットを再構築した。

③ PLS 回帰モデルの構築：

部分最小二乗法（PLS）を用いて、応答変数と説明変数の関係をモデル化した。

④ モデルの評価：

交差検証を行い、 Q^2 値（モデルの予測精度）を算出した。さらに予測残差平方和を計算し、**best comp.**（最適な成分数）を特定した。また、テストデータに対する R^2 値（モデルの適合度）を算出した。

⑤ データの可視化：

最適な成分数に基づいて、テストデータに対する PLS モデルの予測値（ Y_{pred} ）と z スコア化した実測値（ $Y_{original}$ ）の散布図を示した。さらに、各説明変数に対する PLS 係数を棒グラフとして可視化した。

【コマンドプロンプト A】

```
alldata <- read.csv("keihi_tSNE" ,header=TRUE,row.names=1,as.is=FALSE,  
fileEncoding="shift-JIS")
```

```
countryG <- alldata[, 1]  
uniqG <- unique(countryG)
```

```
dataset <- alldata[, -c(1:8)]  
colnames(dataSet)
```

```
dataused <- data.frame(countryG = countryG, dataSet = dataSet)  
nonmisdata <- na.omit(dataused)
```

```
cnt <- table(nonmisdata[, 1])  
TFcnt <- cnt > 2  
length(TFcnt)  
classOK <- names(TFcnt)[TFcnt]  
nc <- length(classOK)  
nf <- dim(nonmisdata)[2]  
ns <- dim(nonmisdata)[1]  
newdata <- data.frame()  
for(i in 1:ns){  
  for(j in 1:nc){  
    if(!is.na(nonmisdata[i, 1]) & !is.na(classOK[j]) & nonmisdata[i, 1] == classOK[j]){  
      newdata <- rbind(newdata, nonmisdata[i, j])  
    }  
  }  
}
```

```
nf <- dim(newdata)[2]  
avm <- matrix(0, nrow = nc, ncol = nf - 1)
```

```
nc<-length(classOK)  
for(i in 2:nf){  
  for(cl in 1:nc){  
    TFc <- classOK[cl] == newdata[, 1]  
    avm[cl, i - 1] <- median(newdata[TFc, i])  
  }  
}
```

```

# median data
avdata <- data.frame(paste0("A", classOK), avm)

#[4] scaling by av and original data
colnames(avdata) <- colnames(newdata)
mergedata1 <- rbind(newdata, avdata)
scaledata <- scale(mergedata1[, -c(1)])

graphics.off()
if(!require(Rtsne)){
  install.packages("Rtsne")
  library(Rtsne)
}

set.seed(123)

#[5] tSNE
mtype <- "tSNE"
aa <- data.frame(mergedata1[, -c(1)])

tSNE <- Rtsne(aa)
score <- data.frame(as.character(mergedata1[, 1]), tSNE$Y)

#[6] Separation of av and original data
TFdata <- substring(score[, 1], 1, 1) != "A"
scc <- score[TFdata, ]
indivSC <- data.frame(as.character(scc[, 1]), scc[, 2:3])
avSC <- score[!TFdata, ]
labeldata <- indivSC[, 1]

# [7] mapping: score and loading prots
par(mfrow = c(1, 2))
xselect <- 1
yselect <- 2

## [7b]----- 2D plot -----
xmax <- max(indivSC[, xselect + 1]); xmax <- as.integer(xmax); xmax <- xmax + 1
xmin <- min(indivSC[, xselect + 1]); xmin <- as.integer(xmin); xmin <- xmin - 1
# -----
ymax <- max(indivSC[, yselect + 1]); ymax <- as.integer(ymax); ymax <- ymax + 1

