

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭 金正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭 金正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 ……	271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 ……	281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 ……	288
第4分野			
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 ……	307
KH41038	ポツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 ……	315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 ……	319
第5分野			
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 ……	327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 ……	336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 ……	342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 ……	387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 ……	395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス
に関する研究

生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
研究者 合田 幸広

研究要旨 シゴカ、朮類生薬、人参類生薬、延命草に関しジェノタイピング技術を利用した基原鑑定法について検討した。また、漢方処方中の生薬の確認試験並びにプシ、トウニン、キョウニン等の定量分析法を検討した。前者は、特に朮類生薬で、局方純度試験、確認試験に有効な手法を確立し、検証段階に入っている。後者は、15局処方中の試験法として利用される。

分担研究者

- (1) (株) ツムラ生薬・資源研究所所長 寺林 進
- (2) 三栄源エフ・エフ・アイ (株) 品質保証部検査課マネージャー 荒川史博
- (3) (株) 栃本天海堂品質管理部部長 山本 豊
- (4) (株) ウチダ和漢薬研究開発部部長 藤田正雄
- (5) 名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学研究室教授 水上 元
- (6) 富山医科薬科大学和漢薬研究所資源開発研究部門生薬資源科学分野教授 小松かつ子
- (7) (株) ツムラ生産本部静岡工場部長 山本藤輔
- (8) 小太郎漢方製薬 (株) 研究所課長 近藤誠三
- (9) カネボウ (株) 漢方ヘルスケア研究所 部長 山本恵一
- (10) ジェーピーエス製薬 (株) 栃木工場製品開発部 田村 真

A. 研究目的

生薬は、まず基原植物をもって適否の判定がなされる。基原植物の鑑定は、経験者の特殊な技能である五感による官能試験や鏡検による形態学的試験による場合が多く、熟練するのに長い期間が必要となる。経験によらない方法として、化学的な分析法が存在するが、分析対象になる二次代謝産物は、種々の環境要因により一定の範囲で変異する形質であり、環境によって示す様々な変異範囲を規定しなくてははいけない。他方、植物の遺伝子塩基配列の違いを識別するジェノタイピング技術により、基原植物を規定すれば、遺伝子型そのものを観察することになり、種の規定に曖昧さを排除できることになる。この様な背景の下、本課題では、まず生薬について、ジェノタイピング技術による品質保証法の確立を目的として研究を遂行する。さらに、医療の現場では、生薬のほとんどは漢方処方の形態で使用されることから、漢方処方の品質保証法として、化学的な分析法の確立をめざす。レギュラトリーサイエンスとしての

本研究は、生薬、漢方処方の規格設定にかかる問題を良く知る国立研究機関の研究者と、形態学的に植物鑑定が終了した生薬の供給ができ、さらに現場サイドで手法のバリデーション等の検討が可能な企業、並びに、先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者の共同で行われることで、最も効果的に行われると考えられ、本研究の成果より精度の高い品質保証が可能となる。また、本研究の班員の多くは、薬局方調査会の委員であり、本研究の成果を日本薬局方に反映させることで、アウトカムの明確な研究となり得るものとする。

B. 研究方法

B.1. 試料の入手

種の明確な標準植物試料は、各大学機関及びメーカーの標本を使用した。また生薬は、おもに中国市場でその生薬名で取り扱われているものについて、分担研究者の所属する複数の会社を通し、なるべく多くの産地から入手を試みた。これらの生薬は、それぞれ、日本薬局方に従い性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、希エタノールエキス、精油含量等について調べ、生薬の適、不適を判定した。

漢方処方は、日本漢方生薬製剤協会を通じて、日本で使用されている医療用漢方処方エキスについて広く入手した。

<生薬の科学的品質保証に関する研究>

B.2. シゴカ

1) UPLC/MS 分析

昨年度 ITS 配列解析を行ったシゴカ市場品、22 品目、34 検体の内、全形生薬、16 品目、28 検体を実験材料とした。

試料、各 50 mg を粉碎し、50% MeOH 2 mL を加え、15 分間、振とう抽出した後、遠心 (1000 g x 5 min) 上清をフィルターろ過し、試料溶液とした。定量分析は、装置に ACQUITY UPLC/LCT Premier (Waters) を、カラムに ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1

x 100 mm, 1.7 μ m; Waters) を用い、移動相は、 H_2O/CH_3CN を、90/10 (0 min) - 80/20 (4 min) - 10/90 (6-11 min) - 90/10 (13-20 min) のグラジエント条件で、流速 0.4 mL/min で用いた。MS 測定におけるイオン化は、ESI のポジティブモードで行い、キャピラリー電圧 3 kV、イオンソースおよび脱溶媒ガス温度が、それぞれ 100、350°C、脱溶媒ガスおよびコーンガスの流速は、それぞれ 600、50 L/h、コーンガス電圧は 50 V とした。精密質量測定のための参照物質には、leucine-enkephalin を用いた。各指標成分 (Eleutherosides B, E and Isofraxidin) の同定は、標品との保持時間の比較及び疑似分子イオンピークの確認により行い、定量は、各疑似分子イオン値のマスクロマトグラムのピーク面積を用いた絶対検量線法により行った。

2) LC/PDA 分析

実験材料に、*E. senticosus* 2 検体 (吉林省産と黒竜江省産)、*E. sessiliflorus* 3 検体 (吉林省産 2、黒竜江省産 1)、シゴカ市場品 1 検体 (黒竜江省産で ITS 配列が type 1) の通常根茎を用いた。

