

表 1. 研究班による薬剤輸入実績 (2008 年 6 月～2009 年 3 月)

商品名	一般名	規格	輸入量
Avloclor	リン酸クロロキン	250 mg 錠	20 錠 x 30 箱
Primaquine	リン酸プリマキン	7.5mg 塩基錠	100 錠 x 25 箱
Malarone	アトバコン/プログアニル合剤	250 mg/100 mg 錠	12 錠 x 30 箱
Riamet	アーテメター/ルメファン トリン合剤	20 mg/120 mg 錠	24 錠 x 30 箱
Plasmotrim-200 Rectocaps	アーテスネート	200 mg 坐薬	6 個 x 60 箱
Quinimax	キニーネ	250 mg 注射薬	3 アンプル x 100 箱
Flagyl IV Minibags	メトロニダゾール	500 mg 注射薬	20 バッグ x 35 箱
Humatin	パロモマイシン	250 mg カプセル	28 カプセル x 80 箱
Sulfadiadine	スルファジアジン	500 mg 錠	56 錠 x 30 箱
Daraprim	ピリメタミン	25 mg 錠	30 錠 x 10 箱
Brolen	イセチオン酸プロパミジン	10 mL 点眼薬	10 本
Germanin	スラミン	1 g 注射薬	15 バイアル
Arsobal	メラルソプロール	180 mg 注射薬	33 アンプル
Ornidyl	エフロールニチン	20 g 注射薬	34 本
Lampit	ニフルチモックス	120 mg 錠	100 錠 x 44 箱

あり、患者救済の立場から使用せざるを得なかった。トキソプラズマ症の薬剤であるスルファジアジンとピリメタミンについては、今年度は脳炎症例で使用された。昨年度に新規に導入した狂犬病ヒト免疫グロブリンについては、まだ使用例がなく、有効期限内であることから、輸入の必要はなかった。

治療報告書の回収は昨年度と同様、不十分な結果であった。有害事象としては、プリマキンによるメトヘモグロビン血症 1 例の報告がみられた。また、重症熱帯熱マラリアでキニーネ注射薬とアーテスネート坐薬を併用した 1 例が死亡し、有害事象報告がなされたが、その後の検討で治療開始が遅れたための死亡であり、薬剤関連の副作用ではないと報告された。

アーテスネート坐薬とアーテメター/ルメファン
トリン合剤は有効期限が短く、前者で 3 年、後
者で 2 年であり、到着した時点で有効期限が迫
っていることも多く、その対策に苦慮していた。そ
こで前者の購入については Mepha 社と直接交渉を
行いつつある。後者については Novartis 社から
直接購入するべく交渉を重ねたが、長期的には困
難であることが判明し、既に多くの薬剤に関して
取引を行なっている英国の薬品販売会社から購
入することに決定した。

薬剤の品質検査

定性的確認に NIRS 法を導入し、硫酸パロモマ

イシン標準物質と Humatin カプセル内容物から得
た NIR 拡散反射スペクトルについて微分処理など
を行い比較精査した。硫酸パロモマイシン標準品
から得た NIR 吸収の中で、 6200 cm^{-1} ～ 4000 cm^{-1}
の波数範囲において、 5800 cm^{-1} 付近及び 4300 cm^{-1}
付近の波形の相違を、また 4900 cm^{-1} 付近の第一
級アミンの結合音と推定した吸収の強度に相違
が認められた点について、クロマトグラフィーの
前処理時において、反応前溶液中に不溶性成分が
存在し、ろ過したこと、またパロモマイシンとし
て同相当量の標準物質と比較してほぼ 100%近い
定量結果が得られていることから、若干の添加剤
が含まれていることが考えられた。以上の結果か
ら、NIR 波形または吸収強度の相違は添加剤に由
来するものであると推察した。これらのことから
相違が認められる部分を除いた吸収を定性的基
準吸収とすることが望ましく、標準物質と一致す
る 4 つの NIR 吸収について、混在する賦形剤の影
響が少なく、明確な帰属ができた 3 つの吸収 (5199 cm^{-1} :
第一アミンの結合音、 4758 cm^{-1} : 水酸基の
結合音、及び 4168 cm^{-1} : 水酸基の変角振動) に
ついて定性的基準波数として設定した。一方、プレ
カラム誘導体化 HPLC 法では、誘導体化試薬とし
て 2,4-ジニトロフルオロベンゼンを用い、汎用性
の高い UV 検出器を用いた定量法を開発した。研
究班で輸入した Humatin カプセルの内容物からパ
ロモマイシンを抽出し、誘導体化を行った。誘導

表 2. 研究班導入薬剤の使用実績 (2008 年 1~12 月)

使用薬剤	疾患	症例数 (延べ)	治療報告書 回収	有害事象 報告
クロロキン	三日熱マラリア	5	5	0
	卵形マラリア	1	1	0
	四日熱マラリア	1	0	0
プリマキン	三日熱マラリア	7	7	0
	卵形マラリア	1	0	0
	ニューモシスチス肺炎	2	2	1*
アトバコン/プログアニル合剤	熱帯熱マラリア	3	0	0
	四日熱マラリア	1	0	0
アーテメター/ルメファントリン 合剤	熱帯熱マラリア	6	4	0
アーテスネート坐薬	熱帯熱マラリア	8	2	1**
	三日熱マラリア	1	0	0
キニーネ注射薬	熱帯熱マラリア	3	1	1**
メトロニダゾール注射薬	赤痢アメーバ症	11	5	0
	偽膜性大腸炎	3	1	0
パロモマイシン	赤痢アメーバ症	40	9	0
	ジアルジア症	1	0	0
スルファジアジン	トキソプラズマ脳炎	4	1	0
ピリメタミン	トキソプラズマ脳炎	4	1	0
スチボグルコン酸ナトリウム	皮膚リーシュマニア症	1	1	0
ニタゾキサニド	クリプトスポリジウム症	3	0	0

*メトヘモグロビン血症

**同一症例であり、両者を用いたが救命できなかった死亡例。薬剤との関連はないとの報告

体化を行った試料溶液から得たクロマトグラムでは、保持時間 6.5 分付近に誘導体化パロモマイシンのピークが認められ、クロマトグラム上では、分析対象成分の他、誘導体化試薬 (保持時間 4.1 分付近)、8~9 種類の副生成物等のピークが検出された (図 1)。なお、開発した分析法は日本薬局方または国際調和された分析法バリデーションの検討項目に従って分析法の特異性 (分析対象成分の選択性)、真度、精度、(定量の) 直線性等を検討、評価した。Humatin カプセル内容物中のパロモマイシンの定量結果 (繰返し回数 3 回の平均値) は 99.8% (98.0~102.6%) であり、ほぼ表示通りの量が含まれていることを確認した。

有効期限から 3 年経過している狂犬病ヒト免疫グロブリン Berirab P を用い、原液の 150 IU/mL のから希釈系列を作成し、それぞれについて中和抗体を測定したところ、実際の抗体価は表示されている抗体価と非常に良く一致した。

熱帯病・寄生虫症の治療

スチボグルコン酸ナトリウムを使用したリーシュマニア症の治療報告書は 5 例入手できた (表

3)。病型では皮膚型が 4 例、内臓型が 1 例で、患者国籍は日本が 2 例、外国が 3 例で、推定感染国はアフリカ、中東、中南米と様々であった。皮膚型の 4 例のうち局注が 3 例であったが、その 1 回投与量、投与回数は様々であった。また、全身投与が 1 例みられた。効果としては有効が 2 例で、不明および記載なしが合わせて 3 例であった。副作用については、重大と思われるものは報告されなかった。内臓型の 1 例は HIV 感染症を合併して

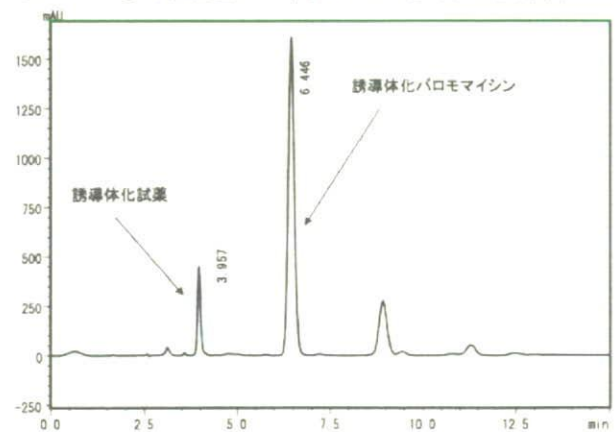


図 1. Humatin カプセル内容物を用いて調製した試料溶液から得たクロマトグラム

表 3. リーシュマニア症におけるスチボグルコン酸ナトリウムの使用症例 (2003 年以降)

