

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に關与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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	…… 344
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	…… 358
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広	…… 373
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	…… 390
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	…… 402
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	…… 417
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	…… 435
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的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗	…… 449
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	…… 466
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 謙	…… 481
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	…… 494
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	…… 509
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	…… 525
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	…… 537
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	…… 551
KH41038	ボ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 兒	…… 566
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	…… 576

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 刺五加、ガジュツ、車前草・車前子、延命草、朮類生薬に関し遺伝子情報に基づく基原鑑定法について検討し、朮類生薬については、共同試験を行い、日本薬局方の参考情報に収載(15局第一追補)予定となった。また、漢方処方中の生薬の定量試験法として、キジツ、ブシ、ニンジンの定量分析法を検討し、良好な結果を得た。

分担研究者

- (1) (株)ツムラ生薬研究部 近藤 健児
- (2) 三栄源エフ・エフ・アイ(株)品質保証部検査課 荒川史博
- (3) (株)栃本天海堂品質管理部 山本 豊
- (4) (株)ウチダ和漢薬研究開発部 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 水上 元
- (6) 富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発研究部門生薬資源科学分野 小松かつ子
- (7) (株)ツムラ生産本部静岡工場 山本藤輔
- (8) (株)小太郎漢方製薬株式会社研究所 近藤誠三
- (9) カネボウ(株)漢方ヘルスケア研究所 山本恵一
- (10) ジェービーエス製薬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ならない。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

基本的な方針は、昨年度の報告書に記載した<生薬の科学的品質保証に関する研究>

B-2. 刺五加

1) 核 rDNA, ITS 領域の配列解析

外皮をカッターで除去し、内部組織約 40 mg を液体窒素下、乳棒、乳鉢を用いて、凍結粉碎した。これについて、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) により genomic DNA の抽出、精製を行った。得られた DNA 溶液 1 μ l を鋳型とし、TaqNT DNA polymerase (Nippon Gene) を用いて、2 段階の PCR を行い、目的の核 rDNA, ITS 領域を含む DNA 断片を増幅した。Montage-PCR (Millipore) を用いたフィルターろ過により、PCR 反応液より、余剰の dNTP 及びプライマーを除いた後、直接シーケンシング法により、塩基配列解析を行った。Cycle sequencing 試薬には、BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用い、ABI Prism 3100-Avant genetic analyzer (ABI) により、解析を行った。塩基配列の多重整列解析は、clustal W プログラムにより行った。

2) LC/PDA 分析-1

上述の実験材料について、試料の外皮を削り、

このものを粉碎器により粉碎した。50 mg を秤量し、50% メタノール 2 mL を加え、5 Hz、15 分間振とう抽出した。遠心後、上清をフィルターろ過し、試料溶液とした。本試料液 10 μ L を HPLC へ導入し、LC/PDA 分析を行った。

3) 核 rDNA, ITS1 配列の PCR-RFLP 分析

内部組織の粉末、約 5 mg を量り取り、SNET buffer (20 mM Tris/HCl pH8.0、5 mM EDTA、400 mM NaCl、0.3% SDS、200 μ g/mL Proteinase K) 200 μ L を加えた。その後、55°C、1 時間、インキュベーションを行い、続いて、95°C、5 分間加温し、Proteinase K を失活させた。遠心後、上清を取り、これを DNA 試料溶液とした。このもの 1 μ L を鋳型とし、Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck)、AmpDirect Plus (Shimadzu) を用いて、反応液 50 μ L の系で PCR を行い、目的の核 rDNA、ITS1 領域を含む、約 300 bp の DNA 断片を増幅した。Montage-PCR (Millipore) により、PCR 産物を濃縮、精製後、20 ng/ μ L に希釈し、その 7.5 μ L を用いて、全量 20 μ L の系で、NruI, NcoI による制限酵素処理を行った。反応は、37°C、1 hr incubation の後、72°C、10 min 加温し、酵素を失活させた。反応液 15 μ L を 2% アガロースゲル電気泳動 (100 V, 30 min) により解析した。

4) 葉緑体 DNA, trnK 遺伝子領域の配列解析

全塩基配列の決定は次の材料で行った。Eleutherococcus senticosus エゾウコギ 21 検体 [中国吉林省 4、黒竜江省 1、ロシアサハリン 1、日本 3; 刺五加市場品で ITS 領域の解析結果が type 1 のもの 12 検体 (黒竜江省 8、日本 1、不明 3)]。E. sessiliflorus (Rupr. et Maxim.) Seem. マンシュウウコギ 12 検体 [吉林省 3、黒竜江省 1、カナダ 1、日本 1; 刺五加市場品で ITS 解析結果が type 2 のもの 6 検体 (吉林省 2、黒竜江省 3、遼寧省 1)]。その他、日本産の同属植物 3 種。

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 (Fig. 1)。反応条件は、ホットスタート 95°C5 分、続いて熱変性 95°C30 秒、アニーリング 50°C50 秒、伸長反応 72°C1 分 30 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 72°C20 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。

5) LC/PDA 分析-2

E. senticosus 5 検体、E. sessiliflorus 3 検体、刺五加市場品 1 検体について、部位を分けて行った。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、LC/PDA 分析を行った。

6) 葉緑体 DNA, trnK 遺伝子領域の PCR-RFLP 分析

Eleutherococcus 属 5 種 5 検体及び刺五加市場品 25 検体 (吉林省 7、黒竜江省産 18) を用いた。全 DNA を鋳型として、塩基置換部位を含む領域を matK 891F-matK 1242R のプライマーセットを用いて増幅した。PCR 法では反応溶液 (2.5 mM MgCl₂、0.2 mM dATP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dGTP、0.2 mM dTTP、1.5 U Taq polymerase (Promega)) に設計したプライマーセット (最終濃度 0.25 μ M) を加え全量を 50 μ L として行った。反応条件は、ホットスタート 95°C5 分、続いて熱変性 95°C30 秒、アニーリング 50°C50 秒、伸長反応 72°C1 分 30 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 72°C20 分で終了した。得られた PCR 産物に制限酵素 Ase I を加え、37°C で 4 時間酵素反応を行い、得られた断片を 2% アガロースゲル電気泳動法で検出した。