各検体の粉末 50 mg に 50% MeOH を 2 mL 加えて 15 分間振とう抽出した後、5 分間遠心分離し、上澄み液を分取、Millipore filter で濾過して試料溶液とした。

HPLC 分析条件: 装置は SHIMADZU SCL-10AVP を用い、カラムは Waters XTerra phenyl (4.6 \times 150 mm) を用いた。カラム温度は 40°C、移動相は CH_3CN : 20 mM Phosphate buffer (pH 4) [8/92 (0 min) - 13/87 (5 min) - 30/70 (39 min)] のグラジエント溶出。試料の注入量は 10 mL、流速は 0.8 mL/min、検出波長は Eleutheroside E: 207 nm、Eleutheroside B: 264 nm、Isofraxidin: 340 nm で測定した。3 成分のピークの同定は、保持時間及び UV スペクトルを標品と比較して行った。定量は絶対検量線法によった。

3) 葉緑体 DNA, *trnK* 遺伝子領域の配列解析

実験材料に、*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. エゾウコギ 11 検体 [中国吉林省産 4、黒竜江省産 1、ロシアサハリン産 1、日本産 3; シゴカ市場品で ITS 領域が type 1 のもの 2 検体 (SIG-031110-3, SIG-Toc-007)]、*E. sessiliflorus* (Rupr. et Maxim.) Seem. マンシュウウコギ 8 検体 [吉林省産 3、黒竜江省産 1、カナダ産 1、日本産 1; シゴカ市場品で ITS 配列が type 2 のもの 2 検体 (Ez-031110-3, SIG-Toc-004a)]、その他日本産の同属植物 3 種及びシゴカ市場品で ITS 配列が type 3 のもの (SIG-Toc-005-a) 各 1 検体を用いた。

植物材料の乾燥葉または生薬から全 DNA を抽出し、これを鋳型にして PCR 法で、*trnK* 遺伝子領域を 2 または 3 部分に分けて増幅した。反応条件は、ホットスタート 95°C 5 分、続いて熱変性 95°C 30 秒、アニーリング 50°C 50 秒、伸長反応 72°C 1 分 30 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 72°C 20 分で終了した。得られた PCR 産物を精製後、塩基配列を決定した。

B. 3. 人參類生薬

葉緑体 *matK* 遺伝子のうち、5' 側の約 600 bp の領域について、アジア産 *Panax* 属 13 分類群の塩基配列を比較した結果、9 箇所 (上流から 865、917、1117、1118、1127、1157、1186、1367、1380 番目) の塩基置換を検出することにより、各分類群は 5 グループに分けられ、さらに 6 分類群が同定できることがわかった。そこで、これら 9 箇所の塩基置換を検出できる、長さの異なるプライマーを 8 種類設計した。その内 7 種類のプライマーには T_m 値に差がでないように、非相同性の polyA tail を付けた。*Panax* 属植物から全 DNA を抽出し、これを鋳型にしてプライマーセット *matK* AF - *matK* 4R を用いて PCR 法で *matK* 遺伝子の部分領域 (630 bp) を増幅した。この PCR 産物を鋳型にして、先に合成した 8 種類のプライマーについて、蛍光色素でラベルした ddNTP を用いて一塩基伸長反応を行い、反応物の蛍光を ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer で解析した。

B. 4. 朮類生薬

実験材料としては、本研究課題の分担研究者によって中国市場から入手された生薬 (蒼朮 25 検体、白朮 15 検体) を用いた。

生薬からの DNA 調製は、生薬試料を粉末したものの約 50 mg を取り、EDTA を含む PBS 溶液で洗浄した後、文献既報の SDS-Lysis buffer を用いる方法を一部改変して行った。

寺林らのデータから *Atractylodes* 属植物の鑑別に十分な情報を含むと考えられる ITS1 領域の 5' -側約 150 bp の領域を PCR で増幅し、ExoSap IT (Amersham) を用いて残存する PCR プライマーと dNTP を分解・除去した後、その全量を用いて両鎖についてシーケンシング反応を行った。また、必要に応じて ITS1 および ITS2 の全領域についても同様に塩基配列を解読した。

PCR 産物の増幅の有無からの鑑別を行う場合には、PCR には AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) を用い、hot-start でかつプライマーのアニールと伸長反応を同一の温度で行う 2 段階 PCR 法を用いた。

B. 5. 延命草

延命草市場品 (Ra-1, 2) 及びヒキオコシ類標

準試料 (Ra-3-7) として 7 検体を用いた。

1) 核 rDNA, ITS 領域の配列解析

各検体、約 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて凍結粉碎し、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、植物の rDNA に保存性の高い領域に設計した各プライマー対を用いて、PCR を行うことにより、核 rDNA の ITS 領域 (約 600 bp) を増幅した。ただし、市場品 2 種については、nested PCR を用いた。Microcon-PCR (Millipore) 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、ダイレクトシーケンシングへと供した。Cycle sequencing 反応には、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。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。