年齢/性	国籍	推定感染国	病型	用法・用量	効果	転帰	副作用	備考
52/女	日本	アフガニスタン	皮膚	300 mg の局注を 1 回	有効	再発	局所の発赤、腫脹、疼痛	再発後はイトラコナゾール 200 mg/日内服
39/男	エチオピア	エチオピア	内臓	850 mg/日の点滴静注を 8 日間(副作用で中止)	不明	不明(帰国)	悪心・嘔吐、肝障害、腎障害(脱水)	HIV 感染症あり。早期に帰国となった
53/女	米国	メキシコ	皮膚	300 mg の局注を週 3 回で計 13 回	記載なし	全治	記載なし	治療終了後、約 10 ヶ月して全治と判定
58/男	日本	ペルー	皮膚	1,400 mg の点滴静注をほぼ連日で計 25 日間	不明	全治	血清アミラーゼの軽度上昇	皮膚病変の切除を行なってから投与
12/男	ブラジル	ブラジル	皮膚	初めに 200 mg を 1 日間隔で 2 回局注し、その後 100 mg を 10~14 日毎に計 8 回局注	有効	全治	なし	

おり、本薬剤の全身投与が行われたが副作用で中止となり、また早期帰国のために転帰の判定はできなかった。

ニタゾキサニドを使用したクリプトスポリジウム症の治療報告書は 5 例得られた。推定感染地はメキシコの 1 例以外は国内であった。1 日量は 300mg、1g、2g と様々であり、投与期間は 7~15 日であった。効果としては 1 例が著効、3 例が有効と記載されたが、いずれも免疫不全状態を改善させる治療が併用されていた。副作用としては 1 例で 39°C の発熱がみられ、薬剤との関連性が大きく報告された。

メトロニダゾール注射薬を使用した赤痢アメーバ症の治療報告書は 10 例得られた。病型では大腸炎単独が 4 例、肝膿瘍単独が 3 例、両者の合併が 3 例であった。基礎疾患として HIV 感染症を有していたり、重篤な合併症を有していた症例も

含まれていたが、平成 19 年度と同様に効果は高いと考えられ、副作用として重篤なものは報告されなかった。

国立国際医療センターでは、合併症のない熱帯熱マラリアの 4 例にアーテメター/ルメファントリン合剤を使用した(表 4)。発熱消失時間、原虫消失時間ともに、他の抗マラリア薬と比べて短い傾向がみられた。転帰としては 1 例が再燃を生じたが、他の 3 例では治癒と判断された。この再燃例は体重が多く、治療前原虫数が多かったが、さらに、6 回の服用が全て食間あるいは食前であった。

狂犬病ヒト免疫グロブリンの曝露後接種に関し、以前にワクチン接種を行なった者では適応としないことなどを盛り込んだ使用基準案を作成した(表 5)。

輸入マラリアの動向

表 4. 合併症のない熱帯熱マラリアにおけるアーテメター/ルメファントリン合剤の使用症例

年齢	性別	体重(kg)	最高体温(°C)	病日	原虫数(赤血球感染率)	予防内服	FCT(h)	PCT(h)	再燃*
50	男	86	39.7	2	194,000/μL (3.70%)	なし	62	62	あり
58	男	84	40.1	3	133,000/μL (2.78%)	なし	48	36	なし
39	男	65	39.6	2	21,000/μL (0.45%)	なし	24	20	なし
46	男	68	39.6	2	13,000/μL (0.28%)	なし	24	24	なし

FCT: 発熱消失時間、PCT: 原虫消失時間

*治療後 28 日目での判定

表5. 我が国における曝露後狂犬病ヒト免疫グロブリン (RIG) の使用基準案

- ・ RIG の使用対象者は、下記を満たす者とする
 狂犬病の疑いが極めて強いイヌ等に咬傷を受け、さらに初回ワクチン接種から7日以内の者
- ・ RIG を接種する場合の注意事項
 - (1) 曝露後の狂犬病ワクチン初回接種と同時に RIG を使用することが望ましい
 - (2) 曝露後の狂犬病ワクチン初回接種から8日以上経過した者には RIG を使用しない
 - (3) 狂犬病ワクチンの曝露前接種を受けた者には使用しない
 - (4) RIG の使用は、WHO の曝露分類-第3類についてのみ行う (WHO、1992)

対象期間の症例として 97 例の治療報告書を解析した。性別では男性 70 例、女性 27 例であり、年齢では 21~50 歳が 64 例で 66% を占めた。国籍では日本が 60 例であったが、外国国籍ではインドが 8 例と最も多かった。渡航国 (複数回答可) でみるとパプアニューギニアが 19 例で最も多く、インド 13 例、ナイジェリア 8 例、ガーナ 7 例と続いた (表 6)。渡航目的では観光、一時帰国、仕事の順であった。予防内服は 20 例で行われ、うち 15 例は完全に行なっていた。また、予防薬ではメフロキシンが 9 例で最も多かった。原虫種をみると、三日熱マラリア 57 例、熱帯熱マラリア 28 例、卵形マラリア 6 例の順で、混合感染も 4 例に認められた。

熱帯病・寄生虫症の診断

宮崎大学では 2008 年に寄生虫症検査の受託を 506 件受けた。そのうち新規診断依頼は 363 件であり、36 都道府県の医療機関のみならず、海外からも依頼があった。363 件のうち寄生虫症の診断が得られたのは 143 件であり、39.4% を占めた。依頼された検査としては免疫診断が 95% 以上を占め、残りが病理組織での診断、虫体の同定であった。診断確定例では幼虫移行症の一種であるイヌ回虫・ブタ回虫症が 78 例で最も多く、次いで肺吸虫症の 38 例であった (表 7)。肺吸虫症の虫種では 37 例がウエステルマン肺吸虫で、1 例が宮崎肺吸虫であった。その中で、岐阜県でシカ肉を刺身で喫食した一家 4 名と親戚 2 名がウエステルマン肺吸虫症に罹患した。また、同教室における肺吸虫症の診断件数をみると、2004 年と 2007 年にスパイク状の増加がみられたが、増加分は外国人

症例であることが判明した。また、日本人症例は全体として近年減少傾向であったが、若年層の割合は増加傾向であることが分かった。次に、タイ人の肺吸虫症例につき、タイでの感染か日本国内での感染かを検討した。我が国に分布するのはウエステルマン肺吸虫、タイに分布するのは *Paragonimus heterotremus* であるが、それぞれの感染患者血清中の抗体は対応する虫種抗原で吸収できることを明らかにした。その後、日本で発症したタイ人 8 例の患者血清を用いて吸収試験を行なったところ、4 例はウエステルマン肺吸虫で吸収され (日本での感染)、1 例は *Paragonimus heterotremus* で吸収され (タイでの感染)、残る 3 例では判定不能であった。

京都府立医科大学では 2008 年に蠕虫同定の依頼が 25 件あったが、うち日本海裂頭条虫が 14 件で最も多く、ついでアニサキスが 6 件であった。さらに、節足動物同定依頼が 26 件あったが、うち 23 件はマダニ刺咬症であった。日本海裂頭条虫症について、過去 20 年間の同大学および都立墨東病院での症例数をみたら、最近数年間は両方で症例数が増加しつつあることが判明した (図 2)。両施設における 149 例の臨床的検討を行なったところ、症状としては腹部不快感、腹痛、下痢が多く、貧血 (Hb \leq 12 g/dL) は検査が行われた 43 例中 2 例に、好酸球増多 (\geq 600/ μ L) は 37 例中 4 例にみられたが、後者は軽度であった。また、同教室では最近 5 年間に無鉤条虫症を 5 例経験したが、推定感染地が明らかでない 4 例はすべて国外であった。そして、無鉤条虫と同定された 5 例のうち 4 例について、ミトコンドリア DNA の *cox1* 領域をターゲットとした PCR を行い、増幅産物の

表6. 輸入マラリア 97 例の渡航国 (複数回答可)

アフリカ
ナイジェリア 8、ガーナ 7、ウガンダ 3、シエラレオネ 3、ケニア 3、ブルキナファソ 3、ギニア 2、セネガル 2、タンザニア 2、マリ 2、エチオピア 1、スーダン 1、チャド 1、ベナン 1、モザンビーク 1、ルワンダ 1、リベリア 1
アジア
インド 13、インドネシア 5、タイ 3、バキスタン 3、ミャンマー 3、韓国 1、カンボジア 1、マレーシア 1
オセアニア
パプアニューギニア 19
中南米
ブラジル 8、ホンジュラス 1

表 7. 宮崎大学における寄生虫症診断の年次推移

寄生虫	年次							
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
イヌ回虫・ブタ回虫	68	67	77	100	103	82	101	78
アニサキス	6	6	6	0	4	4	6	3
イヌ糸状虫	6	4	4	7	1	5	1	1
顎口虫	13	10	11	11	0	0	6	7
イヌ鉤虫	6	2	3	0	1	0	1	0
マンソン孤虫	4	8	6	5	4	3	6	4
有鉤囊虫	2	4	2	4	0	0	0	0
ヒトで成熟しない寄生 虫、小計	105	101	109	127	113	94	121	93
肺吸虫	37	36	32	45	30	37	46	38
肝蛭	1	1	8	5	6	2	3	1
日本住血吸虫	0	0	1	5	5	6	6	4
肝吸虫	1	3	1	1	0	0	0	0
糞線虫	8	21	11	11	2	1	1	2
回虫（成虫）	3	3	4	0	1	1	1	2
広節・日本海裂頭条虫	0	0	2	1	0	2	0	1
ヒトで成熟する寄生 虫、小計	50	64	59	68	44	49	57	48
計	155	165	168	195	157	143	178	141