```

```

ymin <- min(indivSC[, yselect + 1]); ymin <- as.integer(ymin); ymin <- ymin - 1
## -- merging of x and y axes
xscale <- xmax - xmin; yscale <- ymax - ymin
usescale <- max(xscale, yscale)
xmax <- xmin + usescale; ymax <- ymin + usescale

# [7c] - construction of groupdata -----
xgroup <- tapply(indivSC[, xselect + 1], indivSC[, 1], list)
ygroup <- tapply(indivSC[, yselect + 1], indivSC[, 1], list)
ngroup <- length(unique(indivSC[, 1])) # the number of class

# [7d] - Score plot
par(ps = 10, mgp = c(1, 0, 0))
xl <- paste0("Z", xselect)
yl <- paste0("Z", yselect)
plot(x = 0, y = 0, type = "n", xlim = c(xmin, xmax), ylim = c(ymin, ymax), xlab = xl, ylab =
yl,
      xaxt = "n", yaxt = "n", main = paste0("Score plot between ", xl, " and ", yl))

for(i in 1:ngroup){
  if(i < 9){
    points(xgroup[[i]], y = ygroup[[i]], col = i, pch = 19, cex = 0.5) # i
  } else if(i < 17){
    points(xgroup[[i]], y = ygroup[[i]], col = ((i + 1) %% 9), pch = 6, cex = 0.5)
  } else {
    points(xgroup[[i]], y = ygroup[[i]], col = ((i + 2) %% 9), pch = 3, cex = 0.5) #
  }
}

abline(v = 0); abline(h = 0)
axis(side = 1, tck = 0.01, at = seq(xmin, xmax, by = 0.5))
axis(side = 2, tck = 0.01, at = seq(ymin, ymax, by = 0.5))
n <- 1 + ngroup
colordata <- c(2:n)
legenddata <- c(gav)
pchdata <- c(rep(19, 8), rep(6, 8), rep(3, 3))
# legend("topright", legend = legenddata, pch = pchdata, col = colordata, cex = 0.3)

# [7] Loading plot
FD <- cor(mergedata1[, -c(1)], score[, c(xselect + 1, yselect + 1)])

```

```

plot(FD, type = "n", xlim = c(-1, 1), ylim = c(-1, 1), main = "Loading plot")
text(FD[, 1], FD[, 2], labels = rownames(FD), cex = 0.7)
abline(v = 0); abline(h = 0)

# [8] output
FDdata <- data.frame(FD = numeric(0))
ofilename1 <- paste0("DataFD", mtype, ".csv")
colnames(FDdata) <- paste0(mtype, colnames(FDdata))
write.csv(FDdata, file = ofilename1)

ofilename2 <- paste0("Data", mtype, ".csv")
finaldata <- data.frame(group = mergedata1[, 1], score[, c(2, 3)], score[, -1])
write.csv(finaldata, file = ofilename2)

```

【コマンドプロンプト B】

```

graphics.off()
if(!require(pls)){
  install.packages("pls")
  library(pls)
}
#-----
if(!require(pls)){
  install.packages("pls")
  library(pls)
}

alldata <- read.csv("keihi_PLS", as.is = FALSE, strip.white = TRUE,
                  header = TRUE, fileEncoding="shift-JIS")

names(alldata)
label <- alldata[, 1]
#-----
alldata <- alldata[, -c(1,2)]

tall <- t(alldata)
tomall <- na.omit(tall)
alldata <- t(tomall)

```

```

dim(alldata)
alldata <- alldata[, apply(alldata, 2, sd) != 0]

#-----
ymatrix<- alldata[,9:13]
yname <- "Cinnamaldehyde"
#Cinnamicacid
#Cinnamaldehyde
#X2Methoxycinnamaldehyde
#X2Hydroxycinnamaldehyde
#Coumarin

ycol <- which(colnames(ymatrix) == yname)
Yorg <- scale(ymatrix[,ycol])
Xorg <- scale(alldata[, -c(9:13)])

dataUsed <- data.frame(Yorg,Xorg)
names(dataUsed)[1] <- yname
#===== Set Y =====
yset <- 1
#=====
#-----
xname <- colnames(dataUsed[, -c(1)])
nf <- ncol(dataUsed)-1

#-----
result1.pls <-
plsrf(as.formula(paste0(yname, "~", paste0(xname, collapse="+"))), data=dataUsed, scale=
TRUE, validation="LOO")
names(result1.pls)
plspress <- result1.pls$validation$PRESS
ncomponent <- which.min(plspress)
#---[sum((dataUsed$Y-Ypred1)^2) == plspress]-----
Ypred1 <- result1.pls$validation$pred[, , ncomponent]
#--- Q2
tss <- sum((dataUsed[, 1]-mean(dataUsed[, 1]))^2)
Q2 <- 1 - plspress/tss
bestc <- which.max(Q2)
par(mfrow=c(2,2))

