なお、No.2、No.3 及び No.4 に共通して言えることだが、*Arctostaphylos* 属植物はヨーロッパにもう 1 種 *A. alpinus* が分布している [3a] がこの種は葉に鋸歯があるため容易に判別可能なうえ、常緑でないため使用される可能性はない。また、コケモモ葉 (*Vaccinium vitis-idaea*) と混同されると記載 [2c] があるが、別属であるため塩基置換が多く存在することが予想される。

5）No.5 : Polygala Racine（性状：切断された根）

本生薬及び *Polygala* 属植物は ITS 領域及び *trn*L intron 領域が共に解析できた (Fig.3、Fig.4)。*Polygala tenuifolia* である PLA1、PLA2 と *P. senega* である PLA3 は ITS 領域では 708 bp のうち 56 箇所の塩基置換と 43 箇所の欠失が、*trn*L intron 領域では 507 bp のうち 31 箇所の塩基置換と 11 箇所の欠失が観察され大きく異なっていた。一方 No.5 と PLA3 を比較すると No.5 は ITS 領域の 124 番目の塩基が cytosine であるのに対し PLA3 が thymine であった。*trn*L intron 領域は 247 番目が adenine であるのに対し PLA は guanine であった。*trn*L intron 領域についてはデータベースに *Polygala senega* (AF366992) が登録されており、これは 247 番目が adenine であり No.5 と一致する。PLA3 及び No.5 に観察された 1 塩基ずつの置換は種内変異であると考え No.5 は *Polygala senega* と同定した。

また、No.5 は形態的にも縦じわ等 [1b,2b] のセネガの特徴が観察され、本同定を支持している。

6）No.6 : Rdesno blesnik nat（性状：切断された茎葉）

当初、ツルドクダミ (*Polygonum multiflorum*) であると考え、この植物を解析した。ツルドクダミ (PLG1-4) は *trn*L intron 領域のみ解析可能であり、この領域を比較した。また No. 6 は ITS 領域及び *trn*L intron 領域共に解析できた。*trn*L intron 領域の配列を基に構築した分子系統樹を Fig.5 に示す。データベースの *Rhumex patientia* (AF303432)、*Rheum palmatum* (AY566453) とも比較するとツルドクダミとは明らかに異なっていた。No.6 の ITS 領域に関して相同性検索と行なうと *Polygonum filiforme*、*Polygonum hydropiper* などが類似配列として挙げられるため *Polygonum* 属であると思われる。しかしデータベースには本属のデータが少ないためこれ以上の比較はできない。

一方、No.6 の商品ラベルには“HERBA POLYGONI LAPATHIFOLII”と記載されており、*Polygonum lapathifolium* L.（サナエタデ）である可能性も高い。これは植物と比較することで同定可能である。

本研究で使用した試料は、葉であり、もしツルドクダミとしても、食薬区分上は、非「医」扱いとなる。本研究の成果より、本品は、ツルドクダミとは異なる植物であることが明らかとなったので、本品が輸入された場合、新たに食薬区分が必要と考えられる。

7）No.7 : Horec koren（性状：切断された細根）

No.7 及び植物検体 G1 について *trn*L intron 領域 438 bp を解析した。また、*Gentiana lutea* (X75702) に加えヨーロッパで薬用として使用される [2d] 同類植物 *G. pannonica* (X76815)、*G. punctata* (X77894)、*G. purpurea* (AJ430909、X77893) の同領域の登録配列も同時に比較した (Fig. 6)。これら以外にも *Gentiana* 属植物は登録されているが、それらの配列と相同性は見られなかった。

G1 と *G. lutea* は同種ながら 61 番目、216 番目及び 218 番目の 3 箇所で違いが観察された。*G. purpurea* である AJ430909 と X77893 も 247、343、346、372 番目の 4 箇所に違いがある。このことは *Gentiana* 属植物の *trn*L intron 領域において同一種でも数塩基の違いが存在しうることを示唆している。

No.7 は G1 と 2 箇所、X75702 と 3 箇所、X76815 と 2 箇所、X77894 と 4 箇所、AJ430909 と 2 箇所、X77893 と 3 箇所の違いが見られる。ゆえに No.7 は *G. lutea*、*G. pannonica*、*G. punctata* 及び *G. purpurea* のいずれかである。

8）No.8：GENTIANE（性状：切断された根及び根茎）

No.8 は Fig.6 において G1 と相同な配列であった。61 番目が adenine であることは G1 (*Gentiana lutea*) にしか見られない特徴であり No.8 は *Gentiana lutea* であると同定した。

なお No.7 及び No.8 に関して、*Gentiana* 属は本研究で比較した種を含めてヨーロッパに 29 種分布しており [3b)]、今回はその全ての種を比較したわけではない。しかし、*G. asclepiada*、*G. froelichii*、*G. cruciata*、*G. pneumonanthe* など主要な *Gentiana* 属植物に関して *trn*L intron 領域のデータが登録されており、それらと配列の相同性は見られなかった。本同定結果は妥当であると考えられる。

D. 結論

生薬 8 検体について DNA の配列の比較により原植物を同定した結果を Table 3 にまとめた。No.1、No.6 については同定することができなかった。アロエは生薬に加工されるた状態では DNA の配列の比較による同定は困難である。No.6 は、ツルドクダミの同属植物である可能性が高い。No.7 は同定できなかったものの *Gentiana lutea*（局方ゲンチアナの原植物）を含む *Gentiana* 属植物 4 種に絞り込むことができた。No.2、No.3、No.4、No.5 及び No.8 については日本薬局方に収載されているウワウルシ、セネガ、ゲンチアナと同じ原植物であることを明らかにした。従って、ヨーロッパ市場で入手できたウワウルシ、セネガ、ゲンチアナについては、日本で規定しているものと同じ基原植物であり、食薬区分で混乱は生じないものと考えられた。

E. 健康危機情報

特になし

F.研究発表

特になし

G.文献

1) 日本公定書協会編、第十四改正日本薬局方、じほう、東京、2001、a)アロエ、p.809、b)セネガ、p.893。
2) 井上博之監訳、西洋生薬、広川書店、東京、1999、a) アロエ、pp.59-62、b) セネガ、pp. 384-385、c)ウワウルシ、pp. 510-512、d) ゲンチアナ、pp. 233-235。
3) Tutin T. G. (ed.), "FLORA EUROPAEA, vol.3" Cambridge University Press, London, 1972 a) Arctostaphylos, p.11, b) Gentiana, pp. 56-63.