塩基配列解析を行なったが、相同性は無鉤条虫と 98~99%、アジア無鉤条虫と 93%、有鉤条虫と 85% であり、全て無鉤条虫であることが確認された。

ヒト眼トキソカラ症疑診例の抗体は 8 例が陽性を示した（表 8）。しかし虫体 DNA の陽性は 4 例のみであり、いずれもネコ回虫であったが、このうち 2 例は抗体陰性例であった。逆に、抗体陽性・虫体 DNA 陰性が 5 例に見られた。

眼トキソカラ症の動物実験モデル

イヌ回虫幼虫包蔵卵を投与した後、2 週目に血清中のイヌ回虫特異抗体の上昇がみられたが、眼内液ではごく軽度の上昇にとどまった。LAMP 法による検出では、眼内液を用いたら感染 2 週目まで陽性個体は観察されず、眼球組織を用いたら 4 頭中 1 頭が陽性と判断された。

熱帯病・寄生虫症治療薬の開発動向

世界レベルにおける抗マラリア薬の開発状況では、アーテミスニン系薬と他の抗マラリア薬との合剤が主流である。なかでもアーテスネートを含む合剤では、アモディアキン、メフロキン、クロルプログアニル・ダブゾン、ピロナリジンとの合剤の開発が行われ、ジヒドロアーテミスニンではピペラキンとの合剤の開発が行われている。また、アーテミスニン類似の全合成化合物として、現在インドで開発が行われている RB_x11160、岡山

大学綿矢および金らの新規環状過酸化化合物 N-251 が注目を浴びている。プリマキンと類似の 8-アミノキノリンであるタフェノキンについては、クロロキン+プリマキンで治癒しなかった三日熱マラリア症例を対象に 200 mg/日の 3 日間投与による臨床試験が行われ、有望な結果が得られている。

他に、リーシュマニア症に対するシタマキン（WR6026）が開発段階であり、アフリカトリパノソーマ症（睡眠病）に対しては、既存薬剤であるニフルチモックスとエフロールニチン（両者ともに研究班導入薬剤）の併用療法がコンゴで行われ、将来の第一選択治療法となる可能性が示唆され

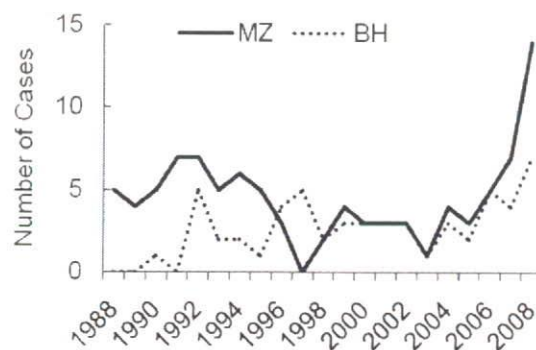


図 2. 京都府立医科大学 (MZ) 及び東京都立墨東病院 (BH) における日本海裂頭条虫症例数の年次変動

表 8. ヒト眼トキソカラ症疑診例での抗体および LAMP 法による虫体 DNA の検出

検体	抗体*	虫体 DNA**	
		イヌ回虫	ネコ回虫
1	-	-	-
2	-	-	-
3	±	-	+
4	-	-	-
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	+	-	-
11	±	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	+
15	-	-	-
16	-	-	-
17	+	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	+
22	+	-	-

*検体番号 1～19 は血清、20～22 は眼内液で測定

**全て眼内液で測定

ている。

D. 考察

以前には研究班導入薬剤としてはマラリアでの使用が多かったが、最近では赤痢アメーバ症での使用が増加しており、しかも中等症～重症の症例が目立っている。これらの症例の一部は基礎疾患として HIV 感染症を有しており、重症化の危険性が高い。昨年度および本年度の研究で示された如く、メトロニダゾール注射薬の効果および安全性は高いと思われ、経口投与と不可能な症例では遅滞なく使用して救命の機会を逃さない様、医療従事者に啓発する必要がある。また、メトロニダゾールなどによる急性期治療の後に投与する luminal drug (パロモマイシン) については、最

近の論文でその必要性を示したものを見つけることはできない。本研究班も本薬剤の使用を限定する方針を取っているが、今後、使用基準をより明確にする必要がある。

なお、メトロニダゾール注射薬については、クロストリジウム・ディフィシルによる偽膜性大腸炎での使用依頼が増えていた。本疾患は通常経口薬で治療可能であるが、経口摂取が不可能なほどに重症化する症例もあり、人道的観点から使用せざるを得ないケースが今後も発生すると思われ、今後の検討課題である。

今回はさらに、スチボグルコン酸ナトリウムとニタゾキサニドの使用症例をまとめたが、抗マラリア薬や抗赤痢アメーバ薬と異なり、使用量や使用期間に大きなばらつきが見られた。後者は歴史が浅い薬剤なので仕方ない面もあるが、前者は歴史が古い薬剤である。しかし、感染地毎のリーシュマニア原虫種の違いに由来する治療法の違い、さらに病期による違いなどがありうるので、それらを考慮した明確な用法・用量を研究班が示す必要がある。また、スチボグルコン酸ナトリウム耐性のリーシュマニア症が増加しつつあり、本研究班もそれに対応して新規薬剤のミルテフォシンを導入している。HIV 感染症を含む免疫不全患者でのクリプトスポリジウム症に対するニタゾキサニドの役割は明確ではない。今回の症例でも言えることであるが、免疫状態が改善すると本症の改善も見られることが多く、本薬剤の位置づけについては今後も検討が必要である。

2001 年末にメフロキンが治療薬および予防薬としても国内で承認された。それまでの国内承認のマラリア治療薬はキニーネ経口薬とスルファドキシシン/ピリメタミン合剤の 2 種類のみであり、しかもそれらは使いやすい薬剤ではなかったので、メフロキンの承認に期待が高まった。しかし、今や世界の殆どの流行地で散発的であっても熱帯熱マラリア原虫のメフロキン耐性がみられ、特にタイ・ミャンマーおよびタイ・カンボジア国境地帯では耐性率が 50%を超えている。日本人渡航者でも耐性原虫が見つかっており、今後さらに増加することも予想される。また、メフロキンは精神神経系副作用がありうるので、その点からも本研究班が導入している抗マラリア薬の重要性は高い。

世界的に、マラリア流行地における熱帯熱マラリ

アの治療薬としてアーテミスニン系薬あるいはそれを含む合剤の評価が高まりつつある。特に、熱帯熱マラリアによる重症マラリアの治療には、従来のキニーネ注射薬に比べてアーテスネット注射薬の方が致死率低下の点で優れていることが報告された。また、本研究班で導入しているアーテスネット坐薬が、重症マラリアの初期治療として使用価値があることが示され、心疾患などでキニーネ注射薬が使用できない場合などに有用と思われる。本研究においても、国内でアーテミスニン系薬あるいはその合剤の使用が増えつつあることが明らかとなった。しかしながら、日本人渡航者のマラリアと流行地住民のマラリアとは異なる面もありうることも考慮し、我が国における本薬剤の使用基準を検討する必要がある。

なお、今回まとめたマラリア症例では、パプアニューギニアの感染例が最も多く、サハラ以南アフリカ国をしのいでいた。これは症例数であり、単位渡航者数当りの罹患者数、すなわち罹患率ではないが、主任研究者が最近日本人渡航者の国別マラリア罹患率をまとめたところ、パプアニューギニアでの罹患率はサハラ以南アフリカ国とほぼ同程度の高さであった。マラリア予防内服を勧めるための基準は明確ではないが、サハラ以南アフリカ国への渡航者に勧めるのであれば、パプアニューギニアへの渡航者に対しても勧めるべきであろう。

本研究班は昨年度、我が国で初めて狂犬病ヒト免疫グロブリンを正式に導入した。狂犬病はインドを初めとして途上国に広く分布しており、日本人渡航者でも感染の危険のある者は多い。しかし本薬剤は高価格であり、時に入手不可能となることもある。今回、有効期限から3年過ぎている免疫グロブリンが当初の力価を保っていることが示された。使用期限終了後の薬剤を使うことの法的検討が必要であるが、使用期限内の製品がない場合には、疾患の重篤性を鑑み、緊急避難的に使うことも考えるべきであろう。また今回、曝露後の狂犬病ヒト免疫グロブリン使用基準案を策定したが、今後諸外国のガイドラインなども比較検討し、より良きものにしていく必要がある。一方、狂犬病罹患の高リスク者に対しては渡航前のワクチン接種（曝露前接種）も積極的に啓発すべきであろう。