B-3. ガジュツ

実験材料としては、中国産 12 市場品 45 検体 (四川省、広西壮族自治区、広東省、浙江省、中国) 及び日本産 (鹿児島県) 3 市場品 3 検体を検討した。

1) 葉緑体 DNA, trnK 遺伝子領域の配列解析

方法は、2004 年度の報告書に準じた。すなわち、各試料を液体窒素下、凍結粉碎し、その 20-50 mg から、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出し、GENE CLEAN II Kit (BI0101) により精製した。このものを鋳型とし、2 段階の PCR を行うことにより、trnK の 5' イントロン領域 (領域 1) 及び 3' イントロン領域 (領域 3) を別々に増幅した。その際、first PCR の増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) により精製した上で、nested PCR へと供した。Second PCR で得られた産物を、上記と同様に精製した後、ダイレクトシーケンスへと供した。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整列解析は、AutoAssemble program (Ver. 1.3.0、Applied Biosystems) を用いて行った。

2) 精油成分分析

SPME (固相マイクロ抽出) を行い、GC によるクロマトグラムの比較を行った。

B-4. 車前草、車前子

実験材料として、各地の薬草園で栽植されている植物及び岐阜薬科大学薬草園所蔵の植物標本を用いた。また、車前草は中国市場で入手されたものを用いた。車前子は、中国江西省産のもので、別な研究班で理化学試験用生薬標準品として考え

られているものを用いた。

1) DNA の調製

新鮮な植物は液体窒素中で凍結粉末とし、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA を調製した。押し葉標本、生薬(車前草)は、乾燥粉末から DNeasy Plant Mini Kit または Ampdirect Plus (Shimadzu) を用いて DNA を得た。車前子および播種して得た幼植物からの DNA は Ampdirect Plus (Shimadzu) を用いて調製した。

2) 核 rDNA, ITS 領域の増幅と塩基配列の決定
18S-rDNA の 3' -側、ITS1、5.8S rDNA、ITS2、28S rDNA の 5' -側末端を含む約 600bp の大きさからなる領域を PCR で増幅した。押し葉標本や生薬から調製した DNA を鋳型とした場合は内部プライマーを用いて ITS1 と 5.8S rDNA の 3' -側を含む断片と 5.8S rDNA の 5' -側を含む断片にわけて増幅し、それらの配列を重ね合わせた。得られた PCR 産物は、ExoSAP-IT (GE Healthcare Bio-Sciences) で処理後、Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare Bio-Science) でシーケンス反応を行い、DSQ-2000L (Shimadzu) を用いて塩基配列を解読した。

B-5. 延命草

新たに国内で採集したクロバナヒキオコシ 2 検体、サンインヒキオコシ (*I. shikokianus* var. *occidentalis*) 1 検体の他、日本及び中国産の *Isodon* 属植物 9 検体を用いた。

1) 核 rDNA, ITS 領域の配列解析

各検体、約 5-20 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、Ra-9, Ra-11-13 を除く検体については、nested PCR を用いた。Montage-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スへと供した。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整列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。

2) LC/PDA/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、溶媒を減圧下、留去した。残留物をエタノール 5 mL で再溶解し、LC/PDA/MS 用試験溶液とした。

B-6. ビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の分析法バリデーション

試験対象としたソウジュツ及びビャクジュツは、2004 年から 2005 年の間に、北朝鮮及び中国の市場で購入したものを用いた。

1) 試薬

DNA の抽出・精製には、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いた。DNA ポリメラーゼは、AmpliQ Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) を、dNTP、10 x PCR buffer は、AmpliQ Gold に付属のものを用いた。

2) 機器

粉碎器: ミキサーミル MM-300 (Qiagen)、恒温槽: ドライ サーモ バス MG-200 (東京理化学器械)、冷却遠心機: KUBOTA1920 (Kubota)、ボルテックスミキサー: TTM-1 (Shibata)、分光光度計: Gene Quant Pro パーソナルフォトメーター (Amersham Pharmacia Biotech、現 GE Healthcare Bio-Science)、サーマルサイクラー: PC708-02 (Astec)、電気泳動装置: GelMate 2000 (Toyobo)、ゲルイメージ解析装置: AE-6911 (Atto)。なお、上記機器類は、送付検体の確認試験を行った機関が使用したものを記載した。

3) 試料の調製

試料の外皮をナイフで削り取り、残った内部組織を細片化し、ステンレス製の粉碎ジャー (25 mL、ネジ無し) に入れ、粉碎器により粉末化した。各試料約 1 g をサンプル瓶 (10 mL) に量り取り、小分け試料として用いた。各試料は、送付まで室温で保存するとともに、それぞれについて、共同試験と同様の方法により、遺伝子型の確認を行った。試験の性質上、試料は、全機関同一個体を使用することが望ましいが、通常流通する試料の大きさでは、それを可能にする量が得られなかったため、検体 2-5 は、ロットのみを統一し、2 種の個体を使用した。また、検体 1 と 6 は、同一の個体を用いた。

4) DNA 溶液の調製

組換え DNA 技術応用食品の検査方法に関する通知 (平成 13 年 3 月、食発第 110 号、一部改正、平成 18 年 6 月、食安発第 0629002 号)、2.2.1.2 に記載の方法を一部改変して行った。すなわち、粉碎試料 200 mg をポリプロピレン製遠沈管 (1.5-2.0 mL 容) に量り取り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 1 mL と RNase A 2 μ L を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、65°C で 15 min 加温。その間、2-3 回転倒混和。AP2 緩衝液 325 μ L を加え、氷上にて 10 min 保持後、最高速、4°C で、20 min 遠心。次いで、上清 500 μ L を QIAshredder spin column に負荷

し、10000 x g 以上で 4 min 遠心し、溶出液を別の遠沈管 (1.5 mL 容) に移した。同様の操作を再度繰り返した後、その溶出液の 1.5 倍量の AP3 緩衝液・エタノール混液を加え、直ちにピペティングにより混合し、その 500 μ L を mini spin column に負荷し、10000 x g 以上で、1 min 遠心。同様の操作を混合液がなくなるまで繰り返した。次いで、AW 緩衝液 500 μ L を負荷し、10000 x g 以上で、1 min 遠心。同様の操作を 3 回繰り返した後、10000 x g 以上で、20 min 遠心。Column を別容器に移した後、予め 65°C に温めておいた水 50 μ L を加え、5 min 静置した後、10000 x g 以上で 1 min 遠心し、DNA を溶出した。Column を別容器に移した後、同様の操作を繰り返した。PCR の鑄型には、通常、1 回目の溶出 DNA 溶液を用いた。

