

CONVOLVULACEAE		
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	サツマイモ (シモン)	649-02
CYPERACEAE		
<i>Cyperus articulatus</i> Schlecht.	ビリビリ	702-02
<i>Cyperus ligularis</i> Larm.	ビリビリ	703-02
DIOSCOREACEAE		
<i>Dioscorea composita</i> Hemsl.		774-02
<i>Dioscorea floribunda</i> Mart. et Gal.		777-02
<i>Dioscorea izuensis</i> Akahori	イズドコロ	519-02
<i>Dioscorea spiculiflora</i> Hemsl.		770-02
EPHEDRACEAE		
<i>Ephedra distachya</i> Vill.		736-02
<i>Ephedra geradiana</i> Wall.		737-02
<i>Ephedra sinica</i> Stapf		735-02
ERYTHROXYLACEAE		
<i>Erythroxylum coca</i> Lam.	コカノキ	766-02
<i>Erythroxylum coca</i> Lam.	コカノキ	767-02
<i>Erythroxylum coca</i> Lam.	コカノキ	768-02
<i>Erythroxylum delagoense</i> Schinz.		601-02
<i>Erythroxylum lucidum</i> Moon		773-02
<i>Erythroxylum novogranatense</i> Hieron.	ナガバコカノキ	763-02
<i>Erythroxylum novogranatense</i> Hieron.	ナガバコカノキ	764-02
<i>Erythroxylum novogranatense</i> Hieron.	ナガバコカノキ	765-02
EUPHORBIACEAE		
<i>Mallotus paniculatus</i> (Lam.) Muell. Arg.	ウラジロアカメガシワ	562-02
FAGACEAE		
<i>Quercus suber</i> L.	コルクガシ	609-02
FLACOURTIACEAE		
<i>Hydnocarpus anthelmintica</i> Pierre ex Laness.	ダイフウシ	668-02
<i>Hydnocarpus wightiana</i> Blume	ガマハダダイフウシ	575-02
GERANIACEAE		
<i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	ゲンノショウコ	597-02
GRAMINEAE		
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	レモングラス	757-02
<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle	シトロネラグラス	660-02
<i>Saccharum officinarum</i> L. 'Variegata'	サトウキビ (斑入り)	612-02
GUTTIFERAE		
<i>Hypericum perforatum</i> L.	セイヨウオトギリソウ	659-02
HAMAMELIDACEAE		
<i>Rhodoleia championii</i> Hook.	シャクナゲモドキ	775-02
LABIATAE		
<i>Origanum majorana</i> L.	マヨラナ	739-02
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	マンネンロウ (ローズマリー)	758-02
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	マンネンロウ (ローズマリー)	759-02
<i>Satureja montana</i> L.		778-02
<i>Thymus quinquecostatus</i> Celak.	イブキジャコウソウ	523-02
LARDIZABALACEAE		
<i>Stauntonia hexaphylla</i> (Thunb.) Decaisne	ムベ	747-02
LAURACEAE		
<i>Cinnamomum burmanni</i> Blume	ジャワニッケイ	631-02
<i>Cinnamomum burmanni</i> Blume	ジャワニッケイ	632-02
<i>Cinnamomum carolinense</i> Koidz.	カロリックスノキ	629-02
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	シナニッケイ	620-02
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	シナニッケイ	621-02
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	シナニッケイ	622-02
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	シナニッケイ	624-02
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	シナニッケイ	625-02
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	シナニッケイ	626-02
<i>Cinnamomum glanduliferum</i> Meissn.		641-02
<i>Cinnamomum iners</i> Reinw.	イヌニッケイ	521-02
<i>Cinnamomum iners</i> Reinw.	イヌニッケイ	522-02
<i>Cinnamomum insularimontanum</i> Hay	タイワンニッケイ	669-02
<i>Cinnamomum japonicum</i> Sieb. ex Nakai	ヤブニッケイ	644-02
<i>Cinnamomum randaiense</i> Hayata		700-02

<i>Cinnamomum sieboldii</i> Meisn.	ニッケイ	640-02
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	セイロンニッケイ	633-02
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	セイロンニッケイ	634-02
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	セイロンニッケイ	635-02
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	セイロンニッケイ	636-02
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	セイロンニッケイ	637-02
LEGUMINOSAE		
<i>Abrus precatorius</i> L.	トウアズキ	680-02
<i>Astragalus sikokianus</i> Nakai	ナルトオウギ	689-02
<i>Calliandra haematocephala</i> Hassk.	アカバナブラッシマメ	786-02
<i>Cassia alata</i> L.	ハネセンナ	697-02
<i>Cassia obtusifolia</i> L.	エビスグサ (伊豆系)	781-02
<i>Cassia obtusifolia</i> L.	エビスグサ (吉佐美系)	782-02
<i>Cassia tora</i> L.	エビスグサモドキ	784-02
<i>Clitoria ternatea</i> L.	チョウマメ	676-02
<i>Codariocalyx motorius</i> (Houtt.) Ohashi	マイハギ	734-02
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	スペインカンゾウ	578-02
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	スペインカンゾウ	579-02
<i>Periandra mediterranea</i> Taub.	ブラジルカンゾウ	708-02
<i>Sophora flavescens</i> Solander ex Aiton var. <i>angustifolia</i> (Sieb. et Zucc.) Kitagawa	クララ	587-02
LILIACEAE		
<i>Allium thunbergii</i> G. Don	ヤマラッキョウ	752-02
<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr. var. <i>pygmaeus</i> (Makino) Ohwi	タチテンモンドウ	671-02
<i>Convallaria keiskei</i> Miq.	スズラン	652-02
<i>Eucharis grandiflora</i> Planch.	アマゾンリリー	787-02
<i>Fritillaria verticillata</i> Willd. var. <i>thunbergii</i> Baker	アミガサユリ	518-02
<i>Tricyrtis affinis</i> Makino	ヤマジノホトトギス	751-02
LOGANIACEAE		
<i>Strychnos nux-vomica</i> L.	マチン	738-02
MAGNOLIACEAE		
<i>Magnolia pumila</i> Andr.	トキワレンゲ	683-02
MALPIGHIACEAE		
<i>Malpighia glabra</i> L.	アセロラ	513-02
MALVACEAE		
<i>Hibiscus pedunculatus</i> L. f.		693-02
MARANTACEAE		
<i>Maranta arundinacea</i> L.	クズウコン	584-02
<i>Thaumatococcus daniellii</i> Benth.	シビレクズウコン	645-02
MELIACEAE		
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	インドセンダン	526-02
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	インドセンダン	527-02
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	インドセンダン	528-02
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	インドセンダン	529-02
MENISPERMACEAE		
<i>Arcangelisia flava</i> Merr.		761-02
<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> Diels	セレンディビティベリー	663-02
<i>Sinomenium acutum</i> (Thunb.) Rehd. et Wils.	オオツツラフジ	565-02
<i>Stephania merrillii</i> Diels	コウトウツツラフジ	599-02
<i>Tinospora tuberculata</i> Beumee ex K. Heyne		524-02
MORACEAE		
<i>Humulus lupulus</i> L.	ホップ	727-02
MYRISTICACEAE		
<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	ニクズク	691-02
MYRTACEAE		
<i>Myrciaria cauliflora</i> Berg.	ジャボチカバ	646-02
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine var. <i>lucidum</i> Hort.	キミノバンジロウ	658-02
<i>Psidium guajava</i> L.	バンジロウ (グワバ)	699-02
<i>Rhodomyrtus tomentosa</i> Wight	テンニンカ	679-02
<i>Syzygium aqueum</i> Alston	ミズフトモモ	745-02
OLEACEAE		
<i>Olea europaea</i> L.	オリーブノキ	571-02