今でも国内で多くの寄生虫感染症例が発生し

ているが、過去には土壌媒介性寄生虫症が多かったことを考えると、疫学状況は変化していると言える。なかでもイヌ回虫・ブタ回虫を中心とする幼虫移行症が多いことが注目される。これらは治療抵抗性のことが多く、重要臓器に迷入して重篤な症状を示すことがある。眼トキソカラ症がその代表であるが、失明に至ることもあるので、早期にしかも確実に診断する方法の確立が急務である。無鉤条虫症は以前には国内での発生も多く見られたが、今では殆どが海外での感染となった。さらに、アジアの人々が日本に移住し、仲間同士で集まり、自国に住んでいた時と同じ食材を同じ調理法で加工し、発症する例が目立つ。島国の日本においても、今や感染症は一国だけの問題では済まされず、人、食物、生活習慣、文化などが世界中で入り交じりつつあることから、複雑な様相を呈している。そのため、我が国における熱帯病・寄生虫症の疫学状況を絶えず注視する必要がある。また、日本海裂頭条虫症やマダニ咬症のように、環境の変動の影響を受けて増加する疾患もあると思われる。

本研究班は従来からホームページや「寄生虫薬物治療の手引き」を介して国内医療機関への支援を行い、症例に関する診断や治療の相談にも対応してきた。また、旅行者感染症のサーベイランスを行なっている TropNetEurop（ヨーロッパ）や GeoSentinel（国際旅行医学会）から最新情報の提供を受け、日本人渡航者の診療に役立ててきた。本研究班は今後も海外との関係を保ちつつ、多方面での調査研究を継続し、輸入感染症・寄生虫症の治療が欧米先進国レベルで行なえるような体制の構築に努力を続ける予定である。

なお、今後は本研究班の活動を厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日全部改正）」に則って行なうべく、研究班体制の再構築も必要となる。

E. 結論

熱帯病・寄生虫症の疫学、薬剤耐性、診断や治療の方法などは時とともに変化しており、本研究班にも柔軟かつ適切な対応が求められている。本研究班での臨床経験を蓄積し、欧米の関連機関からの情報提供も受け、我が国においてこれらの疾患の治療が最先端のレベルで行なえる体制を確立するべく、今後も努力を続ける必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ 木村幹男, 丸山治彦, 小田原隆. 特集・国際旅行と感染症. 帰国者の感染症 - 概説と最近の治療. *Circles* 10(2):7-10, 2008.
- ・ 木村幹男, 春木宏介. 特徴ある感染症対策 - Post-exposure Prophylaxis:PEP を中心に. 暴露前予防 (Pre-exposure Prophylaxis:PrEP). マラリア (予防の現況). *臨床と微生物* 35:677-684, 2008.
- ・ 木村幹男, 多田有希, 岡部信彦. 日本人海外渡航者における国別マラリア罹患率. *Clin Parasitol* 19:72-75, 2008.
- ・ 前田卓哉, 藤井 毅, 小田原隆, 岩本愛吉, 迫康仁, 伊藤 亮, 山崎 浩. 血清抗体検査にて診断した多発性脳有鉤囊虫症における, 治療後の経年的画像所見について. *Clin Parasitol* 19:150-152, 2008.
- ・ 前田卓哉, 小田原隆. 知っておきたい輸入感染症 マラリア, デング熱など. *JIM* 18:564-567, 2008.
- ・ 工藤宏一郎. 新時代における「国際的感染症」. *アレルギー・免疫* 15:1473-1474, 2008.
- ・ Jin ZF, Akao N, Ohta N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol Int* 57:495-498, 2008.
- ・ 太田伸生. 国内問題としての Neglected Diseases. *日本臨床寄生虫学会誌* 19:17-20, 2008.
- ・ 有菌直樹: 日本海裂頭条虫症. *化学療法の領域* 24:1335-1341, 2008.
- ・ Arizono N, Shedko M, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Takeda K, Hashimoto K. Mitochondrial DNA divergence in populations of the tapeworm *Diphyllobothrium nihonkaiense* and its phylogenetic relationship with *Diphyllobothrium klebanovskii*. *Parasitol Int* 58:22-28, 2009.
- ・ Shimizu H, Kawakatsu H, Shimizu T, Yamada M, Tegoshi T, Uchikawa R, Arizono N. *Diphyllobothriasis nihonkaiense*: possibly acquired in Switzerland from imported Pacific salmon. *Intern Med* 47:1359-1362, 2008.
- ・ Arizono N, Fukumoto S, Tademoto S, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Kuramochi T. Diplogonoporiasis in Japan: genetic analyses of five clinical isolates. *Parasitol Int* 57:212-216, 2008.
- ・ 曾我幸一, 福本晃平, 小西英幸, 若林直樹, 吉川敏一, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 有菌直樹. 直腸癌と鑑別を要したアメーバ性大腸炎の1例. *Clin Parasitol* 19:30-32, 2008.
- ・ 羽田野義郎, 大野博司, 黒上朝子, 有菌直樹, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 狩野繁之. 著明な血小板減少, 播種性血管内凝固症候群をきたした三日熱マラリアの1例. *Clin Parasitol* 19:69-71, 2008.
- ・ 阪上順一他 22 名 (有菌直樹 22 番目). カプセル内視鏡で観察した日本海裂頭条虫の1例. *Clin Parasitol* 19:156-159, 2008.
- ・ 丸山治彦. 鞭虫症. 今日の治療指針 2009 (山口徹, 北原光夫, 福井次夫編), pp.188-189, 医学書院, 2009 年.
- ・ 丸山治彦. 人体寄生虫. 寄生と共生 (石橋信義, 名和行文編), pp26-55, 東海大学出版会, 2008 年.
- ・ 丸山治彦. 今あぶない寄生虫 (ぜん虫編). 知りたいサイエンスシリーズ: 寄生虫のふしぎ, pp159-202, 技術評論社, 2009 年.
- ・ 丸山治彦, 吉田彩子, 小田原隆, 木村幹男. 特集 オーフアンドラッグのいま. 熱帯病・寄生虫症に対する国内未承認薬の輸入・保管・治療体制. *月刊薬事* 50:885-890, 2008.
- ・ 丸山治彦. 特集・寄生虫感染症. 肺吸虫症. *化学療法の領域* 24:1343-1350, 2008.
- ・ 丸山治彦. わが国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際. *日本薬理学雑誌* 132:292-296, 2008.
- ・ 丸山治彦. 食物寄生虫感染症. *medical forum CHUGAI* 12:33, 2008.
- ・ 丸山治彦. イヌ回虫症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 呼吸器症候群 (第2版) I - その他の呼吸器疾患を含めて -. pp211-215, 2008.
- ・ Sakamoto T, Hiyama Y. Rapid method for determining of nitazoxanide in tablets using reversed-phase ultra-performance