5) プライマー

A. lancea 及び A. chinensis の確認には、文献 (Y. Guo et al., J. Natural Med., 60, 149-156 (2006)) に記載の primer set C 及び D を使用した。抽出 DNA の品質確認用陽性対象プライマー対の配列は、以下の通りである。Pf, 5' -CAT TGT CGA AGC CTG CAC AGC A-3' ; Pr, 5' -CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C-3' 。

6) PCR 条件

PCR 緩衝液、0.20 mmol/L dNTP、0.4 μ mol/L 5' 及び 3' プライマー、1.25 unit Taq DNA ポリメラーゼを含む液に、10 ng/ μ L に調製した DNA 試料液 5 μ L (DNA として 50 ng) を水中に加え、全量を 25 μ L とし、反応を行った。反応は、ソウジュツの検出用プライマー対 (Primer sets C and D)、DNA 抽出確認用の陽性対象プライマー対 (Primer set P) 及び陰性対象 (プライマー対、鑄型 DNA を加えないもの) について行った。温度条件は、論文に記載のプログラムに従った。ただし、アニーリング温度に関しては、各機関の PCR 装置の性能差を補正するために、各遺伝子型の配列を pCR2.1 vector (Invitrogen) に導入した陽性対象鑄型 DNA 溶液を用いた PCR を行い、全ての遺伝子型、プライマー対の組み合わせにおいて正しい結果が得られる温度を設定した。PCR 産物の確認は、アガロースゲル電気泳動 (2%) により行い、試料とともに泳動するプロモフェノールブルー色素がゲルの半分から 2/3 まで進んだところで、終了し、UV (312 nm) 照射下のエチジウムブロマイドの蛍光により行った。

7) 判定

判定は、日本薬局方フォーラム 15 (4) 400-401 の 5. PCR 産物の検出と判定に記載された方法で行った。

8) 試験の実施

本外部精度管理試験に参加した機関は、6 機関であった。この内、2 機関は、実験設備の都合上、同一の施設を使用した。小分け試料 6 検体、各プライマー対、標準 DNA 溶液 4 種及び実施要項を各機関へ送付した。結果は、各機関が判定基準に従い判定し、各検体の合否を回答として得た。

<漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究>

B-7 キジツ配合処方の定量分析法の検討

本生薬の指標成分として、フラバノン配糖体である naringin (2S 体) を選定し、naringin の HPLC による diastereomer の分離条件を検討した。また、naringin と同じく含有成分である neohesperidin の diastereomer 混合物についても同時に分離条件を検討した。確立した HPLC 条件は以下の通りである。測定波長: 284 nm、カラム: CHIRALPAK IB (4.6 mm i.d. x 250 mm)、カラム温度: 40°C、流速: 0.7 ml/min、移動相: 0.13%TFA を含むヘキサン・クロロホルム・エタノールの混合液 (67:19:14 v/v/v)。対象とした処方エキスは次の通りである。大柴胡湯、排膿散及湯、五積散、茯苓飲、通導散。

B-8 ブシ配合処方のブシモノエステルアルカロイドの定量分析法の検討

日本薬局方の収載候補品目である八味地黄丸、真武湯、牛車腎気丸エキスを対象とし、処方のブシモノエステルアルカロイドの定量分析法を検討した。まず、日局ブシの総アルカロイド定量法を準用する方法を検討、次いで、HPLC によるブシモノエステルアルカロイド (ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルアコニン、ベンゾイルヒパコニン、14-アニソイルアコニン) 定量について検討を行った。HPLC 条件は次の通りである。測定波長: ベンゾイルアコニン、ベンゾイルヒパコニン及びベンゾイルメサコニンは 231 nm、14-アニソイルアコニンは 254 nm、カラム: ODS カラム (4.6mm x 150mm, 5 μ m、カラム温度: 40°C、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。

B-9 ニンジン配合処方中のギンセノシド Rg1 の定量分析法の検討

日本薬局方の収載候補品目六君子湯エキスを対象とし、ニンジンサポニンであるギンセノシド Rg1 の定量法について検討した。HPLC 条件は、日局ニンジンの条件を準用し、アルカリ処理の有無、前処理カラム、試験の頑健性等について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究には、ヒト由来の試料は用いておらず、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. 刺五加

1) 核 rDNA, ITS 領域の配列解析

遺伝子型の type 1 及び type 2 は、昨年度までの研究で見出された配列と同様であり、type 1 は、*E. senticosus* 標品及び国際塩基配列データベース (DDBJ, EMBL, GenBank) 中の該当配列 (Acc. no.: AJ786230) と一致した。また、type 2 は、*E. sessiliflorus* 標品及びデータベース中の同属植物 5 種の配列 (Acc. no.: AJ7886229; AY548180; AY548186; AY548187; AY548188) と一致した。DNA 配列解析の結果から、市場に流通するシゴカには、高い比率で マンシュウウコギなどの近縁植物を基原とするものが見出され、その中には、同一ロット内に複数の基原種に由来するものも認められた。

2) LC/PDA 分析-1

指標成分分析の結果から、syringaresinol diglucoside (SG) は、分析を行った全ての個体で検出されたものの、EB は、type 2 の配列を持つ試料には、含有していなかった。このことから、昨年度の研究結果の通り、刺五加の基原種の遺伝子型と EB の有無には、相関関係があることが確かめられ、第十五改正日本薬局方に規定する刺五加の確認試験 (HPLC による EB の定性) は、精度の高い方法であることが明らかになった。