Table 2. Plant samples used in this study

	Species	Locality of voucher*	Specimen reference No.
AL1	*Aloe ferox* Mill.	TN-NIH	0063-99TN
AL2		TN-NIH	0063-99TN
AL3		TN-NIH	0063-99TN
AL4		TN-NIH	0063-99TN
AL5		TS-NIH	0262-79TS
AL6		MP-ME	
AL7	*A. vera* L.	TS-NIH	0058-03TS
AL8		TS-NIH	0266-79TS
AL9		MP-ME	
AL10	*A. africana* Miller	MP-ME	
AL11		MP-ME	
AL12	*A. succotrina* All.	MP-ME	
AL13	*A. mitriformis* Miller	MP-ME	
AU1	*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.	HK-NIH	13223-91HK
AU2		MP-SU	
PLA1	*Polygala tenuifolia* Willd.	MP-HU	
PLA2		TS-NIH	1829-83TS
PLA3	*Polygala senega* L.	MP-HU	
PLG1	*Polygonum multiflorum* Thunb.	MP-HU	
PLG2		TN-NIH (introduced from TS-NIH)	0031-81TN
PLG3		TN-NIH (introduced from Kunming, China)	0084-82TN
PLG4		TS-NIH	0410-79TS
G1	*Gentiana lutea* L.	HK-NIH	1148-65HK

*Abbreviation:

TN-NIH, Tanegashima Experimental Station for Medicinal Plants, National Institute of Health Sciences, Kagoshima.

TS-NIH, Tsukuba Medicinal Plant Research Station, National Institute of Health Sciences, Tsukuba, Ibaraki.

MP-ME, Tokyo Metropolitan Medicinal Plants Garden, Kodaira, Tokyo.

TH-NIH, Hokkaido Experimental Station for Medicinal Plants, National Institute of Health Sciences, Nayoro, Hokkaido.

MP-SU, Medicinal Plant Garden School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Fujiyoshida, Yamanashi.

MP-HU, Medicinal Plant Garden of Hoshi University, Shinagawa, Tokyo.

Table 1. Herbal drug samples used in this study

Sample	Market	Product Name	Additional statement	Property
No.1	Czechoslovakia	Aloe kapska	ALOE CAPENSIS	inner leaf gel
No.2	Czechoslovakia	Medvedice list	FOLIUM UVAE URSI	leaf
No.3	France	BUSSEROLE (feuille)	*Arctostaphylos uva ursi*	leaf
No.4	Swiss	Barentraubenblatter		leaf and granule
No.5	France	Polygala Racine		root
No.6	Czechoslovakia	Rdesno blesnik nat	HERBA POLYGONI LAPATHIFOLII	stem and leaf
No.7	Czechoslovakia	Horec koren	RADIX GENTIANAE	root, rhizome
No.8	France	GENTIANE (racine)	*Gentiana lutea*	root, rhizome

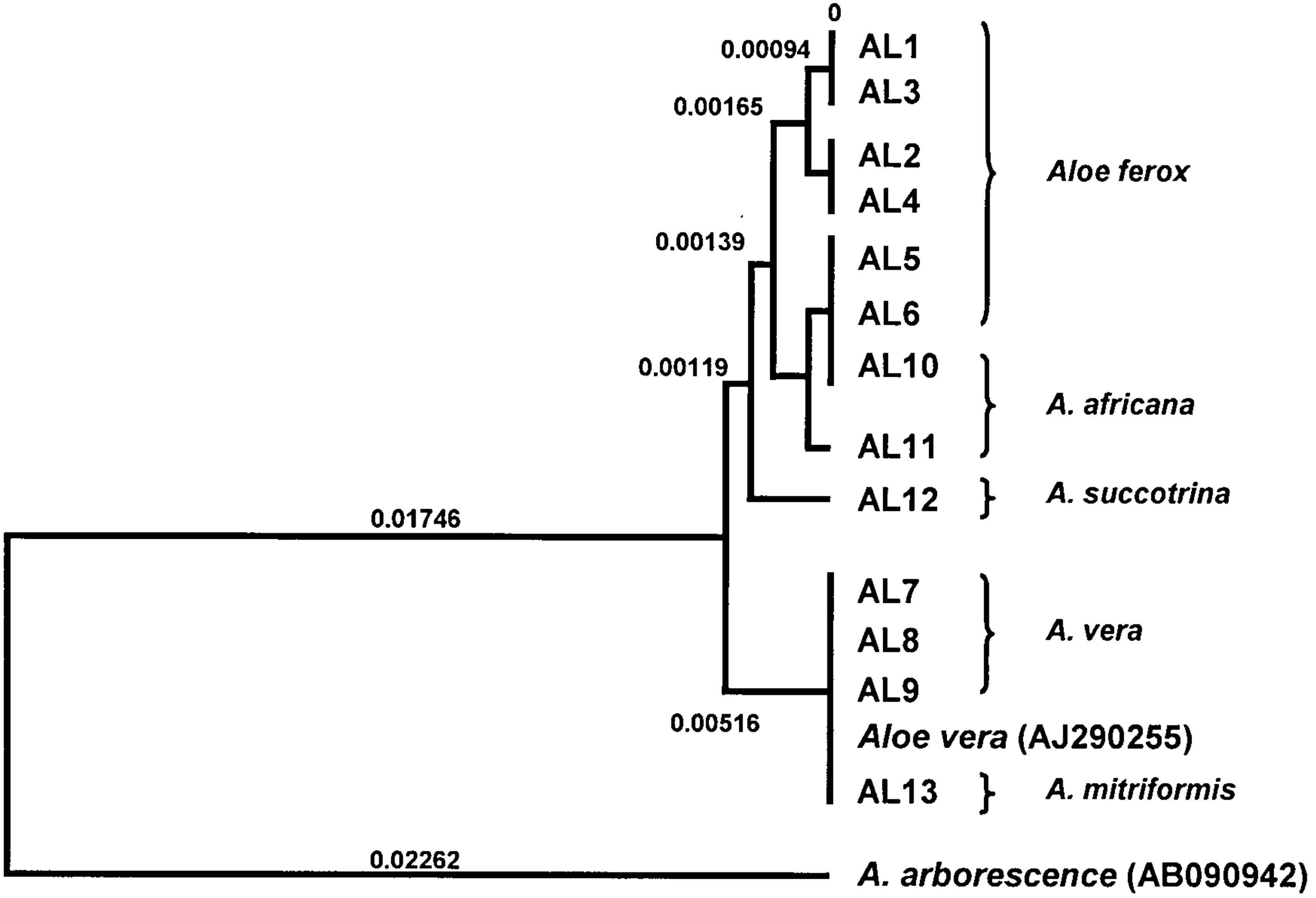


Fig. 1. **The phylogenetic tree using UPGMA method among *Aloe* species about *trn*L intron region (branch lengths were mapped along each branch)**

	34	46	240	316
AU1 (*Arctostaphylos uva-ursi*)	T	C	C	T
AU2 (*A. uva-ursi*)	T	C	C	T
A. uva-ursi (AF106822)	A	T	A	C
No. 2	T	C	C	T
No. 3	T	C	C	T
No. 4	T	C	C	T