- liquid chromatography (UPLC) and high-performance liquid chromatography. *Pharmazie* 63:503-507, 2008.
- 春木宏介. 特殊な病原微生物の検査/④寄生虫. 感染症内科クリニカルスタンダード, pp87-90, 文光堂, 2008年.
 - 春木宏介. マラリアの診断と治療. *Medical Practice* 25:835-839, 2008.
 - 春木宏介. 赤痢アメーバ症. 化学療法の領域 24:1321-1326, 2008
 - 春木宏介: 特集・感染症の治療 - 抗菌薬を使いこなそう. 海外から帰国した場合. 内科 102:910-913, 2008.
 - 春木 宏介: 南アジアの疾病 - HIV, 結核, マラリアを中心とした感染症. 感染症 (The Infection) 38(6):29-41, 2008.
- ## 2. 学会発表
- 小田原隆, 前田卓哉, 遠藤宗臣, 鯉渕智彦, 藤井毅, 伊藤亮, 岩本愛吉. 抗寄生虫薬による治療後 2 年して再増悪を見た脳有鉤囊虫症の一例. 第 57 回日本感染症学会東日本地方会, 埼玉, 2008 年.
 - 加藤康幸, 水野泰孝, 竹下望, 高崎仁, 金川修造, 工藤宏一郎, 狩野繁之. 合併症のない熱帯熱マラリアにおけるアーテメター・ルメファントリン合剤の使用経験. 第 57 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 2008 年.
 - 有蘭直樹, Shedko M, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也. 極東における裂頭条虫症の主な原因寄生虫である *Diphyllobothrium nihonkaiense* 及び *D. klebanovskii* の異同と種内変異. 第 77 回日本寄生虫学会, 長崎, 2008 年.
 - 辻 俊史他 13 名 (有蘭直樹 13 番目). 大量下血を契機に診断した糞線虫症の 1 例. 第 64 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 神戸, 2008 年.
 - 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 有蘭直樹, 是永正敬, 熊沢秀雄, 橋口義久, 上田 弘, 畑中秀亮, 梅本博公. 大複殖門条虫症 4 例の虫体 DNA による診断. 第 64 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 神戸, 2008 年.
 - 阪上順一他 22 名 (有蘭直樹 22 番目). カプセル内視鏡を用いた日本海裂頭条虫の診断. 第 64 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 神戸, 2008 年.
 - 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 有蘭直樹. 消化器症状を引き起こす盲腸・大腸寄生の寄生虫. 第 17 回びわ湖国際医療フォーラム, 大津, 2008 年.
 - 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 有蘭直樹. 節足動物の刺咬・伝播により媒介される寄生虫症. 第 18 回びわ湖国際医療フォーラム, 大津, 2009 年
 - Nawa Y, Maruyama H. Clinical paragonimiasis and changing patterns in Japan. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Jeju (Korea), 2008.
 - Maruyama H, Yoshida A, Nishimaki A. Ascarid larva migrans: raw meat lovers' uninvited guests. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Jeju (Korea), 2008.
 - Nagayasu E, Doanh PN, Nishimaki A, Yoshida A, Horii Y, Nawa Y, Maruyama H. Serological determination of the causative species of human paragonimiasis. Forum Cheju 14. Jeju (Korea), 2008.
 - Yoshida A, Ohta N, Maruyama H. Depletion of CD4 + CD25 + FOXP3+ regulatory T cells down-regulates parasite clearance during early phase of *Plasmodium chabaudi* AS infection in A/J mice. 43rd US-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases. Tokyo (Japan), 2009.
 - 吉田彩子, 荒木潤, 畠山金太, 丸山治彦. ワタリコウガイビルによる偽寄生の 1 例. 第 77 回日本寄生虫学会大会, 長崎, 2008 年.
 - 吉田彩子, 太田伸生, 丸山治彦. CD4+CD25+制御性 T 細胞の *Plasmodium chabaudi* AS 感染に与える影響. 第 77 回日本寄生虫学会大会, 長崎, 2008 年.
 - 山内 (川浦) 稚代, 丸山治彦. ヴェネズエラ糞線虫の運動能力変化を支配する栄養成分の追求. 第 77 回日本寄生虫学会大会, 長崎, 2008 年.
 - 吉田彩子, 太田伸生, 丸山治彦. CD4+CD25+制御性 T 細胞の *Plasmodium chabaudi* AS 感染に与える影響. 第 38 回日本免疫学会大会, 京都, 2008 年.
 - 西牧亜奈, 有賀俊二, 安藤健二, 川嶋将司, 森本高太郎, 兼松孝好, 丸山治彦. 1 匹のマムシ

- を生食し、抗体検査によってひとりはドロレス顎口虫症、ひとりは Manson 孤虫症と診断された例。第 19 回日本臨床寄生虫学会，京都，2008 年。
- ・ 赤尾信明，吉川正英，丸山治彦，太田伸生，名和行文。臨床寄生虫学雑誌データベースの構築とその利用。第 19 回日本臨床寄生虫学会，京都市，2008 年。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

西洋ハーブ及び新一般用漢方処方構成生薬の品質確保 と評価に関する研究

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 西洋ハーブの品質確保と評価を目的として、ブラックコホッシュ、チェストツリー、イチヨウ葉等の確認試験法、分析試験法等について検討するとともに各種製品分析を行った。また、朮類生薬、党参、車前子に関し遺伝子情報による基原種鑑定法等を検討した。

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) アサヒビール(株)健康おいしさ研究所・
素材研究グループ 田頭素行
- (4) (株) 栃本天海堂品質管理部 山本 豊
- (5) (株) ウチダ和漢薬研究開発部 藤田正雄
- (6) (株) 島津製作所分析計測事業部ライフサイ
エンス研究所 西村直行
- (5) 名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学
分野教授 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教授 小松かつ子
- (7) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長
袴塚高志
- (8) エスエス製薬株式会社ライフサイエンス
インスティテュート製剤研究部製剤二課 廣
田浩之
- (9) 興和株式会社富士研究所 稲木俊男
- (10) 佐藤製薬株式会社製剤研究部分析研究課
木村博明
- (11) ゼリア新薬工業株式会社中央研究所コン
シューマヘルスケア研究部 小林正治郎
- (12) 大正製薬株式会社セルフメディケーショ
ン開発研究所分析研究室 日向野太郎
- (13) アサヒビール(株)健康おいしさ研究所・
コーポレート研究開発本部 神田智正
- (14) 麻布大学獣医学部准教授 森田英利

A. 研究目的

本研究は、一般用医薬品承認審査合理化等検討会の中間報告に対応し、欧州で医薬品として実績のある西洋ハーブについて、諸外国の承認規格を参考にしつつ、現代の科学水準に基づき、分析化学的、植物化学的に評価並びに品質規格に関し検討を行う。また、新一般用漢方処方構成生薬では、生薬の特性を考慮しながら、遺伝

子情報を利用した生薬の基原種鑑別法を開発し、医薬品である生薬の品質確保のための純度試験法、確認試験法等に応用することを目的として行う。このように、本研究は西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究と新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究に二分される。前者の研究は、既に通知(「外国において一般用医薬品として汎用されている生薬製剤を一般用医薬品として製造販売承認申請する際の取扱について」(薬食審査発第0322001号平成19年3月22日)に基づき承認申請がスタートした西洋ハーブ類並びに本通知に基づき今後承認申請が為される可能性のある西洋ハーブ類について品質確保を目的として行われるものである。また、後者の研究は、最終的に、本研究で確立された方法について日本薬局方等公的な試験法への応用まで視野にいたれたものである。

B. 研究方法

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

B-1 チェストツリー

1) 材料

欧州において一般用医薬品として流通するチェストツリー7製品は現地の薬局で購入したものを用いた。健康食品として市販されているチェストツリー8製品はインターネット経由で購入した。チェストツリーの植物体(葉)は独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部より提供を受けた。

2) HPLCによるフラボノイドの定量

欧州で医薬品として流通する7製品について、錠剤あるいはカプセルの内容物を振とうしながら水に溶かし、メタノールを加えて定容とし、メンブレンフィルター(0.45 μ m孔)でろ過した後HPLC分析に供した。カラムは逆相を用い、0.06 mol/L リン酸及びメタノールによるグラジエント溶出を行ない、348nmの検出波長により観察し

た。標準溶液として、Casticinのメタノール溶液(2 µg/mL)を調製して用いた。

3) 崩壊試験

欧州で医薬品として流通する3製品及びアメリカ及び我が国において健康食品として流通する8製品について、第15改正日本薬局方一般試験法に従って崩壊試験を行なった。錠剤あるいはカプセルのそれぞれ6検体について、水を試験液として検定し、カプセルについては補助盤を用いた。試験開始から所定の時間が経過した後、試料の崩壊の様子を観察し、試料の残留物を全く認めないか、又は認めても明らかに原形をとどめない軟質な物質であるとき、試料が崩壊したと判断した。

4) 遺伝子配列の解析

チェストツリーの葉を磨砕し、Qiagen社のDNeasy Plant Mini Kitを用いてDNA抽出を行った。このDNA溶液を鋳型に、核ゲノムリボソームRNAのITS領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、PCR増幅断片をダイレクトシーケンスで、あるいはクローニングした後に塩基配列を決定した。

5) マイクロアレイ解析

麻布大学森田らが明らかにした *Lactobacillus reuteri* の全ゲノム配列情報(全長2,039,414 bp、1,820 ORF)を元に、ロシュ・ダイアグノスティクス社が設計作成したマイクロアレイを利用して、チェストツリー処理を施した *L. reuteri* における遺伝子発現変動を解析した。チェストツリー処理細胞等から調製したtotal RNAサンプルより2本鎖cDNAを合成し、これを鋳型にCy3標識ランダムプライマーによる増幅を行い、マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。これを洗浄した後に蛍光信号のスキャンを行い、発現データを取得した。データの解析は解析ソフト「Nandemo Analysis」を用いて行った。

B-2 ブラックコホシュ

1) 材料

欧州において一般用医薬品として流通するブラックコホシュ1製品は現地の薬局で購入したものを用了。健康食品として市販されているブラックコホシュのうち、植物乾燥粉末の配合を謳う8製品をインターネット経由で購入した。ブラックコホシュ及びその近縁植物6種(*Cimicifuga japonica*, *C. simplex*, *C. dahurica*, *C. heracleifolia*, 及び *C. foetida*)の植物体(葉)は独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部より提供を受けた。

2) LC/CADによる成分分析

欧州で医薬品として流通するブラックコホシュ製品の錠剤を粉末とし、メタノールを加えて超音波下で抽出したものをHPLC分析に供した。カラムは逆相を用い、0.5%ギ酸及びアセトニトリルによるグラジエント溶出を行ない、CAD(コロナ荷電化粒子検出器)を検出器として観察した。

3) 遺伝子配列の解析

ブラックコホシュ及びその近縁植物の葉を磨砕し、Qiagen社のDNeasy Plant Mini Kitを用いてDNA抽出を行った。このDNA溶液を鋳型に、核ゲノムリボソームRNAのITS領域及び葉緑体DNAの *trn L-F* 領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、その増幅断片の遺伝子配列をダイレクトシーケンス法により決定した。