ORCHIDACEAE		
Bletilla striata (Thunb.) Reichb. fil. (White flower)	シラン (白花)	648-02
Dendrobium moniliforme (L.) Sw.	セッコク	661-02
Nervilia aragoana Gaudich.	アオイボクロ	512-02
Phaius tancarvilleae (Banks) Blume	カクチョウラン	780-02
PAEONIACEAE		
Paeonia obovata Maxim.	ベニバナヤマシャクヤク	714-02
PALMAE		
Serenoa repens (Bartr.) J. K. Small	ノコギリヤシ	692-02
PIPERACEAE		
Piper nigrum L.	コショウ	603-02
Piper officinarum C. DC.		604-02
PLUMBAGINACEAE		
Limonium wrightii (Hance) O. Kuntze var. luteum (Hara) Hara	ウコンイソマツ	560-02
POLYGONACEAE		
Rheum emodi Wall.		667-02
Rheum palmatum L. ssp. tangutchicum (Maxim.)		666-02
Rheum rhaponticum L.	マルバダイオウ	740-02
RANUNCULACEAE		
Adonis ramosa Franch.	フクジュソウ	709-02
Coptis japonica (Thunb.) Makino var. dissecta (Yatabe) Nakai	セリバオウレン	662-02
Coptis japonica (Thunb.) Makino var. major (Miq.) Satake	コセリバオウレン	605-02
RHAMNACEAE		
Zizyphus mauritiana Lam.	インドナツメ	613-02
ROSACEAE		
Rosa chinensis Jacq.	コウシンバラ	598-02
Rosa damascena Mill.	ダマスクバラ	673-02
Rosa rugosa Thunb.	ハマナス	698-02
RUBIACEAE		
Coffea bengalensis Heyne ex Willd.	ベンガルコーヒー	713-02
Gardenia jasminoides Ellis forma grandiflora (Lour.) Makino	クチナシ	585-02
Gardenia jasminoides Ellis forma grandiflora (Lour.) Makino	クチナシ	779-02
Uncaria rhynchophylla (Miq.) Miq.	カギガズラ	574-02
RUTACEAE		
Citrus junos Sieb. ex Tanaka	ユズ	753-02
Evodia rutaecarpa Benth.	ゴシュユ	602-02
SAPOTACEAE		
Synsepalum dulcificum Daniell	ミラクルフルーツ	746-02
SAXIFRAGACEAE		
Hydrangea macrophylla (Thunb.) Ser. var. thunbergii (Siebold) Makino	アマチャ	517-02
SOLANACEAE		
Lycium barbarum L.	ナガバクコ	687-02
Lycium barbarum L.	ナガバクコ (華北クコ)	688-02
Lycium chinense Mill.	クコ	786-02
Scopolia japonica Maxim.	ハシリドコロ	695-02
STERCULIACEAE		
Cola nitida A. Chev.	コラ	607-02
Theobroma cacao L.	カカオ	572-02
Theobroma cacao L.	カカオ	573-02
TACCACEAE		
Tacca pinnatifida Forst.	タシロイモ	670-02
THYMELAEACEAE		
Aquilaria sinensis Gilg	シナジンコウ	619-02
ULMACEAE		
Celtis sinensis Pers. var. japonica (Planch.) Nakai	エノキ	564-02
UMBELLIFERA		

<i>Bupleurum falcatum</i> L.	ミシマサイコ	785-02
VERBENACEAE		
<i>Callicarpa dichotoma</i> (Lour.) K. Koch	コムラサキ	606-02
<i>Tectona grandis</i> L. f.	チーク	772-02
ZINGIBERACEAE		
<i>Alpinia formosana</i> K. Schum.	クマタケラン	586-02
<i>Alpinia officinarum</i> Hance	コウリョウキョウ	755-02
<i>Alpinia sanderae</i> Hort. Sand.	ファイリゲットウ	705-02
<i>Alpinia speciosa</i> (Wendl.) K. Schum.	ゲットウ	595-02
<i>Amomum subulatum</i> Roxb.		771-02
<i>Curcuma aromatica</i> Salisb.	ハルウコン1 (キョウオウ)	541-02
<i>Curcuma aromatica</i> Salisb.	ハルウコン2 (キョウオウ)	542-02
<i>Curcuma long</i> L.	ウコン (種子島系)	534-02
<i>Curcuma long</i> L.	ウコン (武田系)	535-02
<i>Curcuma long</i> L.	ウコン (インド系)	538-02
<i>Curcuma long</i> L.	ウコン (ジャワ系1)	536-02
<i>Curcuma long</i> L.	ウコン (ジャワ系2)	537-02
<i>Curcuma long</i> L.	ウコン (スマトラ系)	539-02
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	クスリウコン1	543-02
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	クスリウコン2	544-02
<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc.	ガジュツ (種子島系)	530-02
<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc.	ガジュツ (ライオン系)	531-02
<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc.	ガジュツ (新宿御苑系)	532-02
<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc.	ガジュツ (ジャワ系)	533-02
<i>Elettaria cardamomum</i> Maton	ショウズク (カルダモン)	577-02
<i>Hedychium coronarium</i> Koen. var. <i>chrysoleucum</i> Baker	ハナシュクシャ	696-02
<i>Hedychium gardnerianum</i> Wall.	キバナシュクシャ	582-02

註) 右端の数字は筑波薬用植物栽培試験場の導入番号

栽培薬用植物の品質評価に関する研究-牛膝-

分担研究者 渋野裕之 国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場

ヒナタイノコズチはその根を生薬名牛膝と呼び、利尿や通経などに用いられる。その品質評価を行うに当たって、その特徴的成分であるエクジステロイド類、イノコステロンを定量することを目的とし、精製単離することを検討した。また、ベトナム産の牛膝について成分検討を行い、生薬牛膝として利用可能かどうかを検討した。

A.研究目的

薬用植物は古くから我が国において親しまれ日常的に用いられてきた。現在においても、多くの薬用植物が日常生活に浸透しており、その存在は我々の健康の増進や維持には不可欠の要素であるといえる。これら薬用植物は生薬として漢方処方に用いられったり、民間薬的に用いられったりするが、その品質は原料が植物であるため、産地や栽培条件、収穫方法、調整方法などにより非常にばらつきがあるのが現状である。そのため日本薬局方では生薬の品質規格を定め、それにより重要な生薬や薬用植物の品質の向上を目指している。生薬はその有効成分の含量が薬効に大きく影響してくるため、その含有量を厳格に規定する必要がある。

生薬牛膝は日本薬局方に収載されており、その基原植物はヒユ科の *Achyranthes fauriei* Lev. Et Van. (ヒナタイノコズチ)、および中国産の *A. bidentata* Blume の根と規定されている。日本（奈良、茨城）、中国（四川、河南）で栽培されている。そこで、生薬牛膝の品質評価を行う上で、成分定量を行うことを目的とし、イノコズチの特徴的成分である inokosterone を単離することを検討した。

Achyranthes aspera はベトナムの路傍に見られるヒユ科植物で、ベトナムではその全草、特に根をリュウマチ、腰部神経痛、排尿困難、子宮留血症、打撲等に用いている。日本においては *Achyranthes* 属植物は牛膝として加味八仙湯、牛膝散、牛車腎気丸などに配合され、その成分は近年多く報告されているが、本植物においては報告が少ない。ヒユ科 *Achyranthes* 属植物からは多数の昆虫変態ホルモンである

Ecdysteroid 類やオレアナン型サポニンが見いだされている。今回、ベトナム、ハノイで採集した *A. aspera* について成分を検索した。そこでベトナム産薬用植物 *A. aspera* の成分と当栽培試験場にて栽培しているヒナタイノコズチ *A. fauriei* Leveille et Variot およびマルバイノコズチ *A. fauriei* Leveille et Variot forma rotundifolia Ohwi との成分の違いを検討し、生薬牛膝としての利用の可能性を探る。