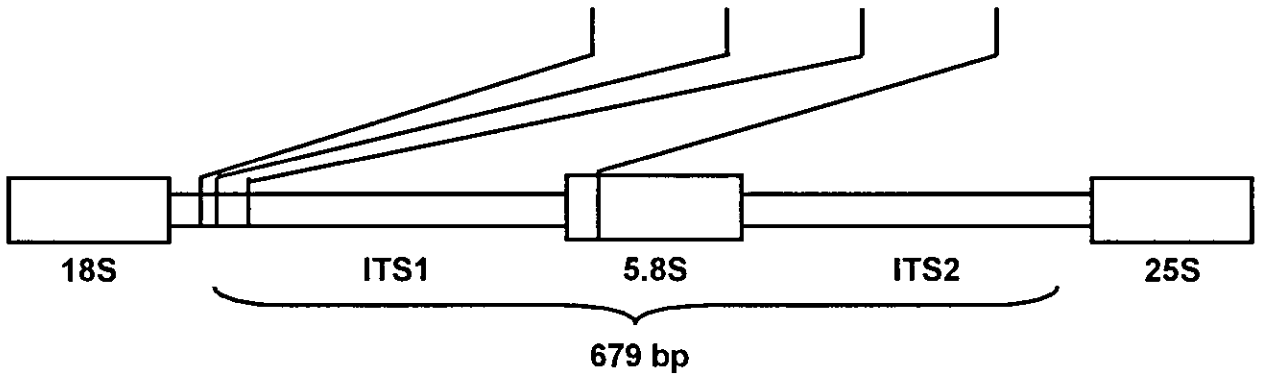


Fig. 2. Nucleotide differences in ITS region of *Arctostaphylos uva-ursi*, No. 2, No. 3 and No. 4

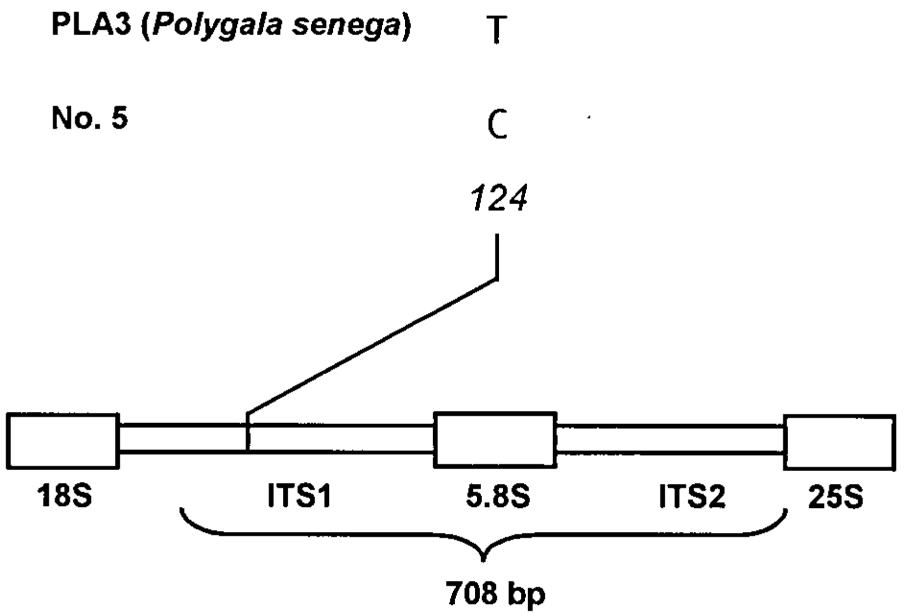


Fig. 3. Nucleotide differences in ITS region of *Polygala senega* and No.5

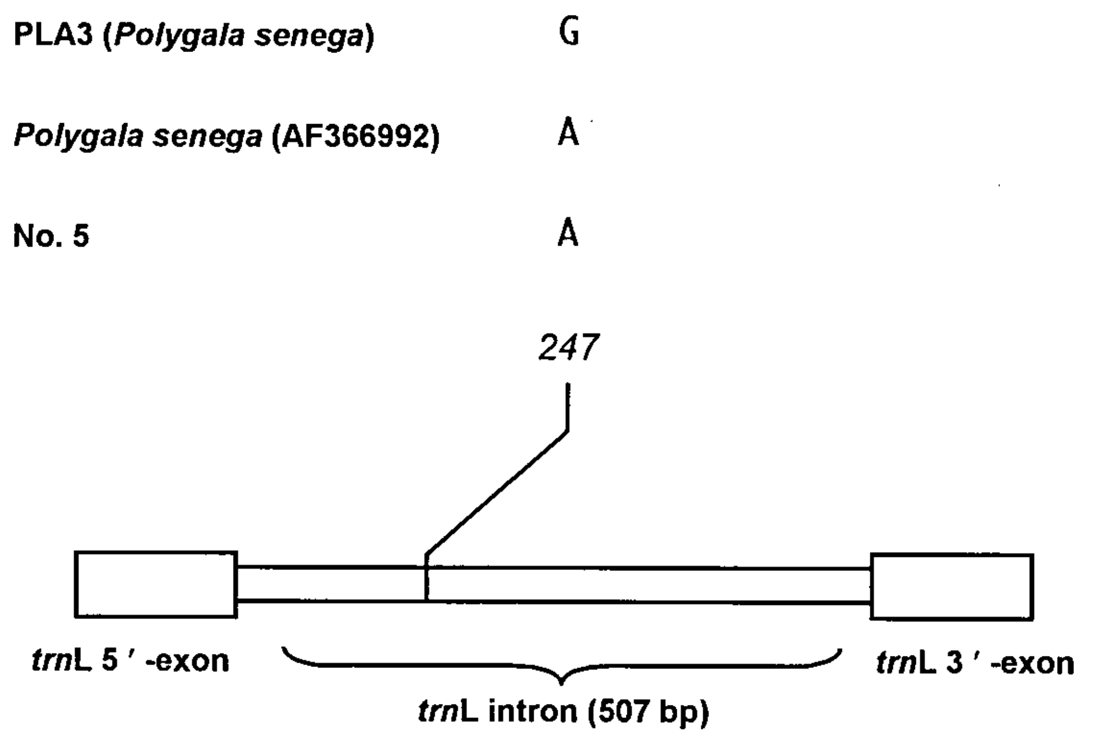


Fig. 4. Nucleotide differences in *trn*L intron region of *Polygala senega* and No.5