4) PCR-RFLP法による遺伝子鑑定法

ブラックコホシュ及びその近縁植物遺伝子のITS1領域の一部を、ITS1-Bst-S1及びITS2-Bst-AS2をプライマーとして増幅し、その遺伝子断片をMontage-PCR(Millipore)により精製した後、その一定量を制限酵素 *Bst* B Iにより消化した。この反応液をアガロースゲル電気泳動により分離した後、SYBR Gold染色を施して紫外線照射下に観察した。

5) ARMS法による遺伝子鑑定法

ブラックコホシュ及びその近縁植物6種より抽出したDNAを鋳型として、*trn L-F* 領域の一部分を増幅するPCRを行なった。Sense側のプライマーとして、ブラックコホシュ由来の *trn L-F* 領域の一部を特異的に認識するBC-*trn-S5-rase-CTA*及びブラックコホシュ以外の近縁6種由来の同領域を認識するBC-*trn-S8-CTC*を用い、またantisense側は、ブラックコホシュ及びその近縁6種を共通に認識するBC-*trn-AS1*を用いた。PCRのアニーリング温度は、ブラックコホシュ特異的増幅反応では63°C、そして、ブラックコホシュ近縁6種に特異的な増幅反応では66°Cに設定した。この反応液をアガロース電気泳動に供し、増幅断片の生成をEthidium bromide染色で確認した。

B-3 イチョウ葉

1) 材料

国内で流通するイチョウ葉エキス健康食品(錠剤11検体、カプセル4検体)及びイチョウ葉健康食品(フリーズドライ品:カプセル1検体)は小売店あるいはインターネット経由で購入した。また、ドイツで流通する一般用医薬品(錠剤1検体)を現地で購入して用いた。

2) LC/CADによる成分分析

分析検体の調製はドイツ薬局方に準じた。錠

品あるいはイチヨウ葉医薬品の粉末を、リン酸緩衝液 (pH5.8) に加え、20 分間攪拌した後、珪藻土カラムにロードし、リン酸緩衝液で洗浄した。酢酸エチルにて溶出させた画分を濃縮乾燥させ、残留物を 30%メタノールに溶解し、メンブレンフィルター (0.45 μm 孔) でろ過した後、HPLC 分析に供した。カラムは逆相を用い、溶媒はメタノール/水 (70/30) を基本とし、目的物質の溶出後にメタノールの組成を上げて wash out する系を構築し、CAD を検出器として観察した。標準溶液として、bilobalide (BB)、ginkgolide A (GA)、ginkgolide B (GB) 及び ginkgolide C (GC) をメタノールに溶解したものをを用いた。

〈新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究〉

B-4 朮類生薬

朮類生薬は、形態及び含有成分に基づく基原種鑑別が困難な生薬の一つであることから、既に、第十五改正日本薬局方第一追補、参考情報「遺伝子情報を利用した生薬の純度試験」において、ビャクジュツのソウジュツに対する純度試験法が示されている生薬である。参考情報では、ビャクジュツ及びソウジュツの基原植物である 4 種の *Atractylodes* 属植物を、核 rDNA ITS1 領域の塩基配列の違いに基づき、mutant allele specific amplification (MASA) 法により鑑別することを基礎にした方法が採用されている。しかしながら、本方法で採用されているシリカゲル膜を利用した DNA 調製法は、操作が煩雑なため、試験実施者の技術差が生じやすいこと、また、MASA 法は、PCR における鋳型 DNA とプライマーのアニーリング温度の僅かな違いを利用したものであるため、各試験機関での PCR 装置の精密な温度校正が要求されるなどの課題があった。最近、検体に DNA 抽出試薬を加え、インキュベーションを行うのみの簡易な方法で調製した DNA 溶液でさえも、PCR の鋳型に用いることを可能にする PCR 試薬が開発され、市販されている。昨年度、このような PCR 試薬を用いて、朮類生薬由来の DNA の増幅を行い、PCR-RFLP による鑑別を検討した結果、良好な結果が得られた。そこで、今年度は、実験条件の最適化を行い、作成した純度試験法案に基づき、7 機関による妥当性確認試験を行った。

1) 実験材料

試験対象としたソウジュツ及びビャクジュツは、受託企業 2 社より提供を受けた。この内、*A. lancea*, 7 個体; *A. chinensis* 及び *A.*

ovata, 10 個体; *A. japonica*, 20 個体について、試験方法と同一の方法により、予め基原植物の確認を行った。

2) 試薬

DNA の抽出には、SNET buffer (20 mM Tris/HCl pH8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 200 μg/mL Proteinase K) を用いた。この抽出試薬については、受託企業の一つが調製した同一ロットのものを各機関に配布し、使用した。DNA ポリメラーゼには、Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck) を、PCR 試薬には、Ampdirect plus (Shimadzu) を用いた。制限酵素、*FauI* 及び *MspI* は、いずれも New England BioLabs 社のものをを用いた。電気泳動は、E-gel (Invitrogen) を用いた。水は、Milli-Q Synthesis A10 (Millipore) で精製した超純水を 121°C, 20 min の条件でオートクレーブ滅菌したものをを用いた。なお、上記試薬類の内、電気泳動以降は送付検体の確認を行った機関が使用したものを記載した。

3) 機器

恒温槽, ドライ サーモ バス MG-200 (東京理化工業); 遠心機, KUBOTA1920 (Kubota); ボルテックスミキサー, TTM-1 (Shibata); サーマルサイクラー, DNA Engine PTC-200 (MJ Research, 現 Bio-Rad); 電気泳動装置, E-gel (Invitrogen); トランスイルミネーター, DT-20MCP (Atto); 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。

4) 試料の調製

基原植物を確認した各個体を 1-1.5 cm 角ほどの大きさに切断し、各機関に 25 検体を未知試料として送付した。25 検体の内訳は、*A. lancea*, 4 検体; *A. chinensis*, 6 検体; *A. japonica*, 8 検体; *A. ovata*, 7 検体とした。試験の性質上、試料は、各検体番号について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、*A. lancea* の 3 検体及び *A. japonica* の全検体で、各検体番号につき、2 種の個体を使用した。

5) DNA 試料溶液の調製

各検体の外皮を削り、除去した後、残った内部組織をナイフで細かく (厚さ 0.2 mm, 長さ 2 mm 程度) 削り、採取した。このもの、20 mg に SNET buffer 400 μL を加え、攪拌した後、55°C で、終夜 (16-18 hour)、incubation し、終了後、95°C, 5 min 加温し、Proteinase K を

失活させた。遠心 (15000 x g, 2 min) 上清を採取し、DNA 試料溶液とした。

6) プライマー

5' primer, 5' -GGC ACA ACA CGT GCC AAG GAA AA-3' ; 3' primer, 5' -CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C-3'。全てのプライマーは、テキサスジェノミクスジャパン (株) 製のゲルろ過精製グレードのものをを用いた。

7) PCR 条件

1 x Ampdirect plus, 0.5 μ mol/L 5' 及び 3' プライマー、0.5 unit Nova Taq Hot Start DNA ポリメラーゼを含む液に、各検体より調製した DNA 試料溶液 0.5 μ L を氷中で加え、全量を 20 μ L とし、反応を行った。温度条件は、以下の通りである : 95°C, 10 min; 95°C 0.5 min, 65°C, 0.25 min, 72°C, 0.25 min, 40 cycle; 72°C, 7 min。

8) 制限酵素処理及び DNA fragment の確認

8-1) *FauI*

酵素に添付の緩衝液及び 1.0 unit の *FauI* からなる液に、PCR 産物 3.0 μ L を氷中で加え、全量を 15 μ L とし、55°C, 2 hour incubation を行った。終了後、72°C, 10 min 加温し、酵素を失活させた。

8-2) *MspI*

酵素に添付の緩衝液及び 20.0 unit の *MspI* からなる液に、PCR 産物 3.0 μ L を氷中で加え、全量を 15 μ L とし、37°C, 2 hour incubation を行った。終了後、72°C, 10 min 加温し、酵素を失活させた。

8-3) Fragment pattern の確認

制限酵素処理断片の解析は、アガロースゲル電気泳動 (4%) により行った。試料とともに泳動するプロモフェノールブルー色素が原点から 2 cm 程度進んだところで、電気泳動を終了し、UV (312 nm) 照射下のエチジウムブロマイドの蛍光により DNA 断片を確認した。

9) 判定

改定試験法案では、バックジュツ 25 個体に番号を付し、各個体、個別に PCR-RFLP により基原種鑑別を行い、若い番号から順に、鑑別可能な 20 個体を選び、その中に不適合試料が幾つ存在するかで、純度試験の合否判定を行う。従って、PCR-RFLP による各個体の鑑別基準と純度試験の判定基準の二種の基準を定めた。しかし、今回の試験では、実験方法の妥当性の確認を目的にしたため、多くの不適合試料を未知検体に加えており、純度試験としての判定は、当然、不合格になる。このため、判定は、各検体の合否についてのみ行った。各個体の判定基