B.研究方法

筑波薬用植物栽培試験場で栽培を行ったヒナタイノコズチの根を乾燥後粉碎し、メタノールで抽出を行った。その後濾過を行い、濾液を濃縮後得られた残渣をボンドエリュートカラム（C-18）にかけ、溶出部を濃縮後 HPLC にて分離精製を行った。移動層はアセトニトリル-水混合溶媒、カラムには Inertsil ODS-3 を用いた。グラジエント溶出を行い、フォトダイオードアレイにて検出し、エクジステロイド類に特徴的な吸収を持つ化合物4種類を分取した。

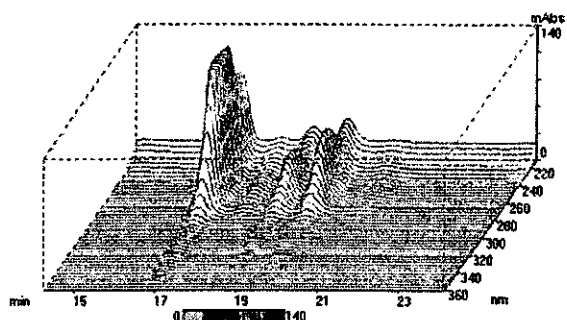
また、ベトナム産 *A. aspera* L. の乾燥した根をメタノールで抽出し、その後各種クロマトグラフィーを行い分離精製し、4種類のトリテルペン、および ecdysone を単離し各種スペクトルデータから構造を決定した。

さらにヒナタイノコズチとマルバイノコズチのメタノールエキスの HPLC 分析を行い、ベトナム産 *A. aspera* との比較を行った。

（倫理面への配慮）本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用しない。

C. 研究結果

ヒナタイノコズチの HPLC チャートでは PDA 分析では 4 つのエクジステロイド類と思われるピークが現れた。その 4 種について単離を行った。



ヒナタイノコズチの PDA チャート

単離された化合物の NMR スペクトルを検討した結果、最初のもっとも大きなピークは ecdysone、次のピークは 20-hydroxyecdysone であった。3 番目と 4 番目についてはそのスペクトルデータはほとんど一致していたが文献によるとヒナタイノコズチ中に含まれる inokosterone には 25 位の R と S が存在することが知られている。その各々のスペクトルデータは文献中にはまだないが、どちらかがまだ決定されていない文献データと 4 番目の化合物の ^{13}C -NMR データが一致した。すなわち 3 番目と 4 番目は inokosterone の 25 位エピマーと決定したが、その配置についてはまだ決定していない。この配置は文献を調査し、今後決定する予定である。本化合物を利用し、今後イノコズチ中の inokosterone の定量を行う予定である。また、ヒナタイノコズチとマルバイノコズチの PDA チャートを比較した結果、ほぼ同一のチャートであった。よって両者の成分上での違いはほとんど見られないことがわかった。

ベトナム産牛膝 *A. aspera* の成分に関しては、6 月と 8 月に採集した根をチャートに示すような方法で最終的に 4 種類のトリテルペンを単離した。これらの化学構造に関しては、各種スペクトルデータの詳細な検討により決定した。化合物 4 および 5 に関しては、トリテルペンサポニンの糖部分に脂肪酸がエーテル結合していると考えられ、NMR の HMBC, HMQC, NOESY スペクトルを検討した結果、上図に示するような部分構造を持つことがわかった。

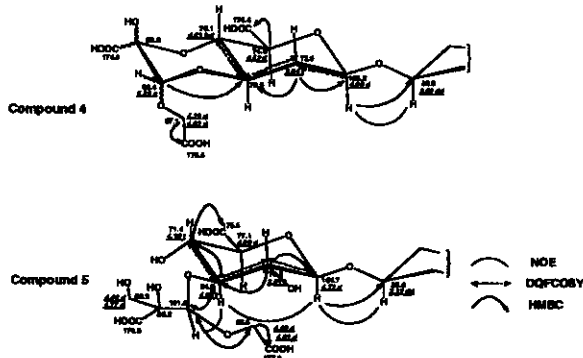
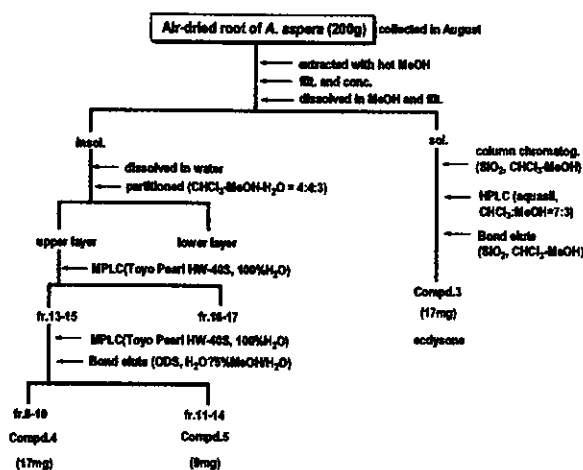
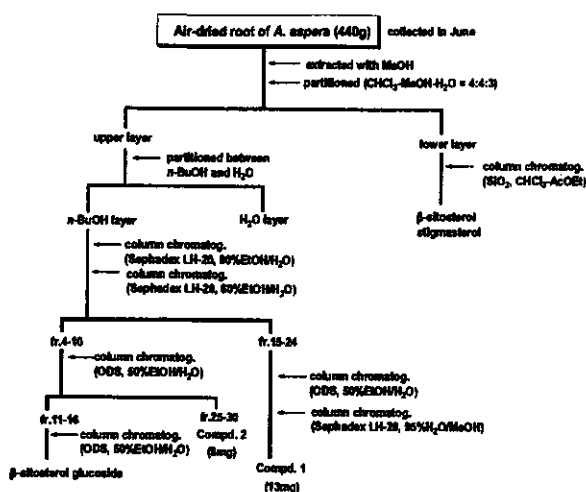
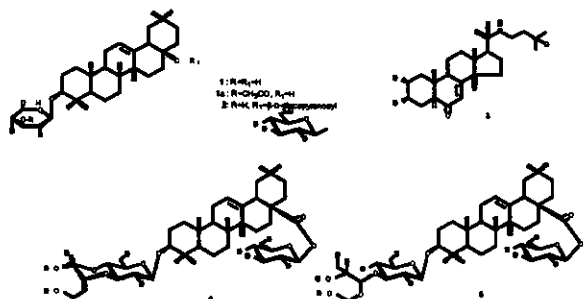


Figure Key DQF-COSY, HMBSC and Observed NOE Correlations for Compound 4 and 5



Saponins and ecdysteroids isolated from *A. aspera*

D. 考察およびE. 結論

今回、ベトナム産 *Achyranthes aspera* の成分検索および、当栽培試験場にて栽培試験を行っている日本産ヒナタイノコズチ *A. fauriei* Leveille et Vaniot およびマルバイノコズチ *A. fauriei* Leveille et Vaniot forma rotundifolia Ohwi との比較を行った結果、

1. *A. aspera* に含有される ecdysteroid 類は ecdysterone であった。
2. ヒナタイノコズチおよびマルバイノコズチに含有される ecdysteroid 類は数種類含有されているが両者の間に大きな違いは見られなかった。ヒナタイノコズチに含有される数種類の ecdysteroid 類は既に報告があるが、最も含量の多いのは ecdysone であった。
3. *A. aspera* は成分的には *A. fauriei* と重複しており、トウゴシツ *A. bidentata* 等と同様、生薬牛膝として利用できる可能性がある。
4. *A. aspera* から単離された化合物 4 および 5 は、メタノール、ピリジン、DMSO 等の有機溶媒に難溶である。その構造は各種 2D-NMR から前図のように決定されたが一部の立体配置は今後決定する予定である。4 および 5 は既に *A. fauriei* より単離報告のある Achyranthoside A および F と考えられるが、これらはメチル化して得られており遊離の状態では得られていない。