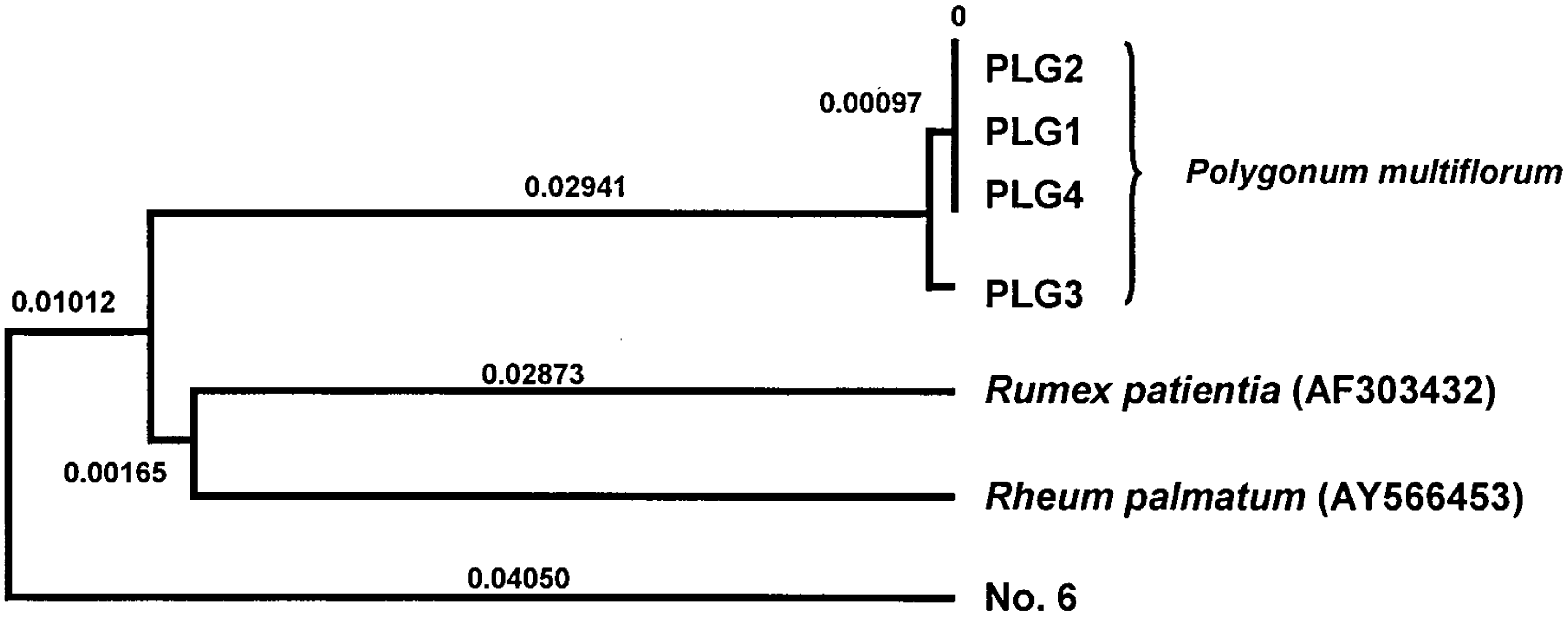


Fig. 5. **The phylogenetic tree constructed from the *trn*L intron sequences of *Polygonum*, No. 6 and related species (UPGMA method, branch lengths were mapped on each branch)**

	61	216	218	247	343	346	372	404
G1 (*Gentiana lutea*)	A	T	G	C	T	G	C	T
Gentiana lutea (X75702)	G	-	-	C	T	G	C	T
G. pannonica (X76815)	G	T	G	C	T	G	A	T
G. punctata (X77894)	G	T	G	G	-	-	C	T
G. purpurea (AJ430909)	G	T	G	C	T	G	A	T
G. purpurea (X77893)	G	T	G	G	-	-	C	T
No. 7	G	T	G	C	T	G	C	G
No. 8	A	T	G	C	T	G	C	T

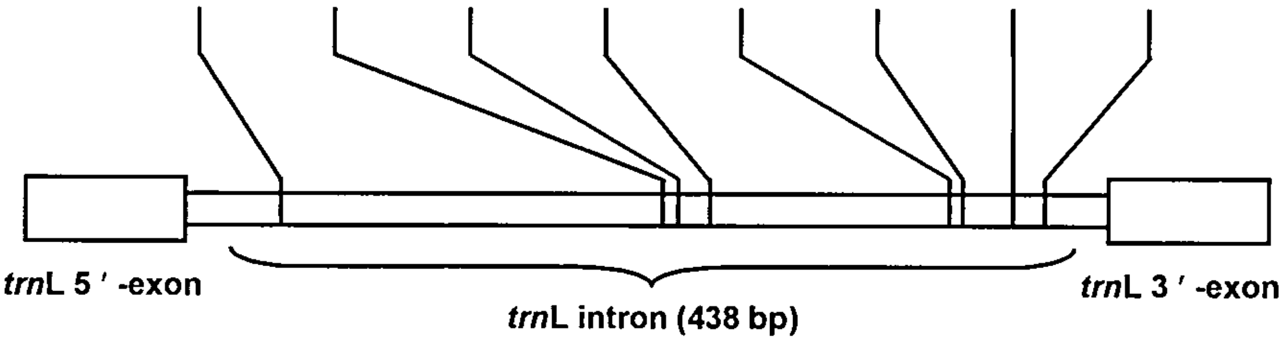


Fig. 6. Nucleotide differences in *trn*L intron region of *Gentiana* species, No. 7 and No. 8

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療器機等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題　「専ら医薬品」の有効性、安全性等の評価に関する調査及び実証的研究並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者　国立医薬品食品衛生研究所　生薬部長　合田幸広

タイ産植物 *Pueraria mirifica* を基原とする健康食品の DNA 分析

研究要旨
タイ産のマメ科植物、*Pueraria mirifica* を基原とする食品ついて、核 rDNA、ITS 領域及び葉緑体 rps16 イントロン領域の DNA 配列解析を行った。その結果、*P. mirifica* の遺伝子配列が認められたのは、12 検体中、わずか 6 検体にとどまり、その他の検体からは、サツマイモやクズイモ等と相同性の高い配列が検出された。これらは、いずれも食薬区分上、食品に分類されるものであった。

協力研究者　丸山卓郎　国立医薬品食品衛生研究所生薬部　研究員

A. 研究目的

Pueraria mirifica (*P. candollei* var. *mirifica*) は、タイ国、主にチェンマイ周辺に自生するマメ科の植物であり、その肥大した塊根は、kwao keur (ガウクルア) と呼ばれる回春薬として古くより当地で用いられている。その成分には、daidzein、genistein、kwakhurin、puerarin などのイソフラボン類や coumestrol、mirificoumestan などのフテロカルハン誘導体、miroestrol (1)、deoxymiroestrol (2)(図 1) などのステロール類が知られ、後者 2 成分のエストロゲン作用が、薬理活性の本体であると考えられている [1,2]。近年、国内では、美容、豊胸効果などを謳い、本植物を原料とした「いわゆる健康食品」が、数多く販売されている。しかし、原産国のタイにおいて、kwao keur は、white、red、black の 3 品種が知られ、red、black は、*P. mirifica* と近縁の別の植物の可能性も指摘されている [2]。また、同属植物の *P. lobata* (*P. montana* var. *lobata*) の根は、「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) リスト」に収載されている、生薬カッコンの原料である。さらに、1 の単体での服用は、頭痛、倦怠感、嘔吐などの副作用を惹起することが報告されており [2]、*Pueraria mirifica* 含有食品は、その品質及び安全性に注意が必要である。そこで本研究では、DNA 分析により本製品に用いられている植物の基原種について調査を行った。DNA 配列解析を用いた *Pueraria* 属植物の分類は、2001 年に Lee らによる、葉緑体 rps16 (ribosomal protein small subunit 16) イントロン領域の塩基配列を利用した Glycininae 亜連の系統解析が報告されている [3]。一方、国際塩基配列データベース (DDBJ、EMBL、GenBank) には、核 rDNA、ITS 領域の配列が 3 種について登録されている。ITS 領域は、これまでに最も種の系