準は、下記の通りとした。

9-1) PCR 反応におけるブランク反応液に、プライマーダイマー (約 40 bp) を除くバンドを検出しない。もし、バンドが検出される場合は、PCR 溶液の調製の際に、外因性の DNA が混入したと判断し、PCR からやり直す。

9-2) どちらの制限酵素反応液においても、約 140 bp のバンド及びプライマーダイマー (約 40 bp) の他に、バンドを認めない場合、バックジュツと判断する。

9-3) 制限酵素 *FauI* 反応液において、約 80 及び 60 bp のバンドを認める時、*A. lancea* と判断する。

9-4) 制限酵素 *MspI* 反応液において、約 90 及び 50 bp のバンドを認める時、*A. chinensis* と判断する。

9-5) 制限酵素反応液において、プライマーダイマー (約 40 bp) の他に、いずれのバンドも認めない場合、PCR 産物が得られていないと判断し、その個体の基原種は、判定不能とする。

10) 試験の実施

今回の妥当性確認試験に参加した機関は、7 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。未知試料 25 検体、各プライマー、DNA 抽出試薬及び実施要項を各機関へ送付し、試験期間は約 2 ヶ月とした。結果は、各機関が判定基準に従い判定し、所定の様式により、試験実施者の氏名、PCR 実験の経験年数、使用機器、各検体の合否及び電気泳動像を回答として得た。

B-5 党参

党参はキキョウ科の *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、*C. pilosula* (Franch.) Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen.、*C. tangshen* Oliv. などの根に由来する漢薬で、強壯薬として食欲不振、疲労倦怠、咳嗽、口渴などに応用する他、中国では人参の代用品としての需要が多い。『中華人民共和国薬典』には党参の基原としてこれら 2 種 1 変種が記載されているが、地方的には四川省で *C. subglobosa* W. W. Sm.、四川、貴州、雲南省で *C. tubulosa* Kom.、四川、西藏自治区で *C. nervosa* Nannf. や *C. canescens* Nannf.、新疆ウイグル自治区で *C. clematidea* C. B. Clarke など使用される。そこで、*Codonopsis* 属植物の遺伝子多型に基づく同定法を開発する目的で、湖北省産の同属植物を用いて核 rDNA、ITS 領域の塩基配列を比較、検討した。

1) 実験材料

Codonopsis 属植物 2 種 16 検体 (*C. pilosula*

2 検体、*C. tangshen* 14 検体) 及び党参 7 市場品 13 検体。

2) 核 rDNA, ITS 領域の増幅と塩基配列の決定

各検体の葉または根から全 DNA を抽出し、これを鋳型にして核 ITS 領域を PCR 法で増幅した。使用したプライマーは ITS-1 (5'-TCC ACT GAA CCT TAT CAT TTA G-3') 及び 18S-25S-3'R (5'-CCA TGC TTA AAC TCA GCG GGT-3') の 2 種類。PCR 反応には、3' → 5' Exonuclease 活性のある正確性の高い東洋紡社の KOD-plus polymerase を使用した。反応条件は、ホットスタート 94°C 3 分、続いて熱変性 94°C 15 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 68°C 1 分の条件を 35 サイクル行い、最後に 72°C 7 分で終了した。得られた PCR 産物を精製後、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, U.S.A.) でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A.) で塩基配列を決定した。シーケンシング反応には、4 種類のプライマー ITS-1、18S-25S-3'R、In18S-25S-3'F (5' -TCT CGC ATC GAT GAA GAA CG-3'), In18S-25S-3'R (5'-GAC TCG ATG GTT CAC GGG ATT CT-3') を用いた。

B-6 車前子

車前草と車前子は日本薬局方ではオオバコ科のオオバコ (*Plantago asiatica*) のそれぞれ全草、種子であると規定されている。一方、中華人民共和国薬典では、オオバコに加えてムジナオオバコ (*P. depressa*) も基原植物として規定しているほか、セイヨウオオバコ *P. major*、エナガオオバコ (*P. hostifolia*)、*P. erosa* を基原とする生薬も市場に流通しているとされている。

これまでの 2 年間の研究において、各種オオバコ属植物の標本についてリボゾーム遺伝子の ITS 領域の塩基配列を解読し、その配列がいくつかのタイプに分かれること、配列タイプに基づいて種の同定が可能であることを明らかにした。さらに、この DNA 鑑別法を市場で入手した車前草に適用し、有用性を示した。また、この方法が車前子の DNA 鑑別にも適用が可能であることを示した。本年度は、中国および日本国内の市場において入手した車前子の市場品 22 検体について、DNA 鑑別を行うとともに、鑑別結果と各生薬の形質を比較することにより、鑑別指標として用いることのできる表現形質の探索を試みた。

1) 実験材料

中国市場で入手されたものを日本生薬連合

より提供していただき、使用した。

2) 核 rDNA, ITS 領域の増幅と塩基配列の決定

各検体より調製した genomic DNA を鋳型に用い、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。実際には、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。用いた PCR プライマーの塩基配列は以下の通りである。

Pla-rDNA1F:5' -GTTTTCCAGTCACGACCAAGGTT
TCCGTAGGTGAAC

Pla-rDNA1R:5' -ATTTAGGTGACACTATAGAATACG
ATATGCTTAAACTCAGCGG

Pla-rDNA2F:5' -GTTTTCCAGTCACGACCGTAGCG
AAATGCGATAC

Pla-rDNA2R:5' -ATTTAGGTGACACTATAGAATACG
GGCGCAACTGCGTTCAA

(下線部は、塩基配列解読用の蛍光標識プライマーの配列)

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。

3) TLC 分析

各試料の粉末約 2g に methanol 10 mL を加え、5 分間超音波抽出した。抽出液をろ過して得た液を試料液とした。Silica gel 60F254 プレート (Merck) にスポットし、n-Butanol-water-acetic acid (7:2:1) を移動層として展開した。検出には、4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid 試薬を用いた。

<倫理面への配慮>本研究では、ヒト由来サンプル及び実験動物を使用していないため、該当する事由はないと考える。

C. 研究結果

C-1 チェストツリー

1) HPLC によるフラボノイドの定量

欧州で医薬品として流通する 7 製品について、欧州薬局方において指標成分に指定されているフラボノイド (Castisin) の定量分析を行なった。6 製品の Castisin 含量は極めて良く揃っており、ラベル記載のエキス濃縮比に従って算出した原生薬中の Castisin 含量は、欧州薬局方におけるチェストツリー果実 (AGNUS CASTUS FRUIT) における含量規格を満足させるもので

あった。

2) 崩壊試験

欧州で医薬品として流通する3製品及びアメリカ及び我が国において健康食品として流通する8製品について、崩壊試験を行なったところ、医薬品3製品についてはすべて日本薬局方の判定基準内で崩壊した。一方、錠剤の健康食品4製品のうち1製品は判定基準(60分)内に崩壊せず、ほとんど原形のままであった。さらに、カプセル状の健康食品4製品のうち1製品は、最終的には崩壊したが、判定基準(20分)は満たさなかった。

3) 遺伝子配列解析による偽遺伝子の発見

チェストツリーの核ゲノムリボソームRNAのITS領域について、PCR増幅断片のダイレクトシーケンシングを行なったところ、様々な配列が混在することによりシーケンサーの波形が乱れ、解析不能であった。そこで、PCR増幅断片を一旦クローニングし、それぞれのクローンを個別に配列解析したところ、機能性のITS遺伝子と共に、機能性遺伝子と比較してGC含量が低く、エネルギー的に二次構造が不安定な偽遺伝子が多数検出された。偽遺伝子としてのITS領域には、塩基の置換だけでなく、一定の長さの配列の脱落や挿入も確認された。

4) 腸内細菌 *L. reuteri* に対する影響

L. reuteri はヒト腸内に常在するいわゆる善玉菌であり、その全ORFsをカバーする1,866遺伝子を搭載したマイクロアレイを用い、チェストツリーエキスの遺伝子発現に及ぼす影響について解析した。本マイクロアレイの結果は、年度末に得られたため、現段階では解析を行っておらず、結果報告は、来年度の報告書で行う。

C-2 ブラックコホシュ

1) LC/CADによる成分分析

一般用医薬品として流通するブラックコホシュ製品を欧州薬局方案の定量法に準じた条件でHPLCにより分離し、CAD(コロナ荷電化粒子検出器)を検出器として観察した。多少ベースラインの上昇とうねりは観察されたが、欧州薬局方案における指標成分であるactein及び27-deoxyacteinを含むピークの分離は良好であった。

2) 遺伝子配列の解析

ブラックコホシュ及びその近縁植物6種について、分子系統学的鑑定に良く利用される核ゲノムリボソームRNAのITS領域及び葉緑体DNAの

3) PCR-RFLP法による遺伝子鑑定

ITS1領域に見出されたブラックコホシュ特異的な変異部位のうち、*Bst* B Iの制限酵素認識配列と重複しているものを標的として、PCR-RFLP法による遺伝子鑑定法を確立した。本PCR-RFLP法は、ブラックコホシュとその近縁植物6種を明確かつ簡便に識別した。