```

```

#[Figure 1, not embedded]
Q2max <- substring(max(Q2), 1, 5)
namesarg <- c(1:length(Q2))
barplot(Q2, names.arg=namesarg, xlab="# of comp.", ylab="Q2",
        main=paste0("Q2max =", Q2max, "(best comp.=", bestc, ")" ))

#[Figure 2, not embedded]
Q2C <- substring(cor(dataUsed[,1],Ypred1),1,5)
plot(dataUsed[,1], Ypred1, main=paste0("Q2=", Q2max,"(r=",Q2C,")"),
      xlab=c("Yoriginal"), ylab=c("Ypred."))

#[Figure 3]
Ypred2 <- predict(result1.pls, newdata=dataUsed, ncomp = bestc)
rss <- sum((dataUsed[,1]-Ypred2)^2)
R2 <- 1-rss/tss
R2
r2 <- cor(dataUsed[,1], Ypred2)
plot(dataUsed[,1], Ypred2, xlab="Yoriginal", ylab="Ypred",
      main=paste0( "R2=", substring(R2,1,5), "(r=",substring(r2,1,5),)" ) )
abline(a=0, b=1, col="red")

#[Figure 4]
par(cex=0.5)
barplot(coefficients(result1.pls, ncomp=bestc)[,1,1], horiz=TRUE, las=1, main=yname)
abline(v=0, lty=1)

```

参考文献

1. 袴塚 高志. 医薬品としての生薬の品質確保 ファルマシア 57(2):99–103 (2021)
2. 山本 豊, 磯崎 隆史, 北牧 侑樹, 倉田 清, 平 雅代, 武田 修己, 山口 能宏, 佐々木 博. 日本における原料生薬の使用量に関する調査報告 (3) 生薬学雑誌 77(1): 24–41(2023)
3. Wan, L., Pan, L., Song, L., Fu, J., Huang, Q., Ji, X., Wei, S., and Zhang, Z. Transcriptional analysis reveals formation of axillary solitary hook in vine plant *Uncaria rhynchophylla*. Plant Biotechnol. Rep. 17:701–713 (2023)
4. 厚生省薬務局. 薬用植物 栽培と品質評価 Part3 薬事日報社 p13–22 (1994)
5. 榊原 巖, 高橋 宏之, 寺林 進, 久保 正良, 樋口 正視, 岡田 稔, 程 必強, 郝 小江, 舒 光明, 黄 衡. 釣藤鈎基原植物のカギカズラ属 9 種 (アカネ科) の形態と成分による鑑別 植物研究雑誌 74:42–52 (1999)
6. Pan, H., Yao, C., Yao, S., Yang, W., Wu, W., and Guo, D. A metabolomics strategy for authentication of plant medicines with multiple botanical origins, a case study of *Uncariae Rammulus Cum Uncis*. J. Sep. Sci. 43:1043–1050 (2020)
7. Zhang, J., Huang, X., Ma, Y., Chen, J., and Geng, C. UFLC-PDA-MS/MS profiling of seven *Uncaria* species integrated with melatonin/5-hydroxytryptamine receptors agonistic assay. Nat. prod. bioprospect. 10:23–36 (2020)
8. Aimi, N., Shito, T., Fukushima, K., Itai, Y., Aoyama, C., Kunisawa, K., Sakai, S., Haginiwa, J., and Yamasaki, K. Studies on plants containing indole alkaloids. VIII Indole alkaloid glycosides and other constituents of the leaves of *Uncaria rhynchophylla* MIQ. Chem. Pharm. Bull. 30(11):4046–4051 (1982)
9. Ma, B., Wu, C., Yang, J., Wang, R., Kano, Y., and Yuan, D. Three new alkaloids from the leaves of *Uncaria rhynchophylla*. Helv. Chim. Acta 92:1575–1585 (2009)
10. Li, R., Cheng, J., Jiao, M., Li, L., Guo, C., Chen, S., and Liu, A. New phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols and flavonols from the leaves of *Uncaria rhynchophylla*. Fitoterapia