統解析に使用された遺伝子領域の一つであり、上記データベースへの登録数が多いことから不測の基原種の推定に有利である。このことから、標的配列には ITS 領域及び rps16 イントロン領域を選択した。

B. 研究方法

1. 実験材料

Pueraria mirifica 含有食品 (粉末、錠剤、カプセル剤) は、インターネット上の販売店より購入した (表 1)。このうち、粉末及びカプセル剤 13 品目について分析を行った。*Pueraria mirifica* の標品は、千葉大学大学院薬学研究院の石川勉先生及び兵庫県和田山町特産物市場組合より御恵与いただいたものを用いた。

2. 実験方法

各試料、約 30 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) により凍結粉砕した後、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、各プライマー対を用いた 2 段階の PCR を行うことにより、目的の ITS 領域 (約 700 bp) 及び rps16 イントロン領域 (約 350 bp) を増幅した。プライマーは、ITS 領域については、植物の rDNA に広く保存されている配列を、rps16 イントロン領域では、*Pueraria* 属植物に保存性の高い配列を基に設計した。PCR は、酵素に Gene TaqNT DNA polymerase (Nippon Gene) を、緩衝液及び dNTPs は、酵素に添付のものを用い、DNA engine PTC-200 (MJ research、現 Bio Rad) により行った。Microcon-PCR (Millipore) を用いたフィルターろ過により PCR 溶液から余剰のプライマー及び dNTPs を除去した後、このものを鋳型とし、ダイレクトシークエンスによりそれぞれの塩基配列解析を行った。Cycle sequencing 試薬には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。本研究に使用したプライマーの配列を表 2 に示した。

C. 研究結果

各検体より genomic DNA を抽出し、PCR により目的の領域を増幅した後、ダイレクトシークエンスにより塩基配列解析を行った。2 つの標準品は、ITS 領域においては、同一個体内で遺伝子多形を示した 3 箇所を除き、同一の配列であった。一方、rps16 イントロン領域では、1 箇所の多形部位の他に、千葉大学由来の標品で 10 bp の塩基の欠失が観察された。各検体の解析の結果を表 3 に示す。表の中で *Pueraria mirifica* 以外の種名は、Blast search プログラムによる相同性検索において最も高い相同性 (98.9-99.8%) を示した種を記載している。ITS 領域は、Pu-4 を除く全ての検体で、rps16 イントロン領域では 7 検体で増幅産物が得られた。このうち、*Pueraria mirifica* の配列が検出されたのは、13 検体中 6 検体であり、全て、解析した 2 つの領域双方で認められた。また、これらの検体の rps16 イントロン領域の配列は、1 箇所の多形部位を除き、全て和田山町由来の標品と同一の配列であり、千葉大学由来の標品で観察された 10 bp の欠失が認められたものはなかった。その他の検体では、*Pueraria* 属とは異なる植物の遺伝子配列が見出された。なお、今回の解析に用いた 2 つの領域では、1 塩基の挿入、欠失に基づく変異が多くの検体で観察され、変異部位以降の配列が 2 つの配列の混合物として検出されるために、ダイレクトシークエンスによる配列解析が困難なものがあった。この現象は、単一個体由来の試料を用いた標準品においても観察されていることから、種内変異の集合ではなく、今回用いた遺伝子領域が複数のコピーを有すること

に起因すると考えられる。

D. 考察

2 種の標準品は、ほぼ同一の配列を示し、これらの配列は、データベース中の *P. montana* var. *lobata* (Acc. no.: ITS、AF338214; rps16、AF311835) 及び *P. montana* var. *thomsonii* (Acc. no.: ITS、AF338217) などの同属植物の配列と ITS 領域において約 94%、rps16 イントロン領域において約 97% の相同性を示し、明確な区別が可能であった。上記 2 種は、中国薬典において葛根の基原植物に規定されている植物であり、また、前者の根は、国内において「専ら医薬品」に指定されており、これらとの区別が出来ることは重要である。*P. mirifica* の配列が検出された 6 検体間の配列比較では、同一検体内の多形箇所を除くと、どちらも 2 つのタイプに分かれたが、ITS 領域で 2 塩基、rps16 イントロン領域で 1 塩基の違いであり、種内変異の範囲内と考えられる。ITS 領域では、設計したプライマーの性質上、他の植物の配列との混合物が検出されることも多く、また、上で述べた塩基の挿入、欠失に基づく変異の度合いも大きいことから、*Pueraria mirifica* の検出のみの目的では、rps16 イントロン領域を用いる方が望ましいと思われた。Rps16 イントロン領域では、PCR 産物の得られる検体が少なかったが、これは、プライマーを *Pueraria* 属植物の配列を基に設計しているためであり、DNA の抽出効率の問題ではないと思われる。このことは、ITS 領域及び *Pueraria* 属の近縁植物である *Pachyrhizus erosus* (Pu-17) の rps16 イントロン領域が問題なく増幅されていることからも支持される。

その他の検体で検出された *P. mirifica* とは異なる植物のうち、サツマイモやクズイモは、*P. mirifica* と同じつる性植物であり、肥大した塊根を持つことから原植物の誤同定が混入の原因とも考えられるが、その他のものについては、その可能性は皆無と言えるものである。ただし、分析法の性格上、粉砕等の製造工程でコンタミネーションした極微量の DNA を検出している可能性は否定出来ない。また、*P. mirifica* 遺伝子が検出されなかった検体についても、その結果が直ちに *P. mirifica* の含有を否定するものではないため、miroestrol や kwakhurin などの種特異的成分の分析法と合わせての考察が望ましい。なお、検出された植物には、「専ら医薬品」に該当するものは無く、食薬区分の観点からは、緊急に対応を迫られる問題は無いと思われる。

最後に、*Pueraria mirifica* 遺伝子が検出された 6 検体とその他の 6 検体の 1 g 当たりの平均価格は、それぞれ 1368 ± 1206 円、353 ± 247 円であり、大きな差があったことを付記しておく。