今回報告した化合物以外にもさらに数種類オレアナン型サポニンが得られており、それらについては今後検討する予定である。

F. 健康危機情報

特に問題はなし

G. 研究発表

1. 論文発表 特になし
2. 学会発表 特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

種子の収集と温帯植物の栽培保存に関する研究

分担研究者 酒井英二 岐阜薬科大学

菊は、薬用、食用そして観賞用として古くから人々の生活に関わりを持ってきている。第14改正日本薬局方第1追補において生薬キクカが新規収載されており、日本における薬用菊が明確にされている。キク *Chrysanthemum morifolium* Ramatulle とシマカンギク *C. indicum* Linne が基原植物として記載されている。ただし、キクは栽培品種であり、その変異の幅が予想される。そこで、薬用のキクとは何かを文献上で調査する一方で、その近縁植物を薬用遺伝資源と位置づけ収集、保存栽培を行った。その結果、*C. morifolium* は、*C. zawadskii* Tzvelev var. *latilobum* Kitam. および *C. indicum* L. から育種された栽培品種が元になっているとの説があり、逆を言えば比較的広い範囲の栽培キクが資源として使用できることが示唆された。しかし、HPLC による市場品キクカの成分パターンは複数あることから、栽培系統、調整加工により、使用目的にあったものを選択する必要性が示唆された。

また、薬用植物の遺伝資源の保存方法としては、カルス細胞での保存方法、あるいは培養植物体としての保存方法が種々検討されている。しかし従来の種子での保存は、安価で汎用性の広い方法であり、今後も重要な位置にあると考えられる。ただし、薬用資源としての植物種子は、様々な科、属にまたがるため、種子発芽に関しては個々の検討が必要とされている。今回は予備試験として硬い種皮に被われ吸水段階に難がある種子の催芽処理方法についての検討を行った。その結果、低温プラズマ処理がいわゆる硬実種子の催芽処理に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

1. 生薬の基原植物

中華人民共和国薬典2000年版には、菊花として *Chrysanthemum morifolium* Ramat., 野菊花として *C. indicum* L. が収載されている。両種は外観上明らかに異なり、区別可能である。一方、第14改正日本薬局方第1追補には、両種がキクカとして収載（日本薬局方外生薬規格より収載）されている。基原植物とされる *Chrysanthemum morifolium* Ramat. は、交雑種がもとになっている

との説がある。人為的、自然発生的はともかく、栽培植物として認識されている。現実にはキクには観賞用として品種改良されたものも多く、薬用、食用、観賞用についてその範囲を理解しておくことは重要と考えられる。また、キクカは、いわゆる46通知（食薬区分）では、食品としても利用を認められている。日本においては菊花茶はあまりなじみがないが、中国では頻繁に利用されているようであり、今後はハーブティーとしての利用拡大が予想される。その結果、薬用、食用の混乱

が考えられるため、市場品についても現状把握する必要がある。

2. 硬実種子の催芽処理（予試験）

硬い種皮により吸水段階に難のあるいわゆる硬実種子の催芽処理方法としては、物理な力を加えたり、化学薬品などによったりした処理方法が知られている。物理処理としては、砂などとの研磨が一般的であり、薬品処理としてはジベレリンなどの植物ホルモン添加や、濃硫酸などによる種皮の物理的な破壊が知られている。日本を代表する民間薬であり、整腸剤などの医薬品原料としても多用されているゲンノショウコの種子も、吸水段階に難がある。ただし、一般的な硬実種子とは異なり、種皮表面に弾力があり、砂との研磨程度では傷を付けることが出来ない。また、種子が小型なため種皮だけを濃硫酸処理で処理することは不可能である。そこで、新たな技術として、低温プラズマを用いた方法の検討を行った。低真空状態でプラズマ（低温プラズマ）を発生させ物体の表面部分のみに化学変化を与える技術は、医薬品分野のみならず多方面での表面加工技術として応用されている。

B. 研究方法

1. 文献により、薬用、食用とされるキクの種類を調査した。次に流通品としてのキクカを収集し、外観上の違いを検討した。また、HPLC 指紋図譜の考え方の応用として、市場品の 21 ロットの野菊花と 10 ロットの菊花を 80% のメタノールにて抽出し、ODS カラムを用いて、移動層：水／アセトニトリル／リン酸 (350:70:2.4)、検出：330nm での HPLC パターンの比較を行った。また、他大学薬草園などからキクカに関連すると思われる植物を導入し、保存栽培した。

2. 低温プラズマ処理（80ワット5分間照射）をおこなったゲンノショウコ（*Geranium thunbergii* SIEB. et ZUCC.）種子を、湿らせた濾紙をいれたプラスチック容器に並べ人工気象

器内（20℃）で、発芽までの観察を行った。低温プラズマ処理に関しては当大学物理化学教室にご協力頂いた。

C. 研究結果

1. 生薬「菊花」あるいは「野菊花」は、中国、台湾、朝鮮半島、日本などで古くから使われている。薬用に関するキクカの最も古い記載は、『神農本草経』にみられ、「鞠華」として「味苦平、主風、頭眩腫痛、目欲脱、淚出、皮膚死肌、惡風濕痺、久服、利血氣、輕身、耐老延年、一名節華」と記載されている。野菊花については、『神農本草経』では苦い菊として記載され、『本草拾遺』では菊花と区別して「味苦辛 清香」と記されている。現在の主な市場品「菊花」は、「杭菊」「毫菊」「除（さんずい）菊」「貢菊」「祁菊」「不（りっしんべん）菊」「黄菊」「濟菊」などがあり、それぞれについて形状、修治がことなっている。また、野菊花は、「野菊」「甘菊」「長披野菊」「苞叶野菊」などがあり、産地によって区別されている。菊花と野菊花ともにルテオリンが含まれているが、HPLC パターンは大きく異なっていた。また、*C. morifolium* は、*C. zawadskii* Tzvelev var. *latilobum* Kitam. および *C.*

indicum L. から育種された栽培品種が元になっているとの説があり、*C. morifolium* が遺伝的に安定していないと考えられている。このことは基原植物が同じとされる菊花においても、商品名（栽培系統や栽培地が異なる）によって HPLC パターンが異なった結果に通じるものとなった。

2. ゲンノショウコの場合、砂との研磨では吸水改善の効果は認められなかった。濃硫酸処理では、種皮の物理的破壊は出来たが、種子内部も傷害され、いずれも実用には向かなかった。低温プラズマ処理では吸水障害が改善され、短期間での発芽が観察された。

D. 考察

1. 菊花の基原植物については現代と古代では違っていた可能性が高く、唐以前の菊は野生種と考えられる。『別録』にある「菊花は雍州の川沢及び田野に生ずる」は陝西省に野生する

Dendranthema lavanduraefolium var. *sinense* Kitamura セイアンアブラギクであり、弘景の「1種茎が紫で気が香しく味が甘い、葉は羹にして食べる。これが真の菊である」は、中国中部に広く分布する *D. indicum* var. *procumbens*

Kitamura ハイシマカンギクと考えられる。また「1種茎が青くて大きく、蒿艾の気があって味は苦く、食うに堪えない。これは苦いと名くるものだ。真の菊ではない」は、*D. lavanduraefolium* var. *sinense* や *D. lavandulaefolium* Kitamura ホソバアブラギクと考えられている。また、

(*Dendranthema* と *Chrysanthemum* はシノニムの関係で、分類学的には現在 *Dendranthema* を使用することが多い。)

この点から菊花も野菊花も同じ範疇の植物を基原としていと考えられるが、HPLC パターンは大きく異なっている。菊花だけについてみても、交配種であると考えられているため、栽培系統によって成分パターンが異なることが予想される。また、杭菊は蒸した後天日干し、毫菊は陰干し、貢菊は炒って乾燥、祁菊は薫蒸後天日干しと、生薬への調整方法が異なるため、結果として HPLC パターンが異なると考えられる。今回、他機関より導入した植物は挿し木により増殖中であり、これを元に生薬キクカを調整し、調整方法によって HPLC パターンが異なりかを検証する予定である。