3) 核 rDNA, ITS1 領域の PCR-RFLP 分析

PCR 増幅を行った DNA 領域及び制限酵素認識部位を Fig. 2 に示した。ITS1 領域を含む PCR 産物を、Nru I で処理する時、type 1 (エゾウコギ) の配列を有する試料では、約 150 bp のバンドが生成するのに対し、type 2 (マンシュウウコギ類) の配列を有する試料では、約 300 bp のバンドが観察され、Nco I で処理する時、逆に type 1 の試料では、約 300 bp、type 2 の試料では、約 150 bp のバンドが観察されると予想される。実際、本方法を市場に流通するシゴカ試料に適用した結果、各試料とも予期した通りのバンドパターンを示し、明確に、type 1 と type 2 の遺伝子型を区別可能であった。

4) 葉緑体 DNA, *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* の採集品 9 検体には 6 箇所の塩基置換と 1 箇所の挿入/欠失が認められ、配列に 5 タイプ (I~V) があつた。さらに、ITS 領域の配列が type 1 であることにより *E. senticosus* と同定されている市場品を含めると、7 タイプがあつた。黒龍江省産に限っても 5 タイプが認められ、同省における *E.*

senticosus の種内変異が明らかになった。各検体の塩基配列に基づいて最節約法で系統樹を構築したところ、*E. senticosus* で 1 つのクレードが形成された。さらにタイプ II と IV でサブクレードが形成され、1013 番目の guanine が共通した。また、タイプ V~VII でもサブクレードが形成され、1472 番目と 1555 番目がともに thymine であつた。

5) LC/PDA 分析-2

E. senticosus の採集品 5 検体における EE の含量は、地上部では 0.05%~0.08%、根茎では 0.05%~0.13% であり、EB の含量は、地上部では 0.03%~0.09%、根茎では 0.04%~0.17% であり、地上部より根茎の成分含量が高い傾向にあつた。一方、*E. sessiliflorus* の採集品 3 検体では、1 検体の根茎のみ EE を 0.05% 含有していたが、それ以外は 2 成分ともに検出されなかつた。なお、EE 及び EB の含量は個体により変動することが、吉林省で入手した市場品 (TMPW 24509) での結果からわかる。Iso は、*E. senticosus* の採集品 3 検体において地上部及び根茎にわずかに検出された。

6) 葉緑体 DNA, *trnL* 遺伝子領域の PCR-RFLP 分析

今回の *trnL* 遺伝子領域の塩基配列解析結果から、985、1102、1334、1540、1614、1753、1804、2034、2443 番目の計 9 箇所の塩基は、*E. senticosus* と *E. sessiliflorus* それぞれの種内で一致し、かつ 2 種の間で違いがあつた。したがって、これらの塩基配列を比較することにより 2 種を区別することが可能であつた。そこで、市場品が *E. senticosus* であることを簡便に同定するための方法として、PCR-RFLP 法の応用を検討した結果、制限酵素 *AseI* を用いることにより 1102 番目の塩基の違いが認識されることがわかつた。そこで、この部位を含む 352 bp の *matK* 遺伝子領域を *matK* 891F-*matK* 1242R のプライマーセットを用いて増幅した後、PCR 産物を制限酵素 *AseI* で処理して電気泳動法を行ったところ、*E. senticosus* のみが長さ 209 bp と 143 bp の 2 個の断片を与え、それ以外の 4 種は 1 個の断片を与えたのみであつた。市場品について本法を適用した結果、25 検体中 15 検体が 2 個の断片を与え、*E. senticosus* であると同定できた。

C-2. ガジュツ

日本に流通する四川省産/中国産 3 市場品各 4 検体はすべて *C. phaeocaulis* の根茎であつた。広西壮族自治区産 5 市場品では *C. kwangsiensis* (gl) の根茎の単一品からなるものはほとんどなく、異なる遺伝子型をもつ根茎の混合品であつた。その中には *C. kwangsiensis* (gl)、*C. phaeocaulis* と同定できるものの他、*C. phaeocaulis* の配列の

1 塩基置換体または 2 塩基置換体〔PC₂₅₇₅, PA₂₅₇₅A₁₇₇〕、*C. kwangsiensis* (gl)の配列の1または2塩基置換体、*C. kwangsiensis* (pl)の配列の1塩基置換体などが混在した。広東省産及び浙江省産市場品も混合品であった。しかし、中国の広西壮族自治区及び浙江省での現地調査で入手した市場品は、広西産2検体が*C. kwangsiensis* (gl)、浙江省産2検体が*C. wenyujin*であった。日本産3市場品はすべて*C. zedoaria* Rosc.であった。

GC分析の結果ガジュツ市場品は、1,8-cineol (1)、 δ -elemene (2)、camphor (3)、 β -elemene (4)、curzerene (5)、curzerenone (6)、germacrone (7)、未同定化合物 (8)、curcumenol (9)の組成と相対含有量を比較することで、次の5タイプに整理できた。Aタイプ:4、6、9の含量が高い。Bタイプ:4、5、7、8の含量が高い。Cタイプ:4、5、9の含量が高い。Dタイプ:4、5の含量が高い。Eタイプ:4を基本とし、3、5または9の含量が高い。

Aタイプには、日本産*C. zedoaria*と四川省産*C. phaeocaulis*に由来するガジュツが包括された。浙江省産*C. wenyujin*に由来するガジュツはBタイプであり、また広西壮族自治区産で遺伝子型が*C. kwangsiensis* (pl)の1塩基置換を示す1検体もBタイプであった。広西壮族自治区産*C. kwangsiensis* (gl)に由来するガジュツは、C、D、またはEタイプの精油組成を示し、そのうちDとEタイプが約半数ずつを占めた。遺伝子型が*C. phaeocaulis*と*C. kwangsiensis* (gl, pl)の配列の1または2塩基置換を示す検体はほとんどC、D、Eタイプに属した。C~Eの3タイプに属するガジュツの精油成分組成は類似していた。

C-3. 車前草、車前子

1) オオバコ属植物の ITS1 及び ITS2 領域の塩基配列解析

オオバコ属植物8種22個体の標本からDNAを調製し、約600bpからなるrDNA領域を増幅して、その塩基配列を比較した。ITS1およびITS2領域の大きさは種によって異なっていたが、おおむね220bpおよび200bpであった。一方、5.8S rDNAの大きさは種に関わらず164bpであり、その塩基配列も全て同一であった。