2) LC/MS 分析

試料 1 g に対し、50 mL のエタノールで室温下、攪拌しながら 24 時間抽出し、抽出液をろ過後、ろ液を減圧下、留去した。残留物をエタノールで再溶解し、10 倍濃縮した抽出液を LC/MS 用試験溶液とした。LC/MS 分析は、装置に Waters 社の FractionLynx MS auto purification system (1525 ポンプ, 2767 サンプルマネージャ, カラム・流路オーガナイザ, ZQ マス検出器, 2996 PDA 検出器) を、カラムに YMC-J' sphere-ODS-H80 (4.6 x 250 mm; YMC) を用い、移動相は、40% MeOH (0 min)-100% MeOH (30 min) のグラジエント条件で流速 1.0 mL/min で用いた。上記試料溶液 5.0 mL を注入し、溶出液は、スプリッターにより 4:1 の比に分け、それぞれ PDA 及び MS 検出器へ導入した。MS 測定におけるイオン化は、ESI のポジティブモードで行い、キャピラリー電圧 4 kV、イオンソースおよび脱溶媒ガス温度が、それぞれ 120、350°C、脱溶媒ガスおよびコーンガスの流速は、それぞれ 350、50 L/h、コーンガス電圧は 40 V とした。

<漢方処方薬の科学的品質保証に関する研究>

B. 6. トウヒ及びキジツ配合処方の指標成分についての検討

トウヒ、キジツ配合処方 (大柴胡湯、排膿散及湯、五積散、茯苓飲、通導散、大承気湯、麻子仁丸) におけるこれらの生薬の指標成分として、hesperidin と同様のフラボノン配糖体である naringin を選定し、naringin の HPLC による diastereomer の分離条件を検討した。naringin

及び同じく含有成分である neohesperidin の diastereomer 混合物は、naringin、neohesperidin と表記された市販の試薬を用いた。また、別にトウヒ 9 検体、キジツ (キコク) 15 検体を使用した。

B. 7. 牛車腎気丸エキスの確認試験

牛車腎気丸は「ジオウ」「サンシュユ」「サンヤク」「タクシャ」「ブクリョウ」「ボタンピ」「ケイヒ」「ブシ」「ゴシツ」及び「シャゼンシ」の配合された処方である。上記の配合生薬中、日本薬局方において TLC 法による確認試験が設定されている場合にはその指標成分を、また論文等により報告されている場合には、その成分を中心に TLC による確認試験法の検討を行った。

B. 8. ブシ含有処方エキス (八味地黄丸、真武湯、牛車腎気丸の各エキス) におけるジエステル型シアルカロイドの純度試験

「ブシ」の純度試験を参考として検討した。

B. 9. 桂枝茯苓丸エキスのアミグダリン定量法

漢方処方エキスの場合、熱水抽出の工程を経ており、酵素が失活するため酵素分解反応について考慮しなくて良いが、他方ベンジル位のラセミ化が生じ S 体のネオアミグダリンとの混合物となる。アミグダリンとネオアミグダリンは、酸加水分解により同じようにシアンとベンズアルデヒド、グルコースを生じるため、毒性的な差はないものと考えられる。従って、今回の検討では配糖体のラセミ化によるジアステレオマーを区別しない HPLC 法について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究には、ヒト由来の試料並びに動物は用いておらず、倫理上、特に問題となる事象はないと考える。

C. 研究結果

<生薬の科学的品質保証に関する研究>

C. 1. シゴカ

1) UPLC/MS 分析

Eleutheroside B 及び Isofraxidin の含量は、各検体により大きなバラツキが認められた他、検出限界以下のものも 10-11 検体あった。一方、Eleutheroside E は、少数の例外 (SIG-2, SIG-Toc-006-b) を除き、ほぼ全ての検体で検出され、その含量も 0.05% 前後のまとまった値を示した。

2) LC/PDA 分析

E. senticosus と同定された 2 検体及び 1 市場品における Eleutheroside B 及び Eleutheroside E の含量はそれぞれ 0.06% 以上であり、また 1 市場品では Isofraxidin を 0.05%

含有していた。一方、*E. sessiliflorus* と同定された 3 検体では 3 成分それぞれの含量が検出限界以下または極微量であり、1 検体のみ Eleutheroside E を 0.03%含有していた。

3) *trnK* 遺伝子領域の配列解析

Eleutherococcus 属 5 種の *trnK* 遺伝子の塩基配列は長さ 2563 bp または 2576 bp で、その内 *matK* 遺伝子領域は 1518 bp であった。*E. senticosus* の 11 検体には 10 箇所の塩基置換と 1 箇所の挿入/欠失が認められ、種内多型を示した。中国採集品には 3 タイプが認められたが、日本採集品（北海道野生品）は相同の配列で上流から 2352 番目に 13 塩基の挿入があった。サハリン採集品は塩基置換数が他の検体より多かった。ITS 領域の配列が type 1 であることにより *E. senticosus* と同定されている 2 市場品は、サハリン採集品と同様に 1472 番目及び 1555 番目が thymine であったが、それぞれの産地とされる黒竜江省または北海道採集品に配列が一致するものはなかった。一方 *E. sessiliflorus* の 8 検体においては、*trnK* 遺伝子の塩基配列は種内で安定しており、2136 番目の塩基が異なる 2 タイプが認められたのみであった。ITS 領域の配列が type 2 であった 2 市場品もそれぞれこの 2 タイプに一致し、ITS 領域の解析結果に *trnK* 遺伝子の解析結果を加えることにより、*E. sessiliflorus* であると同定できた。日本産の *E. sieboldianus* ヒメウコギは *E. sessiliflorus* の 1 タイプとほぼ同様の塩基配列で、382 番目に 1 塩基置換が認められたのみであった。日本産の *E. trichodon* ミヤマウコギと *E. spinosus* ヤマウコギはそれぞれ固有の塩基配列を示し、*E. senticosus* の吉林省採集品 (SEC1) とそれぞれ 6 塩基または 10 塩基の置換が認められた。*Eleutherococcus* 属 5 種 22 検体の *trnK* 遺伝子の塩基配列に基づき、*Panax ginseng* を Out group として最節約法で系統樹を構築した結果、*E. senticosus* の各検体、*E. sessiliflorus* と *E. sieboldianus*、*E. trichodon* と *E. spinosus* がそれぞれクレードを形成し、また *E. trichodon* と *E. spinosus* は *E. senticosus* と近縁であることが示された。なお、ITS 領域の解析により type 3 (*Aralia elata* var. *mandshurica* の配列と 2 塩基異なる) とされた市場品の *trnK* 遺伝子の塩基配列は長さ 2563 bp、*E. senticosus* (SEC1) と 24 塩基の置換が認められ、*Eleutherococcus* 属のものとは明らかに異なっていた。