2. 低温プラズマ処理は、種子の吸水障害改善に有効な方法であることが確認された。ただし、今回は予試験であり、細かな条件の検討は行っていない。プラズマ処理は表面のみの加工技術であり、例えば、大型の種皮の厚い場合にはプラズマ強度を増すか、処理時間の延長が必要と考えられる。低温プラズマの低温とは発生メカニズム上の表現であり、実際に照射された部分は一時的には高温となる。よって、強度や照射時間がませば、種子への障害も考えられる。今後は、プラズマ照射の諸条件を検討し、応用範囲を広げていく必要がある。

E. 結論

1. キク *C. morifolium* は、栽培系統や加工方法によって成分パターンが異なるため、産地、流通名を確認する必要がある。シマカンギク *C. indicum* は、キクと異なる成分パターンを示す。

2. 低温プラズマ処理は、硬実種子の催芽処理に有効であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

キクカについては日本薬学会 123 年会で発表予定。

G. 知的所有権の取得状況

なし

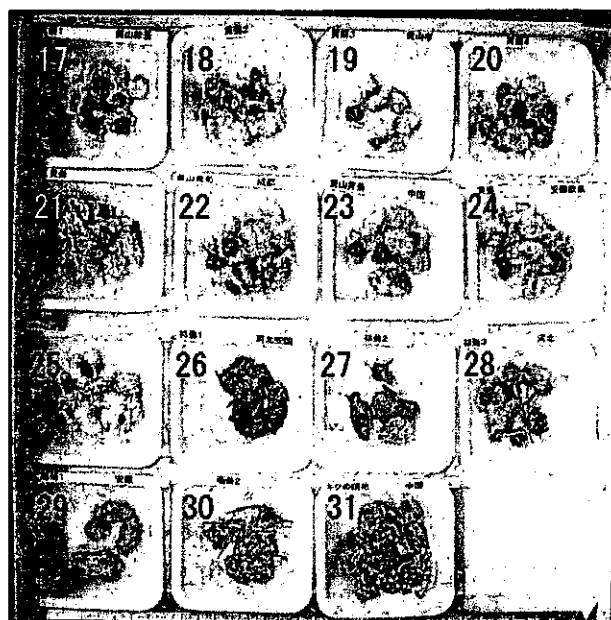
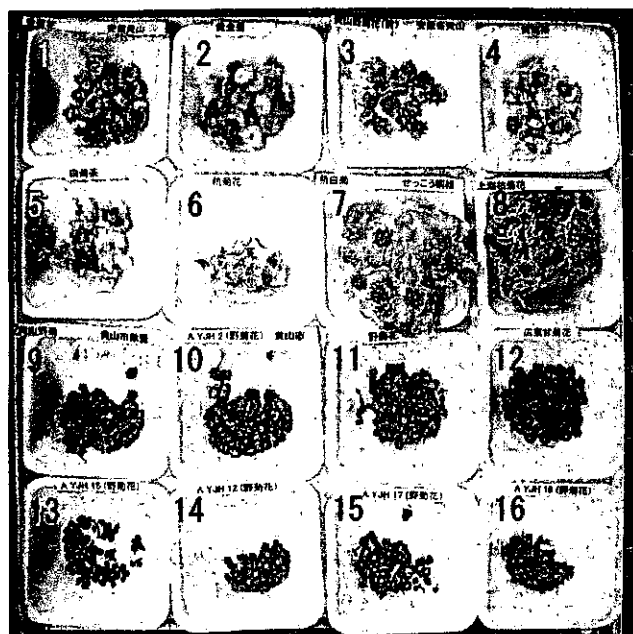
参考資料

平成 14 年度厚生労働科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究者 酒井英二 岐阜薬科大学 薬草園研究室

1. 生薬の基原植物

菊花：*Chrysanthemum morifolium* Ramat. と野菊花：*C. indicum* L. の比較.



1:金菊花,2:黄金菊,3:黄山野菊花,4:黄菊茶,5:白菊茶,6:杭菊花,7:杭白菊,8:上海杭菊花,9: 黄山野菊,10,13-16: AYJH 野菊花,11:野菊花,12:広東甘菊花,13-16:野菊花,17-21,24:貢菊,22,23,25:黄山貢菊,26-28: 祁菊花,29,30: 亳菊花 31:中国産

キクカの市場品（実験材料）

商品	学名	産地	加工法
野菊花	<i>Chrysanthemum indicum</i>	安徽金寨県	微妙後焙る又は天日干し
亳菊花	<i>C. morifolium</i> cv. Boju	安徽	陰干し
祁菊花	<i>C. morifolium</i> cv. Qiju	河北	硫薫後天日干し
貢菊花	<i>C. morifolium</i> cv. Gongju	安徽黄山、歙県	焙干し
杭菊花	<i>C. morifolium</i> cv. Hongju	浙江、上海	蒸し後天日干し

80%メタノールで抽出し、水/アセトニトリル/リン酸（280：70：1.9）を移動相とし、280nm で検出した HPLC パターンを比較した。

HPLC 指紋図譜の考え方をキクカに応用した結果、ピーク面積比により菊花と野菊花を区別することが出来た。また、菊花であっても商品名称により HPLC パターンが異なることを明らかにした。すなわち、菊花の基原植物は同一であるが、栽培品種のために多様な系統の存在が考えられる。また、産地により調製加工方法が異なっているようで、それらのことが、HPLC パターンの差に現れたと考えられる。

各種菊花ピーク面積の割合

peak番号	t _R	毫菊花	祁菊花	野菊花	貴菊花	杭菊花
1	1.01					
2	1.14				5.57	
3	1.41					
4	1.55	6.69		7.24	16.56	6.44
5	1.72					
6	2.02					
7	2.36					
8	2.89				8.27	9.38
9	3.11					8.87
10	3.36					
11	3.79	29.4	28.82	19.28	27.11	13.08
12	4.16			5.67		
13	4.52	5.6				11.31
14	4.76	5.71		9.48	25.24	15.79
15	5.76					
16	8.45					6.78
17	9.68		5.5			
18	11.51		5.82			
19	14.88			22.16		
20	16.16			5.97		
21	18.8					
22	21.23	7.3				