日本各地で採取されたオオバコ(*P. asiatica*)8個体の塩基配列は全く同一であり、特にITS1領域の3'-側に存在する3塩基からなる挿入配列によって他種からは明確に区別できた。一方、台湾で採取されたオオバコ(*P. asiatica* var. *densluscula*)および沈陽で採取されたオオバコの塩基配列は国内産のオオバコとかなり異なっており、むしろセイヨウオオバコ(*P. major*)やエナ

ガオオバコ(*P. hostifolia*)とよく類似していた。セイヨウオオバコとムジナオオバコ(*P. depressa*)では1~4箇所のサイトで個体間の変異が認められた。ヘラオオバコ(*P. lanceolata*)の塩基配列は他の種とは大きく異なっていた。

次にオオバコ属植物間の塩基置換数を調べた。その結果、台湾産オオバコ(*P. asiatica* var. *densluscula*)、中国産オオバコ(*P. asiatica*)とセイヨウオオバコ(*P. major*)にはITS1領域の塩基配列には差がなく、これらおよびエナガオオバコ(*P. hostifolia*)は極めて近縁な集団を構成していることが判明した。また、ムジナオオバコ(*P. depressa*)および*P. camtschatica*の塩基配列もよく類似していた。この結果は、これらの2種が直根の存在など形態的にも類似していることとよく一致した。

以上の結果から、ITS1およびITS2領域の塩基配列に基づいてオオバコ属植物の種鑑別を行うことは可能であると考えられた。そこで、市場で入手された生薬について、ITS1およびITS2領域の塩基配列に基づく基原植物の鑑別を試みた。

2) 車前草の遺伝子鑑別

車前草の市場品29検体について、ITS1およびITS2領域の塩基配列を解読し、基原植物の同定を試みた。その結果、日本産の車前草10検体は全てオオバコ(*P. asiatica*)と完全に一致し、これらの生薬は、オオバコ(*P. asiatica*)を基原とするものであることが明らかになった。一方、中国産の車前草19検体のうち国内産のオオバコ(*P. asiatica*)と配列が一致するものは1検体だけであった。また、台湾産のオオバコ(*P. asiatica* var. *densluscula*)と一致したものが6検体あった。さらに中華人民共和国薬典で車前草の基原植物として規定されているムジナオオバコ(*P. depressa*)と塩基配列が一致したものは3検体であった。その他のものとしては、*P. erosa*と塩基配列が一致するものが6検体、セイヨウオオバコ(*P. major*)と一致したものが2検体存在していた。また、中国産のShaToc8では、台湾産のオオバコ(*P. asiatica* var. *densluscula*)とセイヨウオオバコ(*P. major*)の間で差があるITS2での2箇所のサイトで両方の塩基が検出され、両者間の雑種であると考えられた。

3) 車前子のDNA鑑別

理化学試験用生薬標準品として準備された車前子から増幅したITS1およびITS2領域の塩基配列は、台湾産オオバコ(*P. asiatica* var. *densluscula*)と一致し、本種を基原とするものであると考えられた。また、この種子を播種して得た幼植物から3個体を任意に選んで塩基配列を解

読した結果、いずれも上記の塩基配列と差はなかった。

C-4. 延命草

1) 核 rDNA, ITS 領域の配列解析

標準植物試料 2 検体の内、Ra-8 は、昨年度の Ra-5, 7 の配列と一致し、種内変異は認められなかった。Ra-9 は、*I. japonicus* 及び *I. trichocarpus* の配列と 198 塩基中、それぞれ 7, 4 塩基の違いを示し、これら 3 種は、明確に区別が可能であった。日本産の延命草の内、徳島産の Ra-10 は、*I. japonicus*、新潟産の Ra-11, -12 は、*I. trichocarpus* と同一の塩基配列を示した。この結果は、両種の分布域と一致していた。一方、中国産の *Isodon* 属植物は、上記 3 種の配列のいずれとも一致しなかった。なお、昨年度の研究で、ヒキオコシ抽出物と同じ成分パターンを示した Ra-1 由来の 3 つのクローンは、それぞれのクラスターに分類され、この内の一つは、同じ中国産の Ra-13 と一致した。また、Ra-14, -15 は、同一の配列を示し、*I. japonicus* 及び Ra-1 のクローンの一つと同じクラスターに分類された。

2) LC/PDAMS 分析

LC/PDA/MS 分析の結果を Fig. 8 に示した。新たに加賀市で採集した標準植物試料 2 検体の内、Ra-8 は、oridonin を主成分としていた。一方、Ra-9 からは、主成分として、保持時間 15.5 分に未同定のピークが検出された。精密質量分析の結果から、この成分は、分子式 $C_{20}H_{28}O_7$ と推定され、文献検索の結果から、*I. trichocarpus* や、*I. xerophilus* より単離報告のある trichorabdonin や xerophilusin L などのジテルペンであると考えられた。

日本産の延命草 3 検体 (Ra-10-12) は、比率の違いはあるものの、いずれも enmein 及び oridonin を主成分としており、昨年度、国内で採集したヒキオコシ及びクロバナヒキオコシの分析において得られた結果と同様の傾向を示した。一方、中国産の 4 検体の内、DNA 配列解析において、Ra-1 のクローンの一つと同一の配列を有していた Ra-13 からは、主成分として ericalyxin B が認められ、昨年度の研究で得られた中国産の Ra-1 のものと良く似た成分パターンを示した。Ra-14, -15 は、主として、oridonin を含有していた。また、Ra-16 には、目立ったピークは検出されなかった。

C-5. ビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の分析法バリデーション

1 機関の 1 検体において、primer set P による PCR 増幅が確認出来なかったため、判定不能であったが、その他の機関、検体では、全て正しい

結果が得られた。判定不能となった検体は、実施要項に従い、DNA の再抽出が行われたが、同様の結果であったとの回答を得た。

各機関での精製 DNA の濃度について比較したところ、同一の個体を使用した検体 1 と 6 の比較では、いずれの機関も収量に大きな差は認められなかった。一方、同一検体の各機関別の収量については、大きな差が認められた。この内、同一の実験設備を使用した機関 A と C は、いずれの検体もほぼ同じ値を示した。従って、機関別に認められた抽出 DNA の収量の差は、技術の差によるものではなく、実験施設の違いあるいは、実施要項に記述のない微細な手技の違いによるものと考えられた。