C. 2. 人参類生薬

Panax 属 13 分類群のエレクトロフェログラムでは、プライマーの長さ (17、28、35、41、46、

51、56、62 mer) に対応した位置に、4 種類の蛍光を有した 8 本または 7 本のピークが検出された。グループ 1 に属する 4 種では 1、3、4、5、6、8 番目に ddAMP (A と表示)、A、C、A、C、T のピークが認められ、さらに *P. quinquefolius* では 2 番目が A、*P. notoginseng* では 7 番目が C のピークであった。グループ 2 に属する 3 分類群では 3 番目のピークが検出されず、さらに 1 番目と 8 番目が *P. vietnamensis* では G と T、*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* では A と T、*P. zingiberensis* では A と C のピークであった。グループ 3 と 4 の 5 分類群では 3、5、7 番目に G、G、C のピークが認められ、さらにグループ 3 では 4 番目に A、その中でも *P. japonicus* var. *angustifolius* では 6 番目に T のピークが認められた。グループ 5 に属する 2 種では 4 番目に A のピークが認められる他は、グループ 1 の *P. ginseng* 及び *P. japonicus* (Japan) と同様であった。

C. 3. 朮類生薬

生薬からの DNA の調製は、当初は Qiagen の DNeasy Plant Mini Kit を用いていたが、生薬によっては調製した DNA を鋳型として PCR 産物を得られない場合があった。そこで、生薬の外皮を除去した後に粉末とすること、調製操作に入る前に粉末を EDTA を含む PBS で洗浄すること、DNA 調製には SDS-Lysis buffer を用いること、isopropanol 沈殿ではなく、silica matrix を用いて DNA を精製することなどの改良法を用いた。

また、PCR 産物のシーケンスでは、産物を電気泳動ゲルから切り出したり、種々のカラムクロマトグラフィーによって精製してから使用されることが多い。この操作はやや煩雑であるので、PCR 溶液を反応後 exonuclease と alkaline phosphatase の混合液で処理して PCR primer と dNTP を除去し、さらにこの反応液をそのままシーケンス反応に用いる方法を確立した。この方法では、25 mL スケールの PCR 反応を 1 回行うことによって、反応産物の確認と両鎖のシーケンスが可能である。

まず最初に中国市場で白朮として流通している生薬 11 検体から調製した DNA を鋳型として、PCR によって ITS1 領域を増幅し、その塩基配列を解読した。

白朮 11 検体のうち、ITS1 領域の塩基配列から 6 検体はオオバナオケラを基原とするいわゆる唐白朮、5 検体はオケラを基原とするいわゆる和白朮であると同定された。これらの同定結果は、形態学的な性状による鑑別結果ともよく一致していた。また、各生薬のエチルアルコール抽出物の TLC

パターンも白朮に典型的なパターンを示した。この結果は、中国市場で流通している白朮には基原的な問題はないことを示している。

次に、中国市場で蒼朮として流通している 25 検体について検討したところ、16 検体はシナオケラを基原とする蒼朮、1 検体はホソバオケラを基原とする蒼朮であった。残りのうち 5 検体はオケラを基原とする白朮が蒼朮として市場に流通しているものであった。また、ホソバオケラとシナオケラの交雑個体に由来すると判断される生薬が 3 検体も存在していた。これまで市場に流通している朮類生薬には交雑個体に由来するものが存在することが推定されていたが、今回の結果はこれまでの推定を遺伝子レベルで裏付けるものである。

市場品蒼朮の ITS1 による鑑定結果と、形態学的性状およびアトラクチロンの呈色反応による純度試験の結果を比較した。DNA 鑑別によって白朮と判定された 5 検体のうち 2 検体は形態学的にも純度試験でも日本薬局方に規定された蒼朮として適合していると判定され、これらの試験では蒼朮としてそのまま流通してしまう可能性があることが明らかになった。また、シナオケラとホソバオケラの交雑個体由来の生薬は、形態・純度試験とも日本薬局方の蒼朮の規格に適合していた。つぎに、各生薬の精油成分の組成を薄層クロマトグラフィーによって比較してみたところ、形態および純度試験では白朮であると判定できなかった 2 検体のうち 1 検体は蒼朮と非常によく似た TLC パターンを示し、この方法でも白朮であると判断することはできなかった。すなわち、この生薬は DNA 鑑別以外では白朮であると判断できないことが明らかになった。以上のことは、朮の鑑別・同定には遺伝子鑑別が非常に有効性の高い方法であることを示している。