H₂O-CH₃CN-H₃PO₄(280:70:1.9) 1.5ml/min 検出30nm

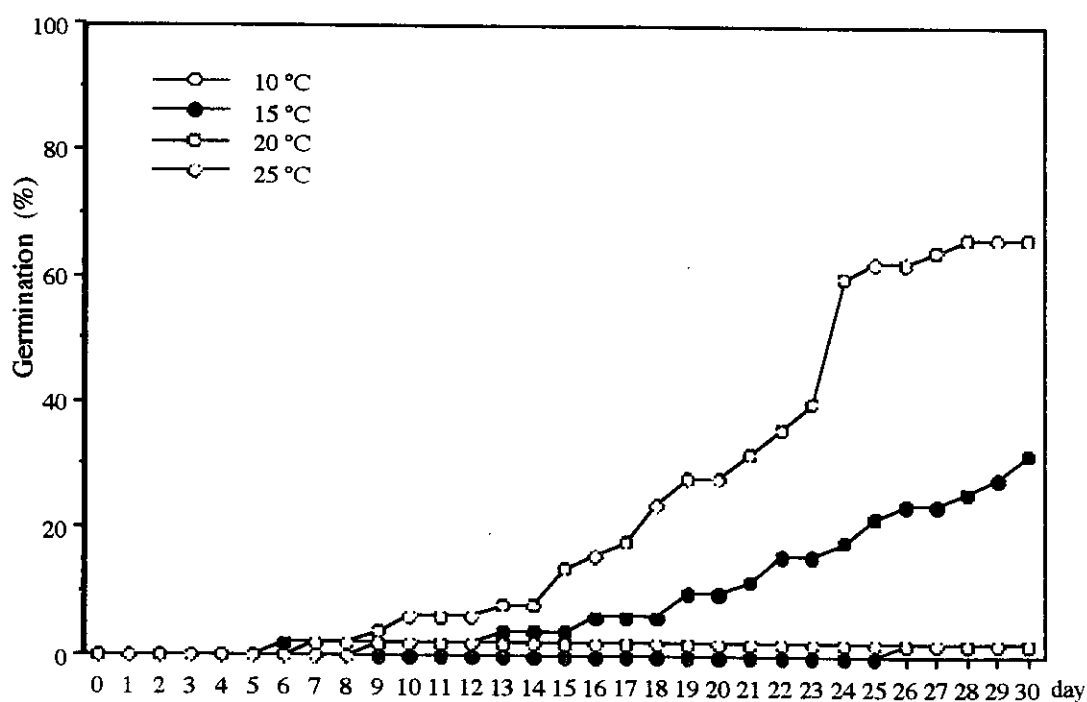
t_R1.55min chlorogenic acid

t_R2.90min luteolin-glucoside

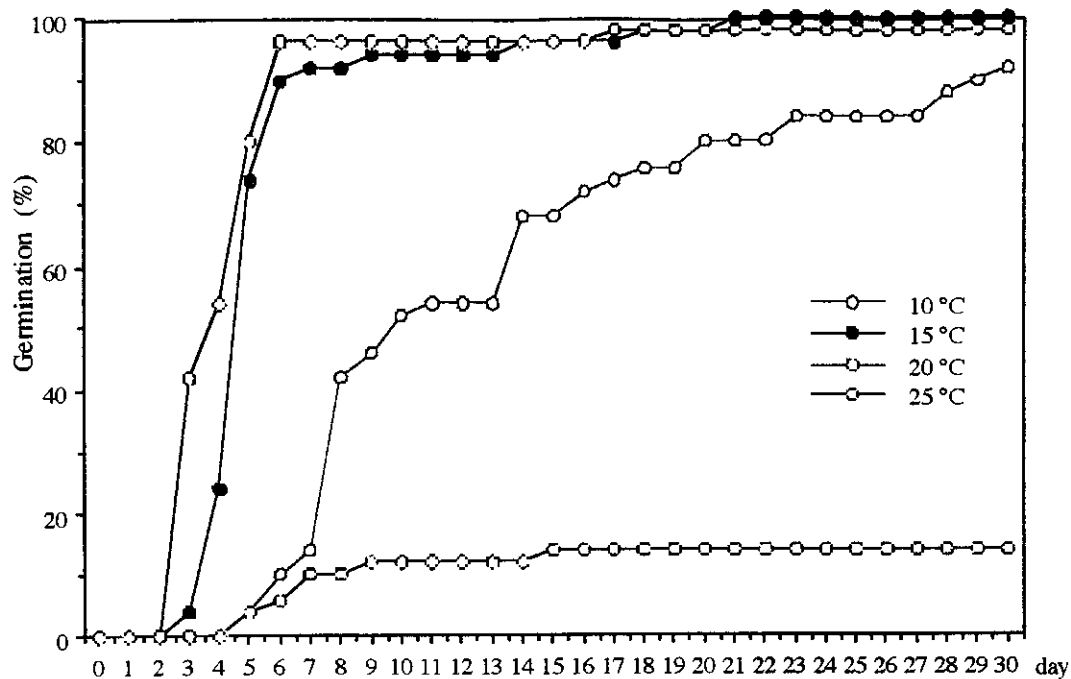
2. 硬実種子の催芽処理 (予試験)

ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii* SIEB. et ZUCC.) 種子の催芽処理

ゲンノショウコ種子は、吸水段階に難があり、容易に発芽することが出来ない。いわゆる硬実種子と考えられるが、一般的な硬実種子とは違い、砂との研磨では種皮に物理的な傷を付けることが出来なかった。そこで、新たな催芽処理方法として、低温プラズマに注目した。

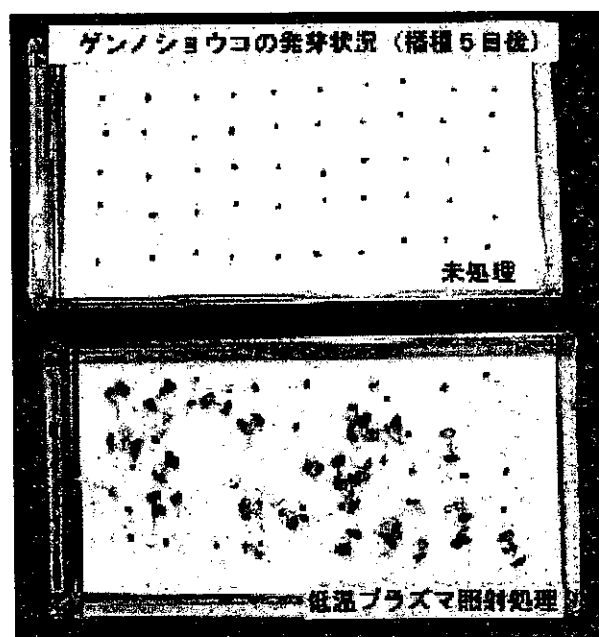


ゲンノショウコの発芽曲線(処理)



ゲンノショウコの発芽曲線(催芽処理：ナイフで傷をつける)

発芽曲線からゲンノショウコ種子の発芽適温は 15～20℃と考えられる。また、種皮に傷を付けた場合には、短期間で発芽することが明らかになった。この傷を付ける処理方法としては、砂との研磨が一般であるが、ゲンノショウコの場合には思わしい結果が得られていない。そこで、プラスチックのぬれ性改善など表面加工処理に応用されている低温プラズマを用いて、催芽処理を試みた。その結果、写真に示すように有意に発芽が促進され、プラズマ照射による催芽処理の可能性を示唆することが出来た。今後、各種条件の検討を予定している。



参考資料

平成 14 年度厚生労働科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究者 酒井英二 岐阜薬科大学 薬草園研究室

1. 生薬の基原植物

菊花：*Chrysanthemum morifolium* Ramat. と野菊花：*C. indicum* L. の比較.

1:金菊花,2:黄金菊,3:黄山野菊花,4:黄菊茶,5:白菊茶,6:杭菊花,7:杭白菊,8:上海杭菊花,9: 黄山野菊,10,13-16: AYJH 野菊花,11:野菊花,12:広東甘菊花,13-16:野菊花,17-21,24:貢菊,22,23,25:黄山貢菊,26-28: 祁菊花,29,30: 毫菊花 31:中国産

80%メタノールで抽出し、水／アセトニトリル／リン酸（280：70：1.9）を移動相とし、280nm で検出した HPLC パターンを比較した。

HPLC 指紋図譜の考え方をキクカに応用した結果、ピーク面積比により菊花と野菊花を区別することが出来た。また、菊花であっても商品名称により HPLC パターンが異なることを明らかにした。すなわち、菊花の基原植物は同一であるが、栽培品種のために多様な系統の存在が考えられる。また、産地により調製加工方法が異なっているようで、それらのことが、HPLC パターンの差に現れたと考えられる。

2. 硬実種子の催芽処理（予試験）

ゲンノショウコ（*Geranium thunbergii* SIEB. et ZUCC.）種子の催芽処理

ゲンノショウコ種子は、吸水段階に難があり、容易に発芽することが出来ない。いわゆる硬実種子と考えられるが、一般的な硬実種子とは違い、砂との研磨では種皮に物理的な傷を付けることが出来なかった。そこで、新たな催芽処理方法として、低温プラズマに注目した。

発芽曲線からゲンノショウコ種子の発芽適温は 15～20℃と考えられる。また、種皮に傷を付けた場合には、短期間で発芽することが明らかになった。この傷を付ける処理方法としては、砂との研磨が一般であるが、ゲンノショウコの場合には思わしい結果が得られていない。そこで、プラスチックのぬれ性改善など表面加工処理に応用されている低温プラズマを用いて、催芽処理を試みた。その結果、写真に示すように有意に発芽が促進され、プラズマ照射による催芽処理の可能性を示唆することが出来た。今後、各種条件の検討を予定している。