また、PCR 装置の校正用に使用した陽性対象鋳型 DNA 溶液は、検体由来の DNA 溶液に比べ、より高いアニーリング温度で、PCR 産物が得られるとの結果が、1 機関より示された。これは、検体の DNA 溶液には、原料植物に由来する夾雑物が含まれているためであると考えられる。従って、PCR 装置の校正については、遺伝子型が明らかな標準生薬を用意し、各機関において、そのものから調製した DNA 溶液を陽性対象鋳型 DNA として使用するなど、他の方法も検討する必要があると考えられた。

さらに、同一検体での各プライマー対での PCR 産物の収量は、primer sets C, D に比べ、primer set P の方が、多い傾向が認められた。この傾向は、主にプライマー対の T_m 値の差に起因すると思われる。この傾向は、*A. lancea* あるいは *A. chinensis* の DNA が含まれているにも関わらず、primer set P で陽性、primer set C あるいは D で陰性という誤った結果を招く恐れがある。試験法の精度向上のためには、むしろ、primer set P による PCR の方が、primer set C, D の場合よりも PCR 産物が生成しにくい条件が好まれるため、今後、primer set P の T_m 値を下げるなどの検討が必要であると思われる。

<漢方処方科学的品質保証に関する研究>

C-6 キジツ配合処方の定量分析法の検討

キジツ中では、naringin、neohesperidin の diastereomer との相対比はそれぞれ 74%以上、94%以上であった。他方、処方エキス中では、42%以上、57%以上であり、処方エキスが調製される段階で、2 位の反転がおり、diastereomer (2R 体) に変換されていることが判明した。

C-7 ブシ配合処方のブシモノエステルアルカロイドの定量分析法の検討

総アルカロイド定量法において、滴定の精度を上げるため、1/10 の塩酸濃度を用いたが、滴定終

点の色の変化が微妙であり、滴定のバラツキは依然として大きいことが判明した。そこで、さらに八味地黄丸、牛車腎気丸の処方からブシを抜いたエキスを調製し、このブランク試料について総アルカロイド定量を行った。その結果、ブランク試料の滴定量は、試料の滴定量の 70 % 以上あることが判明し、本法は定量法として相応しいものではないことが明らかとなった。そこで、HPLC による定量分析法を検討した。

ブシモノエステルアルカロイド混合品標準品溶液について、6 機関で 4 種類のカラムを使用し、保持時間、理論段数、シンメトリー係数を測定した。その結果、いずれの会社、カラムにおいても良好な分離と、シンメトリー係数が得られた。そこで、3 種の処方エキスについて 8 社で分析を位行つたところ、ベンゾイルメサコニンについては、分離は問題なく、比較的含量が多いことから定量法の設定は可能と判断された。他方、ベンゾイルアコニンについては含量が少なく、また隣接する夾雑ピークとの分離が十分ではないことが判明した。また、ベンゾイルヒパコニン、14-アノイルアコニンは、分離に問題はないことが明となった。C-8 ニンジン配合処方中のギンセノシド Rg1 の定量分析法の検討

Sep Pak C18 を前処理カラムとする試験法について検討した結果、妨害成分が除去されることを確認した。また、日局ニンジンで規定されている、アルカリ処理についても検討したが、操作の有無により、定量値に差がないことが判明した。さらに、各種カラムの検討を行つたところ、ギンセノシド Rg1 の保持時間(Rt)は 21.2~25.2 分となり、どのカラムにおいても良好な分離を示すことが明らかとなった。

D. 考察

<生薬の科学的品質保証に関する研究>

D-1. 刺五加

核 rDNA, ITS 配列解析及び指標成分分析の結果は、昨年度までの研究結果と良く一致し、市場に流通する刺五加には、マンシュウウコギ類を基原とするものが、依然として高い比率で存在すること、ITS 領域における遺伝子型と EB の含有に明確な相関が有ること等が、再確認出来た。また、このことから、JP15 により規定されている刺五加の確認試験法 (HPLC による EB の定性分析) が、刺五加の基原種の確認に適した精度の高い方法であることが確認出来た。

一方で、同一ロット内に、複数の基原植物由来の刺五加が混ざっている試料も確認されたことから、刺五加の規格基準の一つとして、純度試験が

重要であると思われた。ITS 領域の遺伝子型との相関が認められた EB は、エゾウコギを特徴づける成分であり、マンシュウウコギ類を検出する必要がある純度試験には、利用出来ない。そこで、PCR-RFLP 法を利用した刺五加の基原種鑑別法の開発を検討した結果、本法により、少なくとも単一個体では、DNA 配列解析において見出された 2 つの遺伝子型を明確に区別可能であることが明らかになった。今後、2 種の遺伝子型の混合試料を用い、本法の検出限界について検討を行っていく予定である。

葉緑体 DNA, *trnK* 遺伝子領域の配列解析では、刺五加の正品である *E. senticosus* の *trnK* 遺伝子の塩基配列には種内変異があり、各検体は 7 タイプに分けられ、さらに偽品の *E. sessiliflorus* とは 9 箇所の塩基により明らかに区別された。従って、刺五加は、*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。*E. senticosus* と *E. sessiliflorus* を区別可能な 9 箇所の塩基の内、1102 番目の塩基の違いに基づいて制限酵素 *Ase I* を用いた PCR-RFLP 法を開発した。これを市場品に応用したところ、3/5 の検体が *E. senticosus* 由来の刺五加であった。今後、ITS 領域における遺伝子解析と合わせることで、確実に *E. senticosus* が同定できるものと考えられ塩酸する。一方、各種薬理作用が報告されている Eleutheroside E の含量は、*E. senticosus* の地上部より根茎に多い傾向が認められた。今後さらに検体を増やして、各遺伝子型と産地との関係、成分含量と産地との関係などを検討する予定である。