塩基配列の解読を行うことは時間的にもコスト的にも負担が大きいため、塩基配列の解読操作なしに簡便に実施できる DNA 鑑別法の開発を試みた。

朮類生薬の 4 種の基原植物の特定のものからのみ増幅産物が得られるように 4 組のプライマーセットを設計した。それぞれの生薬から調製した DNA を鋳型として、4 通りの PCR を行い、その増幅産物を電気泳動によって検出した。4 組のプライマーセットについての増幅産物の有無から、生薬の基原植物を同定できることを示した。すなわち、この方法を用いることにより、塩基配列の解読を行わなくても、PCR 産物の電気泳動バンドパターンから、蒼朮と白朮の区別だけでなく、その基原植物の同定まで簡便に実施することが可能になった。

C.4. 延命草

1) 核 rDNA, ITS 領域の配列解析

DNA 配列解析の結果、ITS2 領域には、8 及び 9 塩基のグアニンの連続する配列が存在し、これら 2 つの配列の混合物として観察されるものが認められた。このような場合、ダイレクトシーケンスでは、該当箇所以降の配列の解析が困難である。このため、ITS1 領域のもののみについて解析を行った。標品 5 種の配列は、ヒキオコシ及びクロバナヒキオコシの配列にそれぞれ区別され、種内変異は認められなかった。両者は、ITS1 領域 (283 bp) において、9 塩基の違いを示し、明確な区別が可能であった。延命草市場品のうち、Ra-2 は、クロバナヒキオコシの配列と完全に一致した。Ra-2 は、新潟産であり、クロバナヒキオコシの分布域とも一致する。一方、Ra-1 は、複数の配列の混ざりであり、サブクローニングの結果、3 種のクローンが得られたが、ヒキオコシ及びクロバナヒキオコシ、いずれの配列とも一致しなかった。また、これらのクローンと相同性の高い配列は、国際塩基配列データベース (DDBJ, EMBL, GenBank) にも登録がなかった。

2) LC/MS 分析

LC/MS 分析の結果は、enmein を主成分とするもの (Ra-4, 7)、oridonin を主成分とするもの (Ra-2, 5) 及びその中間型 (Ra-3, 6) に分かれたが、ITS 領域の genotype との明確な相関は見られなかった。一方、Ra-1 は上記の試料とは全く異なるパターンを示し、ericalyxin B が主成分として認められた。

<漢方処方の科学的品質保証に関する研究>

C.5. トウヒ及びキジツ配合処方の指標成分についての検討

HPLC を利用し、naringin の分離条件を検討した。その結果、CHIRALPAK IA カラムを用いた場合、2 位での diastereomer 混合物は、完全には分離しなかった。他方、CHIRALPAK OD-H カラムを用いたところ、両者は、完全に分離した。また同条件で、neohesperidin の diastereomer 混合物も、良好に分離した。しかしトウヒ、キジツのメタノール抽出エキスを用いて HPLC による分離条件の検討を行ったところ、他成分と完全に分離しなかった。次に CHIRALPAK IB カラムを用いて検討を行ったところ、naringin、neohesperidin 及びトウヒ、キジツにおいて良好な分離ピークが得られた。次に、各市販試薬について相対純度を検討したところ、naringin (2S 体) 29-89%、neohesperidin (2S 体) 84% であり、試薬でも、diastereomer 混合物であることが明らかとなった。また、トウヒ 9 検体の diastereomer の相対比は、naringin (2S 体)

61-64%が4検体、54-59%が5検体、キジツ（キコク）15検体中の diastereomer の相対比は、naringin (2S体) 93%が1検体、84-88%が6検体、74-79%が8検体であった。さらに、キジツ配合処方中の diastereomer の分離条件を検討した結果、大柴胡湯、排膿散及湯、五積散、茯苓飲、通導散において、良好な分離ピークが得られることが判明した。他方、大承気湯、麻子仁丸に関しては完全に分離しなかった。

C. 6. 牛車腎気丸エキスの確認試験

局方上個別の生薬で TLC の確認試験法が示されているもののうち、「サンシュユ」、「ボタンビ」、「ブシ」については、それぞれ個別の生薬の確認試験と同様、それぞれロガニン、ペオノール、ベンゾイルメサコニンを確認する手法を確立した。「ケイヒ」においては、生薬の指標成分であるケイアルデヒドの含量が少なく妨害成分との分離が困難であったので、2-メトキシシンナムアルデヒドを確認する方法を確立した。

「ジオウ」は現行の局方で TLC 法による確認試験が設定されていない。そこで文献等で報告されているスタキオース（熟ジオウも考慮しマンニノトリオースも含め）を目標として検討を行い、スタキオースとマンニノトリオースの混合スポットを検出する系を確立した。

「タクシャ」、「ゴシツ」も現行の局方で TLC 法による確認試験が設定されていない。そこで、文献等を参考に検討を行い、それぞれアリソール A 及びフィトエクジソン類を指標とする確認試験法を確立した。

「シャゼンシ」も同様に現行の局方で TLC による確認試験法が設定されていない。そこで、文献等で生薬に含まれている事が明らかなゲニポンド酸を指標成分として検討したが、本化合物はエキス中では、ほとんど存在しないことが判明した。そこで、新たに特徴的な成分について検討した結果、酢酸エチル/水/ギ酸混液 (6:1:1) の展開溶媒、希硫酸噴霧後加熱で、Rf 値 0.6 付近に暗緑色のスポットが観測されることが明らかとなった。今後、本スポットの構造解析を行う予定である。また、確認試験用の「シャゼンシ」を試薬として調製することも検討している。

C. 7. ブシ含有処方エキスにおけるジエステル型ブシアルカロイドの純度試験

以下のように確立した。

精製法：試料約 1.0g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、ジエチルエーテル 20mL を加えて振り混ぜた後、0.1mol/L 塩酸試液 3mL を加えて 10 分間振り混ぜ、遠心分離してジエチルエーテル層を取り除く。水層にジエチルエーテル 20mL を加えて同