遺伝子解析による品質特性に関する研究

分担研究者 水上 元 名古屋市立大学薬学部

A. 研究目的

薬用資源植物の遺伝子資源の保存を行うにあたっては、まず対象となる材料の種を正しく鑑別し、同定することが不可欠な前提である。このためには、外部・内部形態が指標形質として用いられているが、これらの指標は生物の発育段階や生育環境などのいわゆる環境要因によって変化する。また、対象とする植物体のごく一部しか入手できない場合（種子、組織培養シュート、挿し木苗など）には、種鑑別のための十分な形態情報を直ちに得ることが困難である。

生物の遺伝子型を DNA の塩基配列として直接解析することは、環境要因の影響を受けず、また個体のごく一部についても適用できる極めて優れた種鑑別法である。また、分類形質は塩基の種類という客観的なデータとして得られるので、その解釈は一義的である。さらに、一度プロトコルを確立すれば、その実施には特殊な熟練を必要とせず、また自動化も可能である。

漢方薬原料等として重要な生薬「麻黄」は、中国政府による輸出禁止措置に伴って資源確保と新たな資源導入が緊急の課題となっている。麻黄の資源植物である *Ephedra* 属植物を対象として、薬用植物遺伝子資源の導入と保存の前提となる種鑑別的手段としての DNA 鑑別法の有用性評価を目的として研究を実施した。DNA 鑑別のマーカーとしては葉緑体ゲノム上に存在し、光非依存的 protochlorophyllide reductase の B サブユニッ

トをコードする chlB 遺伝子を用いた。

B. 研究結果

（1）DNA の調製

Ephedra 属植物の新鮮な茎から DNA を調製する場合には、通常の SDS-Lysis buffer を用いる方法が適用可能であった。しかし、古い生薬サンプルでは、PCR 増幅を妨害するような物質が含まれている場合があり、抽出した DNA をさらに精製することが必要であった。

そこで、新鮮植物、生薬を問わず、かつ微量のサンプルから迅速に DNA 調製が可能な方法として、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いることにした。この方法では、乾燥サンプル約 40mg から、平均 10 μ g の DNA を調製することが可能であった。

（2）PCR による chlB 遺伝子の増幅

DNA データベース上に登録されている *Ephedra altissima* の chlB 遺伝子塩基配列 (Accession No. U21316) に基いて、chlB のほぼ全長が増幅できるようなプライマーを設計した。このプライマーセットを用いて、いくつかの薬草園で栽培している *Ephedra* 属植物から調製した DNA を鋳型として PCR を行ったところ、いずれの試料からも約 1.5kb と予想されるサイズを有する断片の増幅を認めた。

乾燥した植物試料や生薬から調製した DNA で

は、乾燥過程で DNA の断片化が生じているために一度の PCR で chlB 遺伝子の全領域を増幅することは困難であった。そこで、chlB の領域の一部が重複した約 500bp の 4 つの領域に分けて PCR を行ったところ、生薬由来の DNA からそれぞれの領域に対応した増幅産物を得ることができた (図 1)。

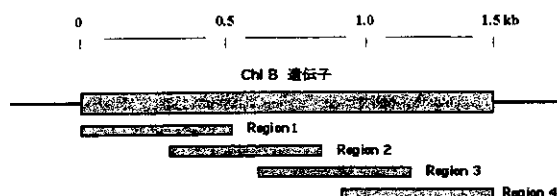


図 1 chlB 遺伝子のシーケンス戦略

(3) PCR 産物のシーケンス

PCR 増幅産物を含む反応液中には未反応のプライマーや dNTP が残存しているために、そのままではシーケンス反応を行うことができない。通常はカラム等を用いて精製を行うが、時間を要することになる。そこで、PCR 反応液に exonuclease と alkaline phosphatase の混合液を加えて 37℃ で 15 分間反応させることにより、PCR プライマーと dNTP を分解してから、シーケンス反応を行った。この方法によって、PCR 産物は精製操作を経ることなく、直ちにシーケンスを実行することが出来るようになった。

(4) 塩基配列の解読

日本各地の薬用植物園で収集、保存されている *Ephedra* 属植物について、その chlB 遺伝子の塩基配列を解読して比較したところ、個所のサイトで塩基置換があり、その配列は 5 つのタイプ (Type 1~5) に分類できることがわかった (図 2)。しかしながら、各植物園で同じ名前は付けられているのに chlB 遺伝子の塩基配列のタイプが

	Nucleotide position															
	1				2				3				4			
	7	1	1	2	2	4	9	0	1	3	3	3	4	4	4	4
	8	5	2	5	7	6	8	7	4	5	3	9	7	7	7	7
Type 1	C	A	A	T	C	G	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C
Type 2	C	A	A	T	T	G	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C
Type 3	G	A	C	T	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Type 4	G	G	C	C	T	G	T	A	T	C	T	C	C	C	C	C
Type 5	G	A	C	C	T	G	T	A	C	C	T	C	C	C	C	C

図 2 *Ephedra* 属植物の chlB 遺伝子の塩基配列に見られる 5 つのタイプ

異なっていたり、異なったラベル名が付されているのに塩基配列が同じタイプであるものが多く、日本の薬草園に栽培されている *Ephedra* 属植物の標本名には混乱が存在していることが明らかになった。

そこで、茎の断面形、髓の有無、皮層部の維管束の有無と数、表皮のクチクラ層の厚さなどを指標にして、その内部構造から *E. sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* と推定できる標本を選び、その chlB 遺伝子の塩基配列を解読した。その結果、内部構造学的に *E. sinica* と鑑定された標本の chlB 塩基配列はすべて Type 1、同じく *E. intermedia* と鑑定された標本はすべて Type 2、さらに *E. equisetina* と鑑定された標本は Type 3 の配列を示した。

さらに、生薬標本を用いて検討した結果、市場品「草麻黄」(*E. sinica* を基原とする麻黄)および津村順天堂標本「草麻黄」の配列はいずれも Type 1 であった。また、第二次大戦中に木島正夫によって中国東北部で採取され、*E. equisetina* と鑑別された標本の配列は Type 3 を示した。

また、1960 年にネパールで採取された標本は、Type 4 を示した。これらの結果に基づいて、*Ephedra* 属植物の種と chlB 遺伝子の塩基配列には表 1 のような対応があることが明らかになった。

表1 Ephedra 属植物の ChlB 遺伝子塩基配列のタイプと種の対応

ChlB sequence Type	Identified Ephedra species
Type 1	<i>Ephedra sinica</i>
Type 2	<i>E. intermedia</i>
Type 3	<i>E. equisetina</i>
Type 4	<i>E. gerardiana</i> or <i>pachyclada</i>
Type 5	<i>E. gerardiana</i> or <i>pachyclada</i>

(5) PCR-RFLP による *E. sinica* の簡便な同定

Type 1 (*E. sinica*) の 263~268 nt の配列 (TGATCA) は制限酵素 *Bcl*I によって認識され、切断されるのに対して、Type 2~5 ではこの位置の配列が TGATTA に置換されているために、*Bcl*I によっては切断されない。そこで、このサイトを含む Region 1 を増幅し、その増幅産物を *Bcl*I で制限酵素処理を行ってから電気泳動によって切断を確認することにより、簡便に *E. sinica* を鑑別できることが明らかになった。

(6) *Ephedra* 属植物の DNA 鑑別プロトコル

以上の研究結果に基づいて、以下のような DNA 鑑別プロトコルを確立することが出来た。

- 1) 粉末試料 40 mg を材料にして、DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen)を用いて全 DNA を調製する。
- 2) DNA 20 ng を鋳型として、Region 1 を 25 μ l スケールの PCR によって増幅する。
- 3) PCR 反応液の 5 μ l をとって電気泳動を行い、増幅産物を確認する。
- 4) 同じく PCR 産物の 5 μ l をとり、*Bcl*I で消化した後に電気泳動を行う。増幅産物の切断が確認された場合は、Type 1 (*E. sinica*) と鑑別する。