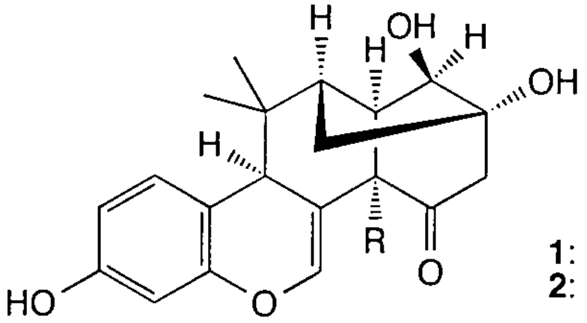
E. 結論

P. mirifica 製品 13 検体より、DNA を抽出し、核 rDNA、ITS 領域及び葉緑体 rps16 イントロン領域の塩基配列解析を行った結果、6 検体で *P. mirifica* の配列が確認された。一方、別の 6 検体では、他の植物由来の配列が見出され、上記製品には表示に記載の無い原材料が使用されている可能性が示唆された。この中には、原植物の誤同定によるものと思われるものだけではなく、作為的に別の植物を用いたと思われる悪質なものも認められた。ただし、これらはいずれも食品として扱われる植物種であり、食薬区分上問題となるものは無かった。

F. 参考文献

1) Chansakaow S., Ishikawa T.,Seki H., Sekine K., Okada M., Chaichantipyuth C., Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "kwao keur" *Pueraria mirifica*: a known miroestrol may be an artefact. *J. Nat. Prod.*, 63, 173-175 (2000).

2) Ingham J. L., Tahara S., Pope G. S., Chemical components and pharmacology of the rejuvenating plant *Pueraria mirifica*. In Keung W. M. ed., Pueraria-The genus Pueraria, Taylor and Francis Inc., New York (2002).
3) Lee J., Hymowitz T., A molecular phylogenetic study of the subtribe Glycininae (Leguminosae) derived from the chloroplast DNA *RPS*16 intron sequences. *Am. J. Bot.*, 88 (11), 2064-2073 (2001).



1: R = OH
2: R = H

図 1　Miroestrol (1) 及び deoxymiroestrol (2) の構造

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

I. 健康危機情報

表示に記載の無い原材料の存在が示唆されたが、いずれも非「医」の植物であり、直ちに国民の健康被害に直結する恐れはないと思われる。

表 1　本研究に使用した *Pueraria mirifica* 製品

Samaple #	製品形態	色	含有成分等
Pu-1	カフセル	灰黄白色	フエラリア・ミリフィカ (ガウクルア) 100%
Pu-2	カフセル	灰黄白色 (有色の砕片含有)	フエラリカ・ミリフィカ ショ糖脂肪酸エステル
Pu-3	カフセル	灰黄白色	フエラリアミリフィカハウダー・海洋性フィッシュコラーゲンヘフチド・ハールハウダー
Pu-4	カフセル	肌色	フエラリア 100%
Pu-5	錠剤	灰白色	フエラリアミリフィカ、ザクロエキス、大豆抽出物、ビタミンC、ビタミンE、ナイアシン
Pu-6*	錠剤		麦芽糖、乳糖、フエラリア、ミリフィカ末、ワイルドヤムエキス、マカ原末、たんぽぽ末など
Pu-7	錠剤	桃色	フエラリア、ビタミンC、E、DNA、RNA
Pu-8	カフセル	灰黄白色 (有色の砕片含有)	1カフセル中　中身約 260 mg フエラリアミリフィカ末約 252 mg
Pu-9	錠剤	灰黄白色	フエラリア・ミリフィカ粉末 ショ糖脂肪酸エステル
Pu-10	粉末	灰黄白色 (有色の砕片含有)	フエラリア粉末 100%
Pu-11	カフセル	灰黄白色	タイ産のピュアフエラリアを 100%
Pu-12	錠剤	黄土色	ガウクルア (フエラリア)
Pu-13	カフセル	灰黄白色	フエラリア・ミリフィカを 100%
Pu-14	カフセル	黄土色	ガウクルア (フエラリア) 配合
Pu-15	カフセル	乳白色	ガウクルア 100% 濃縮カフセル
Pu-16	粉末	黄土色	フエラリア　天然物 100%
Pu-17	カフセル	茶褐色	フエラリアミリフィカ
Pu-18	粉末	灰黄白色	フエラリア・ミリフィカ 100%

*: 欠品

表 2　本研究に使用したフライマーの配列

	sense primer	sequence (5'-3')	antisense primer	sequence (5'-3')
ITS first	ITS-S1	CTTTATCATTTAGAGGAAGGAG	ITS-AS1	TTTTCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS second	ITS-S2	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS-AS2	GTAGTCCCGCCTGACCTG
rps16 first	rps16-S1	CTAAACCCAATGATTCAAAG	rps16-AS1	AAACGATGTGGTAGAAAGCA
rps16 second	rps16-S2	AAAAGCTAAAAGATCATGGAA	rps16-AS2	CCCTAGAAACGTATAAGAAGTT

表 3　*Pueraria mirifica* 製品から検出された遺伝子の推定基原種

sample #	ITS	rps16 intron
Pu-1	*Medicago sativa* (ムラサキウマゴヤシ) + ?	no amplicon
Pu-2	*Pueraria mirifica*	*Pueraria mirifica*
Pu-3	mixture	no amplicon
Pu-4	no amplicon	no amplicon
Pu-8	*Glycyrrhiza glabra* (スペインカンゾウ)	no amplicon
Pu-10	*Pueraria mirifica*	*Pueraria mirifica*
Pu-11	*Ipomoea batas* (サツマイモ) + ?	no amplicon
Pu-13	*Nelumbo nucifera* (ハス) + ?	no amplicon
Pu-14	*Pueraria mirifica* + ?	*Pueraria mirifica*
Pu-15	*Pueraria mirifica*	*Pueraria mirifica*
Pu-16	*Pueraria mirifica*	*Pueraria mirifica*
Pu-17	*Pachyrhizus erosus* (クズイモ)	*Pachyrhizus erosus* (クズイモ)
Pu-18	*Pueraria mirifica*	*Pueraria mirifica*

影付きは、*Pueraria mirifica*

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題　「専ら医薬品」の有効性、安全性等の評価に関する調査及び実証的研究並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者　合田　幸広　国立医薬品食品衛生研究所生薬部部長

—漢方処方の味認識に関する研究—

日本薬局方における生薬について、その『味』は、適否の判定基準の一つである。しかし、『味』の表現は非常に曖昧であり、単一の描写をすることは困難である。本研究では、医薬品の監視等の観点から漢方処方の味を規格化することを目的として、近年開発され、食品分野での品質評価に用いられ始めている味認識装置を用いて、漢方処方の味について一定の数値に基づいた規格化が可能であるか検討を行った。その結果、ヒトによる味覚試験では、例えば、『甘い』、『やや甘い』などといった曖昧な表現をされている味に関して、味認識装置を用いた測定によって味の違いを数値で表現することが可能であることが示された。このことから、漢方処方について客観性のある味の測定が可能であると考えられた。