- 116:17–23 (2017)
11. Koseki, Y., Nishimura, H., Asano, R., Aoki, K., Li, S., Sugiyama, R., and Yamazaki, M. Isolation of new indole alkaloid triglucoside from the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla*. *J. Nat. Med.* 79:28–35 (2025)
 12. van der Heijden, R., Jacobs, D., Snoeijer, W., Hallard, D., and Verpoorte, R. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* 11(5):607–628 (2004)
 13. Hong, B., Grzech, D., Caputi, L., Sonawane, P., Rodríguez López, C. E., Kamileen, M. O., Hernández Lozada, N. J., Grabe, V., and O'Connor, S. E. Biosynthesis of strychnine. *Nature* 607:617–622 (2022)
 14. Huang, W., Zhang, Z., Niu, L., Hu, X., Teka, T., Han, L., Pan, G., and Wang, Q. Rapid discovery of potentially vasodilative compounds from *Uncaria* by UHPLC/Q-Orbitrap-MS based metabolomics and correlation analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 206:114384 (2021)
 15. Li, H., Wang, L., Zhang, L., Liu, J., Zhang, H., Wang, D., and Yang, W. Study on material basis and anti-hypertensive metabolomics of different extraction methods of the *Uncaria rhynchophylla Scrophularia Formula*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 233:115464 (2023)
 16. Zhou, J., Mo, Z., and Zhou, S. Rhynchophylline down-regulates NR2B expression in cortex and hippocampal CA1 area of amphetamine-induced conditioned place preference rat. *Arch. Pharm. Res.* 33(4):557–565 (2010)
 17. 岡 淳一郎, 松本 欣三, 濱田 幸恵. 鈞藤散の脳機能障害改善作用 日薬理誌 147:157–160 (2016)
 18. Qu, J., Gong, T., Ma, B., Zhang, L., Kano, Y., and Yuan, D. Comparative study of fourteen alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* hooks and leaves using HPLC-diode array detection-atmospheric pressure chemical ionization/MS method. *Chem. Pharm. Bull.* 60(1):23–30 (2012)
 19. Wang, X., Li, X., Qiang, W., Yu, X., Zheng, H., and Zhang, M. Comparative transcriptome analysis revealed the molecular mechanism of the effect of light intensity on the accumulation

- of rhynchophylline and isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 28(2):315–331 (2022)
20. Shao, Y., Zhou, Y., Yang, L., Mu, D., Wilson, I. W., Zhang, Y., Zhu, L., Liu, X., Luo, L., He, J., Qiu, D., and Tang, Q. Genome-wide identification of GATA transcription factor family and the effect of different light quality on the accumulation of terpenoid indole alkaloids in *Uncaria rhynchophylla*. *Plant Mol. Biol.* 114:15 (2024)
21. Li, X., Wang, X., Qiang, W., Zheng, H., Shangguan, L., and Zhang, M. Transcriptome revealing the dual regulatory mechanism of ethylene on the rhynchophylline and isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla*. *J. Plant Res.* 135:485–500 (2022)
22. Liu, Q., Cui, H., Yang, W., Wang, F., Liao, H., Zhu, Q., Qin, S., and Lu, P. Soil conditioner improves soil properties, regulates microbial communities, and increases yield and quality of *Uncaria rhynchophylla*. *Sci. Rep.* 14:13398 (2024)
23. Xue, Y., Shi, H., Murad, F., and Bian, K. Vasodilatory effects of cinnamaldehyde and its mechanism of action in the rat aorta. *Vasc. Health Risk Manag.* 7:273–280 (2011)
24. Han, R., Li, X., Gao, X., and Lv, G. Cinnamaldehyde: Pharmacokinetics, anticancer properties and therapeutic potential (Review). *Mol. Med. Rep.* 30:163 (2024)
25. Yokomi, N., and Ito, M. Influence of composition upon the variety of tastes in Cinnamomi Cortex. *J. Nat. Med.* 63:261–266 (2009)
26. Kondou, T., Kawamura, T., Noro, Y., Tanaka, T., and Inoue, K. Physical and chemical features of Vietnamese and Chinese cinnamon barks on the market. *Nat. Med.* 53(4):178–182 (1999)
27. Tanaka, K., Li, F., Tezuka, Y., Watanabe, S., Kawahara, N., and Kida, H. Evaluation of the quality of Chinese and Vietnamese cassia using LC-MS and multivariate analysis. *Nat. Prod. Commun.* 8(1):75–78 (2013)
28. Yang, J., Chen, L., Zhang, Q., Lai, M., and Wang, Q. Quality assessment of Cortex cinnamomi by HPLC chemical fingerprint, principal component analysis and cluster analysis. *J. Sep. Sci.* 30:1276–1283 (2007)