様に操作し、ジエチルエーテル層を取り除き、得られた水層にアンモニア試液 1mL 及びジエチルエーテル 20mL を加えて 30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物はアンモニア試液 1mL 及びジエチルエーテル 20mL を用いて、更にこの操作を 2 回行う。全抽出液を合わせ、40℃以下で溶媒を減圧留去した後、残留物にブシ用リン酸塩緩衝液/アセトニトリル混液 (1:1) 10mL を正確に加えて溶かし、この液を遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。

HPLC 条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：アコニチン、ヒバコニチン及びメサコニチンは 231nm、ジェサコニチンは 254nm）

カラム：内径 4.6mm、長さ 15cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：ブシ用リン酸塩緩衝液/テトラヒドロフラン混液 (183:17)

流量：1.0mL/min

注入量：40 μ L

C. 8. 桂枝茯苓丸エキスのアミグダリン定量法

以下のように確立した

本品 0.5g を精密に量り、薄めたメタノール (1 \rightarrow 2) 50mL を正確に加えて 15 分間振り混ぜた後、ろ過する。ろ液 5mL を正確に量り、カラムクロマトグラフィー用ポリアミド約 2g を充てんしたカラムに入れ、水で溶出し、正確に 20mL とし、試料溶液とする。別に成分含量測定用アミグダリン約 10mg を精密に量り、薄めたメタノール (1 \rightarrow 2) に溶かして正確に 50mL とする。この液 5mL を正確に量り、水を加えて正確に 20mL とし、標準溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210nm）

カラム：内径 4.6mm、長さ 15cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：45℃付近の一定温度

移動相：0.05mol/L リン酸二水素ナトリウム試液 /メタノール混液 (5:1)

流量：0.8mL/分（アミグダリンの保持時間約 12 分）

システム適合性

システムの性能：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、アミグダリンのピークの理論段数及びシンメトリー係数は、それぞれ 5000 以上、1.5 以下である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、アミグダリン

のピーク面積の相対標準偏差は1.5%以下である

D. 考察

〈生薬の科学的品質保証に関する研究〉

D.1. シゴカ

1) UPLC/MS 分析

昨年度の研究により得られた ITS 塩基配列の genotype と各指標成分の含量には、明確な相関が見られた。すなわち、エゾウコギ標品と同一の配列を示した type 1 では、少数の例外 (SIG-2, SIG-Toc-001-b) を除き、各指標成分が、全て検出可能であった。一方、マンシュウウコギ (*E. sessiliflorus*) 等と同一の配列を示した type 2 では、Eleutheroside E が、type 1 の検体と同程度の量、観測されたものの、Eleutheroside B 及び Isofraxidin は、検出されなかった。また、タラノキの変種の配列に高い相同性を示した type 3 では、各指標成分は、いずれも検出されなかった。以上のことから、Eleutheroside B 及び Isofraxidin の有無が、エゾウコギとその他の近縁植物との区別に有用であると考えられた。また、Gaffney らは、 H_2O/CH_3CN の系でのエゾウコギの HPLC 分析において、Eleutheroside E と同じ保持時間に dihydrodehydrodiconiferyl alcohol monopyranoside が溶出されることを示しているが、今回、マスクロマトグラムにより疑似分子イオンをソートした結果、当該成分は認められなかった。

2) LC/PDA 分析

指標成分含量は、*E. senticosus* と *E. sessiliflorus* の差異が明瞭であった。これまでに抗酸化、抗疲労作用が報告されている Eleutheroside B、抗ストレス、抗疲労、胃潰瘍抑制、PC12h 細胞における NGF 様作用などが報告されている Eleutheroside E、抗うつ作用が報告されている Isofraxidin の含量を比較した結果、*E. senticosus* には Eleutheroside B と Eleutheroside E がそれぞれ 0.06%以上含有されていたが、*E. sessiliflorus* には Eleutheroside B がほとんど検出されず、また Eleutheroside E を含有する検体も 1 検体のみであった。したがって、*E. senticosus* に由来するシゴカが有用であると考えられる。なお、中華人民共和国薬典 (2005) 収載のシゴカには、Eleutheroside B 0.05%以上の限度値が設けられ、一方、USP27 ではダイエタリーサプリメント「Eleuthero」に、Eleutheroside B と Eleutheroside E の合計が 0.08%以上であることが規定されている。これら 2 成分では、Eleutheroside E が Eleutheroside B より薬理作用が強いという報告もあり、シゴカの

品質は Eleutheroside E の含量で規定するのが妥当であると考ええる。

3) *trnK* 遺伝子領域の配列解析

シゴカの正品は *E. senticosus* の根茎 (しばしば根を付ける) であるが、市場品中にはしばしば *E. sessiliflorus* が混入される。今回 2 種を同定するためのマーカーとなる塩基配列を *trnK* 遺伝子領域において検討した。その結果、*E. senticosus* は種内多型を示し、採集品では 5 タイプ (遺伝子型) が認められた。さらに、ITS 領域の解析結果から *E. senticosus* と同定されているシゴカ 2 市場品においては、今回の採集品中に塩基配列が合致するものは認められなかった。同種には種内多型が認められることを考慮すると、本市場品は *E. senticosus* と同定しても問題がないものと考ええる。一方、*E. sessiliflorus* については 2 タイプが認められた。*E. senticosus* については今後さらに検体を増やして *trnK* 遺伝子領域における種内多型を検討する必要があるが、現段階では 9 箇所 (上流から 382、985、1102、1334、1540、1614、1753、1804、2034 番目) の塩基配列において、*E. senticosus* と *E. sessiliflorus* のそれぞれが種内で相同の配列を示し、かつ 2 種の間で違いが認められたことから、これらの箇所の塩基配列が 2 種を区別するマーカー配列になり得るものと考ええる。以上、シゴカは *trnK* 遺伝子の塩基配列を解析することにより、正品である *E. senticosus* が同定でき、さらにその系統まで明らかにできる可能性が示唆された。