協力研究者
安食菜穂子　国立医薬品食品衛生研究所　生薬部
川原　信夫　国立医薬品食品衛生研究所　生薬部室長
水上　元　名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野　教授

A. 研究目的

現行の日本薬局方において、収載される医薬品の適否は、その医薬品各条の規定、通則、生薬総則、製剤総則及び一般試験法の規定によって判定される。各条において性状の項に記載されるにおい及び味の記載は参考に供したもので、適否の判定基準を示すものではないとされているが、そこには「ただし、生薬を除く」との記載があり、天然物を起源とする生薬は、日本薬局方の各条において性状の項に記載される「味」が適否の判定基準のひとつであることが示されている。従って生薬や生薬より調製される漢方処方における味の表現は、化学的合成医薬品と比べてより重要と考えられる。一方、味には客観的な基準が無く、試験者の感覚に基づいてこれまで表現されてきており、客観性のある評価基準の設定が重要であると考えられる。

本研究では、医薬品の監視等の観点から漢方処方の味を規格化することを目的として、近年開発され、食品分野での品質評価に用いられ始めている味認識装置を用いて、漢方処方の味について一定の数値に基づいた規格化が可能であるか検討を行った。

B. 研究方法

(1) 漢方方剤

以下の5種類の漢方方剤エキスについて日本漢方生薬製剤協会より御恵与頂いた。検体数はそれぞれ、葛根湯 (9 社分)、小柴胡湯 (9 社分)、小青竜湯 (9 社分)、六君子湯 (8 社分)、苓桂朮甘湯 (8 社分) である。

(2) 味認識装置

味認識装置 SA402B（株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー）を用いて各処方エキス製剤について味の測定を行った。

(3) 味覚試験

ヒトによる味覚試験は、本研究室の研究員 5 名によって行い、従来の局方における味の表現に基づいて味の表現を決定した。

C. 研究結果

味認識装置を用いた測定によって得られた各処方の味の違いを Fig. 1 に示す。味を酸味（Fig. 1(A)）、旨味（Fig. 1(B)）、苦味（Fig. 1(C)）、渋味（Fig. 1(D)）、甘味（Fig. 1(E)）の五つの味の要素に分け、それぞれの味の強度をグラフの縦軸に示した。

また、本実験に用いた各方剤エキスについてのヒトによる味の判定結果を Table 1 に示す。

各方剤について、味認識装置を用いた試験による『酸味』の平均値は −3.395 ~ 6.289 (Fig. 1(A)) で、葛根湯と小青竜湯がプラスの値を示し、小柴胡湯、六君子湯及び苓桂朮甘湯はマイナスの値を示した。味認識装置認識装置では、葛根湯の値が一番高かったが、ヒトによる味覚試験では、葛根湯には『酸味』が感じられるという結果は得られなかった。

味認識装置を用いた試験による『旨味』の平均値は 2.761 ~ 8.363 (Fig. 1(B)) で、5 処方すべてプラス値であったが、ヒトによる味覚試験では『旨味』は全く感知されなかった。

味認識装置を用いた試験による『苦味』の平均値は 4.280 ~ 10.801 (Fig. 1(C)) で、5 処方すべてプラス値であったが、ヒトによる味覚試験で『苦味』が感知されたのは葛根湯と六君子湯および苓桂朮甘湯の 3 処方で，小柴胡湯と小青竜湯では感知されなかった。

味認識装置を用いた試験による『渋味』の平均値は 0.814 ~ 2.386 (Fig. 1(D)) で、5 処方すべてプラス値であったが、ヒトによる味覚試験で『渋味』が感知されたのは小柴胡湯のみであった。

味認識装置を用いた試験による『甘味』の平均値は −2.824 ~ 5.865 (Fig. 1(E)) で、小青竜湯のみがマイナス値を示したが、その他の 4 処方はプラス値であり、それらはすべて、ヒトによる味覚試験でも『甘味』が感知された。

味認識装置によって測定されたこれら 5 つの味の要素それぞれの平均値をとったレーダーチャートを Fig. 2 に示す。

D. 考察

今回検討した 5 種類の処方（葛根湯、小柴胡湯、小青竜湯、六君子湯、苓桂朮甘湯）に関し、味認識装置を用いた測定によって各味について得られた「味の違いを表す数値」には多数の各処方間で有意差が認められた (Fig. 1)。小柴胡湯と苓桂朮甘湯は、それぞれの構成生薬が大きく異なるにも関わらず、ほぼ同一の味のパターンを示したが、『渋味』の部分で有意な差が認められた (Fig. 1, 2)。今回用いた 5 種類の処方すべてについて、一定の味の傾向が見られ、処方間の味の違いが有意な差を持って認められるため、本装置を用いることによって、処方について統一的な表現をすることが可能であると共に、客観性のある味の測定が可能であると考えられる。

ヒトによる味覚試験においては (Table. 1)、小青竜湯を除き、『酸味』を表現した人はいなかった。他方、味認識装置による測定では、小青竜湯に加えて葛根湯で有意に『酸味』が示されている。葛根湯と小青竜湯は、ヒトでは『辛味』が感じられている。『辛味』は、味細胞で感じる味ではなく、辛味物質であるカプサイシンに応答する受容体は 42 ℃以上の高温を感知するタンパク質であることがわかっている。葛根湯の場合、ヒトではこの『辛味』で『酸味』がマスクされたものと考えると合理的に説明できる。

ヒトによる味覚試験では、『旨味』を表現した人がいなかった。これは、これまで生薬や漢方処方に関して『旨味』を考えるという概念が無かったためと推察される。

味認識装置による測定では 5 処方すべてが『苦味』でプラスの値を示した。他方、ヒトによる味覚試験では、小柴胡湯と小青竜湯において、『苦味』は表現されていない。味認識装置による測定では、小柴胡湯は他の 4 種類の処方と比較して『渋味』が特に強い。従って、ヒトでは『苦味』が強い『渋味』にマスクされ、『渋味』だけを感じ、表現したと考えると合理的に説明できる。また、小青竜湯の『苦味』は比較的弱い一方、『辛味』や『酸味』が強いため、同様に『苦味』がマスクされたものと考えられる。

『渋味』では、味認識装置による測定で 5 処方すべてがプラスの値を示した。他方，味認識装置による測定で一番強く『渋味』が出た小柴胡湯でのみ、ヒトによる味覚試験で『渋味』が表現された。これは、『苦味』や『酸味』など他の味にマスクされて、ヒトでは『渋味』を強く感じられなかったためと考えられる。