29. Li, Y., Kong, D., and Wu, H. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind. Crop. Prod.* 41:269–278 (2013)
30. Wang, Z., Zhang, M., Qiu, D., Li, J., Li, L., Wan, M., Fan, Z., Lyu, P., Deng, W., and Li, H. Difference analysis of volatile components in cinnamon from different producing areas. *Mod. Food Sci. Technol.* 38(4):201–207 (2022)
31. Geng, S., Cui, Z., Huang, X., Chen, Y., Xu, D., and Xiong, P. Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. *Ind. Crop. Prod.* 33:248–252 (2011)
32. Fajar, A., Ammar, G. A., Hamzah, M., Manurung, R., and Abduh, M. Y. Effect of tree age on the yield, productivity, and chemical composition of essential oil from *Cinnamomum burmannii*. *CRBB* 1:17–22 (2019)
33. Zhou, W., Liang, Z., Li, P., Zhao, Z., and Chen, J. Tissue-specific chemical profiling and quantitative analysis of bioactive components of *Cinnamomum cassia* by combining laser-microdissection with UPLC-Q/TOF-MS. *Chem. Cent. J.* 12:71 (2018)
34. Kawazoe, S., Yamaguchi, C., Mizukami, H., and Ohashi, H. Seasonal changes of oxindole alkaloid contents in the stem segments of *Uncaria rhynchophylla*. *Sci. Rep. Kyoto Pref. Univ. (Nat. sci. and liv. Sci.)* 44:19–22 (1993)
35. Zhang, J., Geng, C., Huang, X., Chen, X., Ma, Y., Zhang, X., and Chen, J. Chemical and biological comparison of different sections of *Uncaria rhynchophylla* (Gou-Teng). *Eur. J. Mass Spectrom.* 23(1):11–21 (2017)
36. Zhang, Z., Li, Y., Wu, G., Li, Y., Zhang, D., and Wang, R. A comprehensive review of phytochemistry, pharmacology and clinical applications of *Uncariae Ramulus Cum Uncis*. *Arab. J. Chem.* 16:104638 (2023)
37. Shi, W., Kitaoka, F., Doui, M., Miyake, K., Sasaki, Y., Kakiuchi, N., and Mikage, M. Quality evaluation of *Chotoko* - local and specific variations in the alkaloid contents of *Uncaria* plants. *J. Trad. Med.* 29:63–73 (2012)

38. 御影 雅幸, 遠藤 寛子, 香月 茂樹, 垣内 信子. 漢薬「釣藤鈎」の薬用部位に関する史的考察 (第2報) -薬用部位によるアルカロイド含量の相違- 日東医誌 59(2):279-285 (2008)
39. 山中 悦二, 君塚 ゆみ子, 相見 則郎, 坂井 進一郎, 萩庭 丈寿. Indole 系アルカロイド含有植物の探索 (第9報) 日本産カギカズラ (*Uncaria rhynchophylla* MIQ.) の各部位におけるアルカロイド分析 薬学雑誌 103(10):1028-1033 (1983)
40. 谷口 亨, 河村 文郎. 薬用系木本植物カギカズラの根の液体培養 関東森林研究 67(1):53-56 (2016)
41. Guo, Q., Ma, X., Wei, S., Qiu, D., Wilson, I. W., Wu, P., Tang, Q., Liu, L., Dong, S., and Zu, W. *De novo* transcriptome sequencing and digital gene expression analysis predict biosynthetic pathway of rhynchophylline and isorhynchophylline from *Uncaria rhynchophylla*, a non-model plant with potent anti-Alzheimer's properties. BMC Genomics 15:676 (2014)
42. Yang, M., Yao, B., and Lin, R. Profiles of metabolic genes in *Uncaria rhynchophylla* and characterization of the critical enzyme involved in the biosynthesis of bioactive compounds-(iso)rhynchophylline. Biomolecules 12:1790 (2022)
43. Hu, T., Duan, L., Shanguan, L., Zhao, Q., Hang, Y., Wang, X., Li, X., Yang, N., Yan, F., Lv, Q., Tang, L., Liu, M., Qiang, W., Wang, X., Wang, X. W., and Zhang, M. Haploid-phased chromosomal telomere-to-telomere genome assembly of medicinal plant *Uncaria rhynchophylla* dissects genetic controls on the biosynthesis of bioactive alkaloids. Plant Cell Environ. <https://doi.org/10.1111/pce.15257> (2024)
44. Ishii, K., Takata, N., and Taniguchi, T. In vitro propagation of *Uncaria rhynchophylla* - a medicinal woody plant. Proc. IUFRO Conf. Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management (IUFRO Working Party 2.09.02, Brno, Czech Republic):153-154 (2012)
45. Ishii, K., Takata, N., and Taniguchi, T. Micropropagation of *Uncaria rhynchophylla* - a