切断されなかった場合は、残りの PCR 反応液 14 ml に exonuclease と alkaline phosphatase の混合液 (ExoSapP-It) 7 ml を加えて 15 分間

反応させた後、両鎖についてシーケンス反応を行い、その塩基配列を解読する。

5) 同様に、Region 2~4 についても PCR 増幅し、塩基配列を解読する。

6) Region 1~4 の塩基配列を重ね合わせて、chlB 遺伝子全長の遺伝子塩基配列を確定し、そのタイプから種の同定を行う。

(7) 依頼サンプルの分析

上記のプロトコルの有用性を確認するために、種の鑑別を依頼されたいくつかの試料について、プロトコルを適用した。

1) モンゴル産 *Ephedra* 属植物

国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物試験場に導入されたモンゴル産 *Ephedra* 属植物 4 系統について、DNA 鑑別を行ったところ、いずれも Region 1 の増幅産物が *Bcl*I によって切断されたことから、ただちに *E. sinica* と同定できた。

2) *E. distachya*

同じく、筑波薬用植物栽培試験場で *E. distachya* として栽培されている植物 3 系統について分析を行い、表 2 の結果を得た。

表 2 *E. distachya* サンプルの分析結果

Plant sample	Origin	ChlB sequence type	Identification
<i>E. distachya</i>	Tsukuba	Type 2	<i>E. intermedia</i>
<i>E. distachya</i>	Izu	Type 2	<i>E. intermedia</i>
<i>E. distachya</i>	Germany	New type	?

すなわち、筑波薬用植物栽培試験場と伊豆栽培試験場の *E. distachya* のサンプルはいずれも *E. intermedia* であり、これに対してドイツのサンプルは新しいシーケンスタイプを示した。本来、*E. distachya* はヨーロッパ産の植物について命名されたものであり、これが *E. distachya* である可能性がある。

3) *E. pachyclada*

北海道医療大学薬用植物園で *E. pachyclada* として栽培されている試料について解析を行った結果、その配列は Type 4 を示し、ネパール産 *Ephedra* 属植物という同定結果とラベル名に矛盾はなかった。

C. 結論

本研究費補助金の助成をえて実施した 3 年間の研究によって、*chlB* 遺伝子の塩基配列に基づいて *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* を鑑別する方法を確立した。この方法は粉末試料約 40mg で実施可能であり、PCR 増幅装置と蛍光シーケンサーさえあれば容易に実施可能で、確実な結果が得られる極めてパワフルな方法である。今後、生薬麻黄の基原鑑別法として普及することを期待している。

D. 研究方法

DNA の調製

新鮮な植物地上茎は液体窒素中で凍結破碎したもの約 1g から、乾燥した試料や生薬は粉末約 40mg から、Quiagen の DNeasy Plant Mini キットを用いて DNA を調製した。

PCR による *chlB* 遺伝子の増幅

図 1 に示した *chlB* 遺伝子の 4 つの領域を増幅するために、次のプライマーセットを用いた。

Region 1

FW-1F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACAATGAAATTAGCTT
ATTGGATG-3'

SP-1R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATAACCCGATGA
TATTTACAGAAGG-3'

Region 2

FW-2F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACATTCAAGCAGCAG
ATAGGAC-3'

SP-2R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATACTGAAAAC
CAAACAGCTTGGG-3'

Region 3

FW-3F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACTCGGTGAATCCTTT
TGCTTC-3'

SP-3R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATACTCGTACC
CCATAAAAGGACG-3'

Region 4

FW-4F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACACTGTTGTTTTTGG
TGATGC-3'

FW-4R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATACTTGTAAATC
TTAACTACACCC-3'

それぞれのプライマーの下線部は、プライマーラベル法を用いてシーケンスするために、蛍光標識のシーケンスプライマーのプライミングサイトとして付加したものである。PCR は、25 μ l あたりプライマー各 10 pmole と dNTP 50 nmole、Taq DNA polymerase 0.5 unit、鋳型 DNA 10 ng を含むように PCR 混合液を調製し、94 $^{\circ}$ C-30 秒、55 $^{\circ}$ C-30 秒、72 $^{\circ}$ C-30 秒の反応を 30 サイクル繰り返した。反応産物は、2% アガロースゲル電気泳動によって確認した。

PCR産物のシーケンス

PCR 反応液 5 μ L に ExoSAP-IT(Amersham Bioscience)2mL を加え、37℃で 15 分間、80℃で 15 分間インキュベートした。この溶液に蛍光標識シーケンスプライマーを加え、ThermoSequenase Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience)を用いてシーケンス反応を行い、蛍光シーケンサー (ShimadzuDSQ-2000L) を使用して、塩基配列を解読した。なお、シーケンスは両鎖について解読した。

PCR-RFLP 分析

PCR 反応液 5 μ l に *Bcl* I 1 μ l (10 units)および 10X 反応バッファー1 μ l を加え、全量を 10 μ l とした。37℃で 60 分間インキュベートした後、切断の有無を 2%アガロースゲル電気泳動によって確認した。

薬用植物の高感度アッセイ法による保存植物の品質評価に関する研究

分担研究者 正山征洋 九州大学大学院薬学研究院

漢方方剤に繁用される生薬の内、サイコ（柴胡）、ダイオウ（大黄）、シャクヤク（芍薬）等の薬理活性成分に対するモノクローナル抗体(MAb)を作製し、それらを用いた高感度アッセイ系を構築した。また、大黄の sennoside A 及び B に対する MAb を用いて両者を一度に検出可能なキットの開発に成功した。

A. 研究目的

漢方薬や生薬は天然由来のため、品質の不均一性が大きいことは周知の事実である。このため活性の変動も大きいことが予想される。このような状況のため活性成分やマーカー成分を分析し、評価することは不可欠である。従来は HPLC がその主体をなしていたが、より簡便、高感度、前処理が不要な、再現性が大な、かつ環境に優しい分析法として MAb を用いる方法を開発し遂行することを目的としている。また、フィールドで使用可能な MAb を用いた分析キットの開発も合わせて目的とした。

B. 研究方法

1. モノクローナル抗体の作製と高感度アッセイ系の構築

柴胡の saikosaponin a、芍薬の paeoniflorin それぞれの糖鎖部分を NaIO₄ で開環し、BSA 等のキャリアタンパクを結合しマウスへ免疫する。脾臓細胞の単離、ミエローマ細胞との融合、セレクション、クローニングを経て MAb 産生細胞を単離・増殖し、大量培養により MAb を得る。MAb を用いて定法どおり競合法による ELISA を確立する。

2. Sennoside A 及び B に対する MAb を用いた同時分析キットの開発

膜ヘトラップ用の sennoside A-HSA コンジュゲートと sennoside B-HSA コンジュゲートをそれぞれ適当な間隔を置き吸着させる。抗マウス IgG MAb をトップへ吸着させ、余分の MAb をトラップする。センナの粗抽出エキスと金粒子でラベルした抗 sennoside A 及び B MAb をステック下部へ添加し、バッファー液にステック下部を浸して浸透圧によりバッファー液を上昇させる。

C. 研究結果と考察

柴胡の saikosaponin a に特異的な MAb が得られ、他の saikosaponin は殆ど認識しないことが明らかとなった。本 MAb を用いて競合的 ELISA を確立した。本法によると 26ng/ml から 1.5 µg/ml の範囲で正確な分析が可能なが判明した。また、旧来の HPLC 法による分析結果と良好な相関が得られ、信頼がおける分析法であることを証明した。一方幅広いクロスリアクションを持つ MAb によりトータル saikosaponin の分析法も同様に確立した。本法を用いて柴胡配合漢方薬中の saikosaponin a や