D.2. 人參類生薬

Panax 属植物の *matK* 遺伝子の塩基配列に基づいて設計した 8 種類のプライマーを用いて一塩基伸長反応を行うことにより、同属 13 分類群が 5 グループに分けられ、さらに *P. quinquefolius*、*P. notoginseng*、*P. vietnamensis*、*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*、*P. zingiberensis*、*P. japonicus* var. *angustifolius* の 6 分類群が同定できることが明らかになった。今後、18S rRNA 遺伝子領域を含め、両遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを設計し、全分類群を同定できる SNPs 法を開発する予定である。さらに、本法を人參類生薬に適用して、その有用性を検証する予定である。

D.3. 朮類生薬

ITS1 領域の塩基配列に基づく朮類生薬の鑑別プロトコールを開発し、これを中国市場で流通している朮類生薬の基原種鑑別に適用した。その結果、白朮として市場に流通している生薬は、いずれもオケラまたはオオバナオケラを基原とするものであり、基原的な問題はなかった。一方、蒼朮

市場品としてしばしば白朮が流通していることが明らかになった。これらの生薬の中には、現行の形態学的、化学的方法では鑑別の困難なものも存在していた。また、ホソバオケラとシナオケラの交雑個体を基原とする蒼朮が市場に存在していることを示した。

以上の検討により、蒼朮と白朮の鑑別と基原種の同定には ITS1 領域の塩基配列を利用した遺伝子鑑別法が最も信頼できる方法であることが明らかになった。さらに、PCR 法を用いる朮類生薬の簡便な同定法を確立した。この方法を用いることによって蒼朮と白朮の鑑別だけでなく、その基原種の同定までを容易に行うことが可能になった。

今後は、この方法の頑健性を検証し、より確実に普遍性の高い方法へと改良することが求められている。

D. 4. 延命草

DNA 分析の結果から、ヒキオコシ及びクロバナヒキオコシは、それぞれの配列に区別可能であった。ただし、国内には、その他の同属植物として 8 種 7 変種の分布が知られており、これらとの関係は不明である。一方、中国産の延命草 (Ra-1) は、複数の配列の混ざりであることから、雑種であるか、あるいは、複数の種の混合物であると考えられたが、単一個体に由来する茎及び葉より調製した DNA 溶液からも混ざりの配列が得られていることから、雑種基原であると思われる。サブクローニングにより得られた 3 つの配列は、ヒキオコシの配列と 2-5 bp、クロバナヒキオコシの配列と 10-11 bp の違いを示した。このことから、Ra-1 は、ヒキオコシに近い種同士の雑種であると思われる。今回、Ra-1 から検出された *eriocalyxin B* は、京都市内の薬局で購入した *I. japonicus* より *rabdosianone I* として、単離の報告があるが、基原種の同定については、疑わしい。また、同一の化合物が、*eriocalyxin B* の名で、*R. eriocalyx* より最初に単離されている他、*Isodon eriocalyx* var. *laxiflora* から *eriocalyxin B*、*maocrystals A*、*B* の単離の報告がある。*R. eriocalyx* (*I. eriocalyx*) は、中国西部に分布する同属種である。Ra-1 が、中国産である点及び DNA 分析の結果を考え併せると、*R. eriocalyx*、あるいはその近縁種が、Ra-1 の基原種であると推察される。

D. 5. トウヒ及びキジツ配合処方 の指標成分についての検討

本研究の結果、*naringin*、*neohesperidin* は生薬、漢方処方中での定量が可能であることが示された。従って両化合物は指標成分として漢方処方への適用が可能であると考えられる。また、試薬

として市販されているこれらの化合物は、*diastereomer* 混合物であることが明らかとなった。従って、昨年度検討した、*hesperidin* の様に、純度の高い試薬葉の供給体制も含めて検討する必要があるものと考えられる。

D. 6. 牛車腎気丸エキスの確認試験

「サンヤク」及び「ブクリョウ」は、ともにトリテルペン類の存在が報告されているが、いずれも低含量であり、また水への親和性も低く、水製乾燥エキス中へはほとんど移行しない。従って、種々 TLC 条件を検討したが、確認試験法の設定には至らなかった。現在、これらの生薬は、生薬そのものでも TLC による確認試験法が設定されておらず、「シャゼンシ」同様、確認試験用の「生薬」試薬等の準備等も含め、今後検討を要するものと考えられる。

D. 7. ブシ含有処方エキスにおけるジエステル型ブシアルカロイドの純度試験

漢方処方エキスについて、「ブシ」の純度試験に準じた試料調整法について検討したところ、いずれのエキスでも、HPLC 上妨害ピークが出現し、ブシジエステルアルカロイドの定量は困難なことが判明した。そこで、アンモニア性ジエチルエーテルでブシアルカロイドを抽出する前に、塩酸酸性条件下でジエチルエーテル洗浄を行うことを検討した。その結果、ジエチルエーテル洗浄 2 回で、妨害ピークが良好に除去できることが判明した。そこで、ブシジエステルアルカロイドについて添加回収実験を行ったところ、いずれのアルカロイドにおいても 97%以上の回収率となり、良好な結果を得、結果の項に示した、純度試験法を確立した。