- medicinal woody plant. Proc. Int. Plant Propagators Soc. 353–356 (2013)
46. 谷口 亨, 石井 克明. 薬用系木本植物カギカズラの組織培養 関東森林研究 66(1):99–100 (2015)
 47. 山本 有菜, 原 規公, 伊藤 哲男, 谷口 亨, 今井 貴規. 日本産カギカズラ (*Uncaria rhynchophylla*) クローンにおける薬効成分アルカロイドおよびその他有用成分の組織部位による含有量の違い 木材学会誌 69(1):14–22 (2023)
 48. 佐藤文彦. オウレン: 生合成研究から創薬へ ファルマシア 57(8):721–725 (2021)
 49. Guedes, J. G., Ribeiro, R., Carqueijeiro, I., Guimarães, A. L., Bispo, C., Archer, J., Azevedo, H., Fonseca, N. A., and Sottomayor, M. The leaf idioblastome of the medicinal plant *Catharanthus roseus* is associated with stress resistance and alkaloid metabolism. J. Exp. Bot. 75(1):274–299 (2024)
 50. Uzaki, M., Yamamoto, K., Murakami, A., Fuji, Y., Ohnishi, M., Ishizaki, K., Fukaki, H., Yokota-Hirai, M., and Mimura, T. Differential regulation of fluorescent alkaloid metabolism between idioblast and laticifer cells during leaf development in *Catharanthus roseus* seedlings. J. Plant Res. 135:473–483 (2022)
 51. Uzaki, M., Mori, T., Sato, M., Wakazaki, M., Takeda-Kamiya, N., Yamamoto, K., Murakami, A., Serna Guerrero, D. A., Shichijo, C., Ohnishi, M., Ishizaki, K., Fukai, H., O'Connor S. E., Toyooka, K., Mimura T., and Yokota-Hirai, M. Integration of cell differentiation and initiation of monoterpenoid indole alkaloid metabolism in seed germination of *Catharanthus roseus*. New Phytol. 242:1156–1171 (2024)
 52. 御影 雅幸, 遠藤 寛子. 漢薬「釣藤鈎」の薬用部位に関する史的考察 日東医誌 59(1):25–34 (2008)
 53. Kim, J. Extraction time and temperature affect the extraction efficiencies of coumarin and phenylpropanoids from *Cinnamomum cassia* bark using a microwave-assisted extraction method. J. Chromatogr. B 1063(15):196–203 (2017)
 54. Wakayama, R., Takasugi, S., Honda, K., and Kanaya, S. Application of a two-dimensional

- mapping-based visualization technique: Nutrient-value-based food grouping. *Nutrients* 15:5006 (2023)
55. Gao, H., Xu, D., Zhang, H., Qian, J., and Yang, Q. Transcriptomics and metabolomics analyses reveal the differential accumulation of phenylpropanoids between *Cinnamomum cassia* Presl and *Cinnamomum cassia* Presl var. *macrophyllum* Chu. *Ind. Crops Prod.* 148:112282 (2020)
56. Gao, H., Shi, M., Zhang, H., Shang, H., and Yang, Q. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses revealed metabolite variations and regulatory networks in *Cinnamomum cassia* Presl from four growth years. *Front. Plant Sci.* 14:1325961 (2024)
57. Yao, S., Tan, X., Huang, D., Li, L., Chen, J., Ming, R., Huang, R., and Yao, C. Integrated transcriptomics and metabolomics analysis provides insights into aromatic volatiles formation in *Cinnamomum cassia* bark at different harvesting times. *BMC Plant Biol.* 24:84 (2024)

論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

Sugahara, T., Sugiyama, R., Sudo, H., Koseki, Y., Aoki, K., and Yamazaki, M. A sterile plant culture system of *Uncaria rhynchophylla* as a biosynthetic model of monoterpenoid indole alkaloids. *Plant Biotechnology*. in press (2025)

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	薬学博士	石川勇人
副査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	薬学博士	畠山浩人
副査	千葉大学大学院教授（薬学研究院）	薬学博士	西田紀貴