D-2. ガジュツ

日本市場に流通する広西壮族自治区産ガジュツには *C. kwangsiensis* (gl) を基原とするものの他に、*C. phaeocaulis*、この 2 種または *C. kwangsiensis* (pl) の配列の 1 または 2 塩基置換を示す個体が混在して、遺伝子多型が認められた。広東省産、浙江省産ガジュツについても同様であった。一方、四川省産ガジュツは *C. phaeocaulis*、日本産ガジュツは *C. zedoaria* であり、基原が安定していた。これらの精油成分を固相マイクロ抽出後 GC 法で分析した結果、1,8-cineol, d-elemene, camphor, b-elemene, curzerene, curzerenone, germacrone, curcumenol が同定され、それらの組成によりガジュツ市場品は 5 タイプに分けられた。四川省産 *C. phaeocaulis* または日本産 *C. zedoaria* に由来するガジュツは A タイプに属し、広西壮族自治区産 *C. kwangsiensis* (gl) に由来するガジュツ及び多様な遺伝子型を示す同地域のガ

ジュツは C~E タイプに属した。精油含量が低かった 2 市場品は E タイプに属した。ガジュツの品質の標準化は基原のみならず精油成分組成によっても行えるものと考えられた。現段階において日本で使用する中国産ガジュツとしては、四川省産 *C. phaeocaulis* が適していると考えられる。広西壮族自治区産 *C. kwangsiensis* (gl) を加えるとするならば、精油成分に関する規定が不可欠である。

D-3. 車前草、車前子

オオバコ (*P. asiatica*) と同定された 4 検体はいずれも確認試験で plantamajoside が検出され、また HPLC のプロファイルも plantamajoside を major peak とし、acteoside がほとんど検出されないパターンを示していた。一方、台湾産のオオバコ (*P. asiatica* var. *densluscula*) と塩基配列が一致した 4 検体のうちの 3 検体でも TLC および HPLC の結果がオオバコ (*P. asiatica*) を基原とするものによく類似していたが、1 検体では plantamajoside 含量が非常に低かった。セイヨウオオバコ (*P. major*) との雑種と推定された 1 検体 (ShaToc8) では、HPLC で plantamajoside と acteoside の両方のピークが明瞭に観察された。

ムジナオオバコ (*P. depressa*) と同定された 3 検体では、いずれも直根が存在し、また TLC では plantamajoside が検出されず、また HPLC プロファイルも acteoside を major peak とし、plantamajoside に相当するピークが検出されないパターンを示した。

P. erosa の配列と一致した 6 検体のうち 4 検体では TLC で plantamajoside がほとんど検出されなかった。残りの 2 検体でも HPLC プロファイルで plantamajoside と acteoside に相当するピークがともに存在するパターンを示した。セイヨウオオバコ (*P. major*) と同定された 2 検体では、いずれも plantamajoside がごく少量存在し、acteoside が検出されない HPLC パターンを示した。

葉脈の数、葉縁部の厚角細胞の有無と同定した基原植物種の間には明確な関係は見出せなかった。

ITS 配列の解析による車前草の基原種鑑別と成分分析、形態観察の結果を総合すると、日本産オオバコ、ムジナオオバコ及び *P. erosa* は、形態学的特徴及び HPLC パターンから鑑定可能であると思われたが、台湾産のオオバコ (*P. asiatica* var. *densluscula*) やセイヨウオオバコでは、様々な HPLC パターンが確認され、形態学的特徴からの区別も難しいことから、これらの鑑別には遺伝子解析法が有用であると考えられる。

D-4. 延命草

昨年度及び今年度の研究結果から、日本に分布するヒキオコシ及びクロバナヒキオコシは、遺伝

子型が安定しており、その成分は、enmein 型、oridonin 型及びその中間型に分類されることが明らかになった。一方、中国産の *Isodon* 属植物では、複数の配列の混合物として検出された Ra-1 由来の配列を含めると、多くの遺伝子型が見出された。中国国内には、多くの *Isodon* 属植物が分布し、その中には、薬用に供される種も少なくないことから、この結果は、その事実を反映していると思われる。また、中国産の *Isodon* 属植物の成分は、oridonin 型と eriocalyxin B 型に大別された。この内、eriocalyxin B 型の成分型を示した Ra-13 は、貴州省産の市場品であり、本成分が最初に単離された *I. eriocalyx* の分布域と一致する。また、本種は、雲南省において「Yanshukang」の名で、抗菌、抗炎症薬として用いられている。これらのことから、Ra-13 は、*I. eriocalyx* であると推定された。また、同じ成分型を示した Ra-1 のクローンの一つ (Ra-1 clone 2) も Ra-13 と同じ配列を示していることから、この遺伝子型が Ra-1 の成分型の決定に寄与しているものと思われる。

以上のことから、日本の生薬市場に流通していた中国産の延命草、Ra-1 は、局外生規が定める延命草の基原植物、*I. japonicus* 及び *I. trichocarpus* とは異なる同属植物を用いていると考えられた。

一方、延命草の健胃作用の本体は未だ明らかではないが、enmein や oridonin などの主ジテルペン成分には、抗菌、抗腫瘍活性を有することが知られており、本化合物の α -methylenecyclopentanone 部位が活性発現に重要であると考えられている。また、同様の部分構造を有する kamebacetal A や kamebakaurin には、抗炎症作用を有することも知られており、これらのジテルペン成分の抗菌、抗炎症作用が、延命草の健胃作用に寄与していると思われる。今回の研究で、中国産の延命草 (Ra-1) から見出された eriocalyxin B についても、同様の骨格を有しており、また、抗菌作用を持つことも確認されている。従って、局外生規の規定とは異なる植物を基原とすると推定された Ra-1 についても、その強度は不明ながら、健胃作用を有すると思われる。

D-5. ビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の分析法バリデーション

全ての機関、検体において、誤った結果を導くことは無く、本方法は、朮類生薬の純度試験に有用であると考えられた。また、今回の試験結果から、陽性対象鋳型 DNA 溶液に代わる PCR 装置の校正手段、陽性対象プライマーの設計に若干の改善の必要性があると考えられた。さらに、各機関

より得られた抽出 DNA の濃度の比較から、抽出 DNA の収量には、10 倍以上の個体差が認められた。従って、今後、混合試料による検出限界を検討する際には、この点に留意することが、重要であると思われる。