D. 8. 桂枝茯苓丸エキスのアミグダリン定量法

HPLC の移動相を 0.05mol/L リン酸二水素ナトリウム試液/メタノール混液 (5:1) とし、カラム温度を 45℃に設定した結果、短い分析時間 (約 12 分) で妨害ピークとの良好な分離が得られことが判明した。しかし、試料エキスについて前処理を行わないと、目的ピーク以降にも引き続き多数のピークが出現することから、ポリアミドカラムでの精製法を検討し、結果の項に記述した方法で良好な結果が得られた。アミグダリンに近接する妨害ピークは、「シャクヤク」及び「ボタンビ」由来のオキシペオニフロリンであると推定されるが、分析の現場では、両者の分離においてはカラム温度、移動相のメタノール含量比率を変更することにより、各種カラムにおいて適切な分離が得られる。従って、システムの性能は理論段数及びシンメトリー係数で規定することとした。今後、室間

再現性について検討を予定している。

E. 結論

〈生薬の科学的品質保証に関する研究〉

今年度の研究により、遺伝子鑑別法が、シゴカ、人参類生薬、朮類生薬、延命草の基原解明に有効な手段となることが明らかになった。さらに、昨年度の本研究において、課題として残っていた生薬からの確実な DNA 調製法についても、朮類生薬の遺伝子鑑別において、解決策が見出された。今後、本鑑別法を検証すると共に、他の生薬についても、同様の鑑別法の作成を進める予定である。

〈漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究〉

今年度の研究により、牛車腎気丸エキスの確認試験はほぼ確立することが出来た。また、漢方処方中のプシアルカロイド並びにアミグダリンの定量分析法についても、大枠は示すことが出来ており、15 局第一追補への収載を目指し、試薬の準備や室間再現性等を検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) Uchiyama, N., Kim, I. H., Kawahara, N., Goda, Y., HPLC separation of hesperidin and the C-2 epimer in commercial hesperidin samples and herbal medicines. *Chirality*, 17, 373-377 (2005).
- 2) Yamamoto, K., Yamamoto, T., Kondo, S., Tamura, M., Shibata, Y., Umeda, K., Akiba, S., Kawakami, T., Saito, F., Sugimoto, T., Isomi, Y., Nakata, T., Takao, M., Nakajima, K., Tawara, M., Hayashi, K., Sudo, M., Nakanishi, K., Isozaki, O., Kawahara, N., Goda, Y., Assay of Ginsenoside Rg1 and Ginsenoside Rb1 in Ginseng and Red Ginseng by High-Performance Liquid Chromatography. *Iyakuhin Kenkyu*, 36, 211-222 (2005).
- 3) Mao Shiba, Kenji Kondo, Eiji Miki, a Hiroki Yamaji, Takashi Morota, Susumu Tera-bayashi, Shuichi Takeda, Hiroshi Sasaki, Ken-ichi Miyamoto, and Masaki Aburadad, Identification of Medicinal *Atractylodes* Based on ITS Sequences of nrDNA, *Biol. Pharm. Bull.* 29(2) 315-320, (2006).
- 4) Y. Guo, K. Kondo, S. Terabayashi, Y. Yamamoto, H. Shimada, M. Fujita, T. Kawasaki, T. Maruyama, Y. Goda and H. Mizukami: DNA authentication of So-jutsu (*Atractylodes Lancea* Rhizome) and Byaku-jutsu (*Atractylodes* Rhizome) obtained in the

market based on nucleotide sequence of the 18S-5.8S rDNA Internal Transcribed Spacer region., *Journal of Natural Medicines*, in press (2006).

- 5) Yoichiro NAKAI, Koya YANO, Mao SHIBA, Kenji KONDO, Osami TAKEDA, Iwao SAKAKIBARA, Susumu TERABAYASHI, Shuichi TAKEDA and Minoru OKADA, Chemical characterization of the rhizomes of *Atractylodes lancea* and *A. chinensis* identified by ITS sequences of nrDNA, *J. Jpn. Bot.* (Accepted)
- 6) 日本薬局方フォーラム(加味逍遙散エキス, 補中益気湯エキス, 柴苓湯エキス, 苓桂朮甘湯エキス) 849-861 14(4), (2005)

2. 学会発表

- 1) 丸山卓郎、小松かつ子、川崎武志、藤田正雄、近藤健児、寺林進、嶋田宏志、山本豊、合田幸広、ITS 塩基配列によるシゴカの基原種鑑別、日本生薬学会第 52 回年会、2005 年 9 月、金沢。
- 2) 郭 亜紅、水上 元、近藤健児、寺林 進、嶋田宏志、山本 豊、川崎武志、藤田正雄、丸山卓郎、合田幸広、市場品朮類生薬の遺伝子鑑別、第 34 回生薬分析シンポジウム、2005 年 11 月、大阪。
- 3) 丸山卓郎、杉本直樹、黒柳正典、鎌倉浩之、合田幸広、延命草の成分と基原種について、日本薬学会第 126 年会、2006 年 3 月、仙台。
- 4) 内山奈穂子、金 益輝、川原信夫、合田幸広「トウヒ・キジツの定量試験法の検討」日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月 28-30 日、仙台)

G. 知的財産権の出願登録状況

特になし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社