『甘味』に関しては、味認識装置による測定とヒトによる味覚試験の結果が全て一致していたことから、ヒトは『甘味』に対しては非常に敏感であると考えられる。

小柴胡湯と苓桂朮甘湯は、それぞれの構成生薬が大きく異なる。しかし、『渋味』の部分で有意な差が認められる以外、味認識装置による測定ではほぼ同一の味のパターンを示した (Fig. 2)。一方、ヒトによる味覚試験では、小柴胡湯はまず『渋味』を感じ、その後でわずかに『甘味』を感じており、苓桂朮甘湯では、まず『甘味』を感じ、その後で『苦味』を感じている (Table. 1)。味認識装置を用いた測定においても、小柴胡湯の方が苓桂朮甘湯よりも『渋味』が強く、わずかではあるが苓桂朮甘湯の方が小柴胡湯に比べ『甘味』が強く測定されていたことから (Fig. 1)、ヒトによる味覚認識と味認識装置による味認識に相関性があると判断できる。

E．結論

ヒトでの表現には強い味に他の味がマスクされる傾向がある一方、味認識装置では 5 種の味について確実に規格化することが可能であるものと考えられた。特に、ヒトによる味覚試験では、同一処方であっても各社毎に味の差があり、味を平均化して表現することが難しい場合がある。他方、味認識装置で測定すると味がデジタル化されて表現されるため、容易に平均化することが出来、各処方について統一化された味を客観的に表現できる点で優れているものと考えられる。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

1．論文発表

1）安食菜穂子、川原信夫、合田幸広：味認識装置による漢方処方の味の評価に関する研究（第 1 報）*Natural Medicine*, submitted

2．学会発表

1）安食菜穂子、川原信夫、合田幸広：漢方処方の味覚評価に関する研究（1）日本生薬学会第 51 年会（2004 年 9 月 9-10 日、神戸）

2）安食菜穂子、川原信夫、合田幸広：漢方処方の味認識に関する研究（第 2 報）：日本薬学会第 125 年会（2005 年 3 月 29-31 日、東京）

H. 知的所有権の取得状況

1．取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

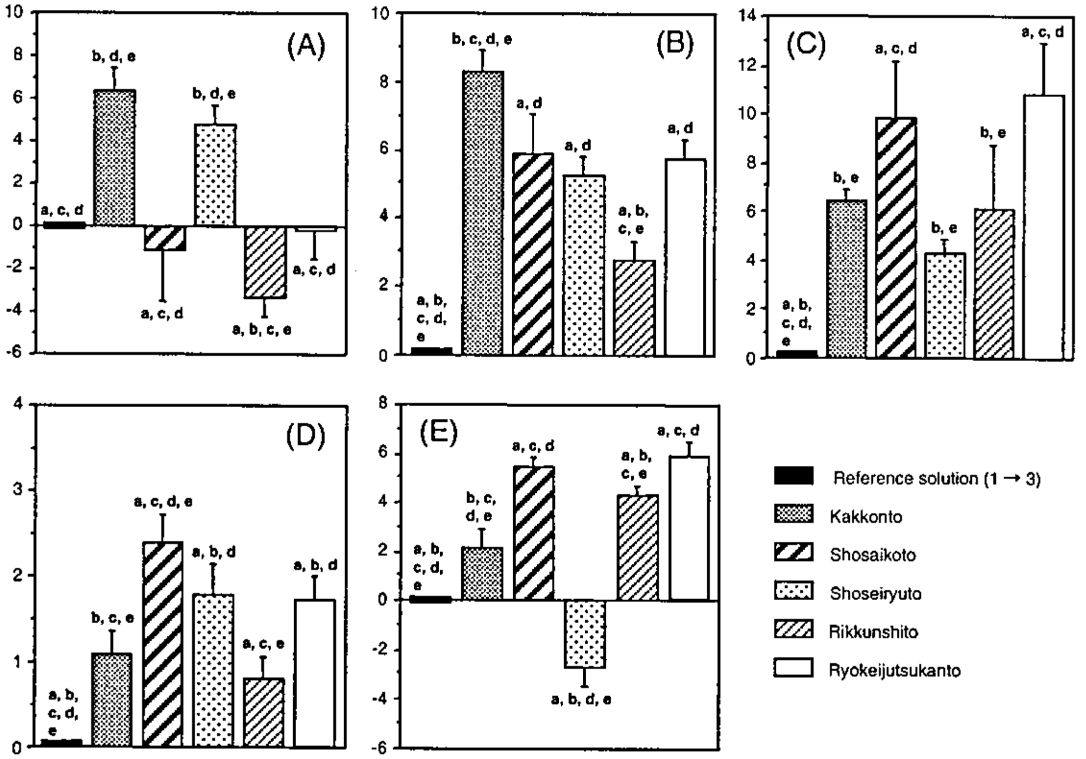


Fig. 1 Taste Difference among Kampo Formulae
The data were obtained by the taste-sensing system. The bar graphs in (A) ~ (D) show sourness (A), umami (B), bitterness (C), astringency(D), sweetness (E), respectively. Each bar represents the mean (±S.D., n = 8 - 9) taste difference. "a" Significantly differential from Kakkonto, $P < 0.0001$. "b" Significantly differential from Shosaikoto, $P < 0.0001$. "c" Significantly differential from Shoseiryuto, $P < 0.0001$. "d" Significantly differential from Rikkunshito, $P < 0.0001$. "e" Significantly differential from Ryokeijutsukanto, $P < 0.0001$, tested by Bonferoni/Dunn.

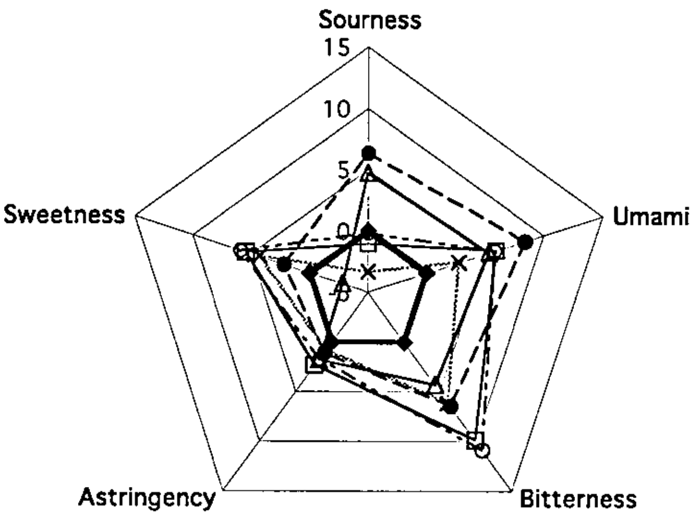


Fig. 2 Taste Patterns of Kampo Formulae
The data were obtained by the taste-sensing system. (—◆—: Tree times diluted reference solution, - -●- -: Kakkonto, —△—: Shoseiryuto, ·····×·····: Rikkunshito, —·○—·: Ryokeijutsukanto, —□—: Shosaikoto)