最近、島津バイオテック社は、動植物に含まれる PCR 阻害物質の作用を抑制する働きを持つ PCR 用試薬として、Ampdirect Plus を製造、販売している。今回の共同試験において得られた DNA 溶液（3 機関分）を鋳型に用い、本試薬と NovaTaq Hot Start DNA polymerase (Merck) により、PCR を行った結果、いずれも良好な結果を示すとともに、いくつかの検体において、PCR 産物の収量に大幅な改善が見られた。本試薬の製造者は、本試薬を使用することで、試料から DNA を精製すること無く、インキュベーションのみの簡易な DNA 抽出操作で調製した DNA を PCR の鋳型に利用出来るとしている。実際、我々が行った予試験では、外皮を除去した朮類生薬を上記の抽出法により調製した DNA から、良好な PCR 産物が得られている。本方法を用いることにより、DNA 抽出にかかる時間、手間、技術差を圧縮出来ると思われることから、今後、PCR-RFLP 法の適用と共に、本試薬の利用も検討課題とすべきであると思われる。

＜漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究＞

D-6 キジツ配合処方の定量分析法の検討

キジツ配合処方エキス中では、diastereomer である、2*R*-*epi* 体の相対比が高まった。これはエキスの抽出・製造過程で熱がかかり、アグリコン部の 2 位のラセミ化が進行したためと考えられる。従って、局方規格は、この点を考慮して設定される必要性が示唆された。

D-7 ブシ配合処方のブシモノエステルアルカロイドの定量分析法の検討

現段階では、処方エキス中のブシモノエステルアルカロイドの分析法として、HPLC を用い、ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン、14-アニソイルアコニンについて定量を行うことが可能となっている。多くの処方エキスでは、ブシ由来のアルカロイドのうち、ベンゾイルメサコニンが 40% 以上を占め、ベンゾイルアコニンは、10% 以下であることが判明している。今後、ブシモノエステルアルカロイド含量を規格値として採用する場合、やや分離に問題があるベンゾイルアコニンの定量をどうするか、検討が必要と考えられる。

D-8 ニンジン配合処方中のギンセノシド Rg1 の定量分析法の検討

Sep Pak C18 処理を行うことで、六君子湯エキスについて良好なクロマトグラムが得られることが

判明した。ニンジン含有する漢方処方には、頻用される漢方処方の 1/4 程度あり、本研究でほぼ確立された試験法は、引き続き六君子湯エキス以外の処方エキスでも応用可能なものと考えられる。

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、刺五加、車前草、車前子、朮類生薬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、遺伝子鑑別法を利用した朮類生薬の純度試験法についてバリデーションを行った結果、良好な結果が得られた。本結果をもとに、ここで提示された試験法は、日本薬局方調査会生薬等委員会で議論され、日本薬局方の参考情報に収載（15 局第一追補）予定となった。

＜漢方処方の科学的品質保証に関する研究＞

今年度の研究により、漢方処方中のブシアルカロイド並びにギンセノシド Rg1 の分析法について、大枠を決めることが出来た。今後、15 局第二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

論文発表等

- 1) Naki, Y., Yano, K., Shiba, M., Kondo, K., Takeda, O., Sakakibara, I., Terabayashi, S., Takeda, S., Okada, M., Chemical characterization of the rhizomes of *Atractylodes lancea* and *A. chinensis* identified by ITS sequences of nrDNA, *J. Jpn. Bot.* **81**(2) 63-74 (2006).
- 2) Guo, Y., Kondo, K., Terabayashi, S., Yamamoto, Y., Shimada, H., Masao, F., Kawasaki, T., Maruyama, T., Goda, Y., Mizukami, H., DNA authentication of So-jutsu (*Atractylodes lancea* rhizome) and Byaku-jutsu (*Atractylodes* rhizome) obtained in the market based on the nucleotide sequence of the 18S-5.8S rDNA internal transcribed spacer region. *J. Nat. Med.*, **60**, 149-156 (2006).
- 4) 日本薬局方フォーラム(遺伝子情報を利用する生薬の純度試験) 400-401 15(4), (2006).
- 5) 小松かつ子、佐々木陽平、東田千尋、田中 謙、鬱金類生薬の基原と品質 *Food & Food Ingredients Journal of Japan*, **212**(5), in press (2007).
- 6) 丸山卓郎：レギュラトリーサイエンスにおける天然物の基原種鑑別と成分分析、*Food &*

Food Ingredients Journal of Japan, **212**(5),
in press (2007).

- 7) Uchiyama, N., Kim, I. H., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Konishi, T., Goda, Y., HPLC separation of naringin, neohesperidin and their C-2 epimers in commercial samples and herbal medicines. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, submitted (2007).
- 8) T. Maruyama, H. Kamakura, M. Miyai, K. Komatsu, T. Kawasaki, M. Fujita, H. Shimada, Y. Yamamoto, Y. Goda, Authentication of the commercial *Eleutherococcus senticosus* Rhizome by DNA and chemical analyses, *Planta Med.*, submitted

学会発表等

- 1) 大家真由子、ZHU Shu、田中 謙、小松かつ子、丸山卓郎、合田幸広、川崎武志、藤田正雄、山本 豊: *trnK* 遺伝子の塩基配列に基づく刺五加の同定. 日本生薬学会第 53 回年会、2006 年 9 月、埼玉.
- 2) 中島育美、川崎武志、藤田正雄、丸山卓郎、鎌倉浩之、合田幸広、小松かつ子、山本豊、刺五加市場品の形態学的特徴について、日本生薬学会第 53 回年会、2006 年 9 月、埼玉.
- 3) 郭亜紅、山下裕美、水上元、酒井英二、田中俊弘、山本豊、嶋田宏志、川崎武司、藤田正雄、合田幸広「車前草の遺伝子鑑別」日本生薬学会第 53 回年会 日本生薬学会第 53 回年会、2006 年 9 月、埼玉
- 4) 川原信夫「最近の生薬行政の動き」第 18 回生薬漢方製剤の微生物および異物汚染対策ならびに品質管理に関するシンポジウム、2006 年 12 月、大阪.
- 5) 久場良亮、田中 謙、ZHU Shu、魏 勝利、合田 幸広、渡邊裕司、小松かつ子. ガジュツの精油成分による品質評価. 日本薬学会第 127 年会、2007、3、富山.

G. 知的財産権の出願登録状況 特になし

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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