4) ARMS法による遺伝子鑑定法

trn L-F領域に見出されたブラックコホシュ特異的な変異部位のうちの1つを標的として、ARMS法による遺伝子鑑定法を確立した。すなわち、ブラックコホシュ特異的に認識するプライマーセットと近縁植物6種を特異的に認識するプライマーセットをそれぞれ設計し、前者を用いたPCRによりブラックコホシュのみで増幅産物を生成させ、後者を用いたPCRにより近縁植物6種のみで増幅産物を生成させ、ブラックコホシュとその近縁植物を明確かつ簡便に識別することに成功した。

5) 遺伝子鑑定法による健康食品の品質評価

健康食品として市販されているブラックコホシュのうち、植物乾燥粉末の配合を謳う8製品についてDNAを抽出し、前項までに記述した遺伝子鑑定法を適用した。PCR-RFLP法において、ITS1領域の一部をPCRにより増幅し、アガロース電気泳動によって観察したところ、8製品のうち7製品から441bpの増幅断片が観察されたが、1製品からはITS1遺伝子が検出されず、この製品は植物粉末を含有しない可能性が示された。これらのPCR反応物を精製後、*Bst* B Iにより消化したところ、5製品では期待される307bpと134bpの切断断片が観察され、正しくブラックコホシュに由来することが示唆されたが、2製品では441bpのまま切断されず、ブラックコホシュ以外の植物に由来する製品と推測された。一方、ARMS法において、ブラックコホシュの

C-3 イチョウ葉

1) LC/CAD によるテルペンラクトン定量法の確立

ドイツ薬局方の定量法を参考にしつつ、イチョウ葉エキス製品の HPLC による品質評価法として、CAD を検出器とするテルペンラクトン定量分析法を新規に構築した。メタノール及び水の組成で分離を検討したところ、メタノール/水 (30/70) の条件で標準物質の分離が良好であることが分かった。ただし、Isocratic 溶出では全成分が出るまで 90 分以上掛かるため、目的物質の溶出後にメタノール濃度を上げて wash out することとし、再平衡化まで含めて 40 分で終了するプログラムを構築することができた。両対数プロットにより標準溶液の検量線を作成し、最小 2 乗法により相関係数を算出したところ、いずれの標準物質についても標準係数は 1 であり良好であった。また、検出限界 (LOD) は 0.087~0.45ppm、定量限界 (LOQ) は 0.29~1.5ppm、併行精度 (RSDa) は 1.4~2.7%、室内再現精度 (RSDb) は 1.3~4.8% であり、精度・感度についても良好な結果であった。

2) イチョウ葉関連製品の成分分析

イチョウ葉エキス健康食品、イチョウ葉健康食品及び一般用医薬品を試料とし、前項で確立した LC/CAD による分析法を用い、テルペンラクトン成分の定量を行なった。得られた定量結果をもとに、1 日摂取目安量 (摂取目安量に幅があるものは最大量) あたりのテルペンラクトン含量 (BB+GA+GB+GC) を算出した。ドイツ医薬品規格における 1 日摂取目安量あたりのテルペンラクトン含量 (BB+GA+GB+GC) を算出すると 12~17mg/day となるが、この数値と比較すると、16 種類の健康食品のうち 14 試料はドイツ医薬品規格の範囲内あるいは概ね近い値であった。一方、2 試料は医薬品規格と比較して著しくテルペンラクトン含量が少なかった。〈新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究〉

C-4 朮類生薬

全試験実施機関において、大きなトラブルも無く、期間内に試験を終了した。結果は、全機関において判定不能試料も無く、全ての試料で正しい回答を導くことが出来た。試験実施者 7 名の PCR 実験の経験年数は、0-10 (平均 5.7) 年で、この内 2 名は経験年数 0 年だった。

C-5 党参

1) *Codonopsis* 属植物 2 種の ITS 領域の塩基配列

党参の基原種とされる *C. pilosula* 及び *C.*

tangshen の 2 種 16 検体について核 ITS 領域の塩基配列を決定し、比較した。全検体において、ITS 領域の全長は 655 bp であり、その内 ITS1 領域は 257 bp、5.8S rRNA 遺伝子領域は 163 bp、ITS2 領域は 253 bp であった。ITS1 及び ITS2 領域では多数の塩基置換が認められたが、5.8S rRNA 遺伝子領域では 1 箇所のみであった。

解析した 2 種 16 検体では、8 タイプの塩基配列が認められた。*C. pilosula* の 2 検体は同一の配列 (タイプ P-I) を示し、GenBank に登録されている同種の配列 (Acces. No. EF190460) とは、上流から 122 番目及び 226 番目の 2 箇所に塩基置換が認められ、これらの位置では Cytosine (C)/Thymine (T) の 2 重ピークが観察された。*C. tangshen* の 14 検体では、7 タイプ (タイプ T-I~T-VII) の塩基配列があり、いずれの配列も GenBank に登録されている同種の配列 (Acces. No. EF190462) とは異なっていた。多くの検体で、1 箇所又は多数の箇所において、2 重ピークが観察されるヘテロ型の塩基が認められた。4 検体のみ、Acces. No. EF190462 の配列とそれぞれ 2 塩基が異なる 2 タイプ (タイプ T-I と T-II) のホモ型の塩基配列を示した。タイプ T-I とタイプ T-II では、1 箇所の塩基置換があり、上流から 135 番目の塩基がそれぞれ Guanine (G) と Adenine (A) であった。タイプ T-III の塩基配列ではこの箇所の塩基が A/G (R) のヘテロ型であった。タイプ T-IV~T-VII の配列では、全領域に亘って 30 箇所以上のヘテロ型の塩基が認められた。

2) 党参市場品の ITS 領域の塩基配列

日本の 2 市場品 5 検体及び中国湖北省の 5 市場品 8 検体について、ITS 領域の塩基配列を決定し、植物材料の解析結果と比較した。東京市場品 (貴州省産) では同一ロットから 3 検体、大阪市場品 (甘肅省産) では同一ロットから 2 検体を取り、解析した。その結果、東京市場品では 3 検体のうち 1 検体 (D6a) は GenBank に登録されている *C. pilosula* var. *modesta* (Acces. No. EF190460) の塩基配列と完全に一致し、他の 2 検体 (D6b, D6c) は本研究で解析した *C. pilosula* と同一配列を持っていた (タイプ P-I)。大阪市場品の 2 検体はともに配列の 441 番目に C/T (Y) の 2 重ピークが見られ、122 番目には 1 検体 (D7a) で T、1 検体 (D7b) で C/T の 2 重ピークが見られた。本研究で解析した *C. pilosula* の配列とは 2 箇所又は 3 箇所の塩基で違いが認められた。

中国湖北省の 5 市場品では、D5、D4 及び D2 の市場品がそれぞれタイプ T-I、T-II 及び T-III

の塩基配列を示した。D3 の市場品はほぼ同じ塩基配列であったが、a、b の検体はタイプ T-III、c、d の検体は 489 番目に C/T (Y) の 2 重ピークが認められた (タイプ T-III')。市場品 D1 では、いずれの塩基配列とも一致しなかったが、タイプ T-I とは上流から 489 番目と 500 番目に置換があり、それぞれ C/T (Y) と G/A (R) の 2 重ピークが観察された。

C-6 車前子

1) 車前子の遺伝子鑑別

車前子の市場品 22 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、Shas12 が type A1、Shas1~5 および Shas8、9、11、14~22 が type A2、Shas7 が type A3 の配列を示し、これらはオオバコ (*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、Shas6、10、13 の 3 検体は type M2 の配列を有しており、いずれもセイヨウオオバコ (*P. major*) を基原とするものであった。中華人民共和国薬典で車前子の基原植物として規定されているムジナオオバコ (*P. depressa*) を基原とするものは見出せなかった。

2) 車前草の形質と遺伝子鑑別結果との関係

本実験で用いた車前子の表現形質と遺伝子鑑別の結果を 22 検体について比較検討した。表現形質としては、100 粒重を測定するとともに、確認試験の結果を参考に示した。その結果、セイヨウオオバコ (*P. major*) の種子と同定された 3 検体の 100 粒重は 24 ± 5.0 g であるのに対して、オオバコと同定された検体の 100 粒重は 53 ± 6.2 g であり、セイヨウオオバコ基原のものよりも、有意に大きかった。一方、確認試験と純度試験はいずれも「適合」と判定されていた。各検体の methanol 抽出液について TLC 分析を実施したところ、セイヨウオオバコと同定された 3 検体では $R_f=0.7$ 付近に明瞭な赤いスポット (plantagoside?) を認めたが、オオバコと同定された検体ではこのような赤いスポットを検出できるものはなかった。

D. 考察

<西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究>

D-1 チェストツリー

前年度、欧州で流通する医薬品及び我が国に流通するチェストツリー健康食品について TLC 及び HPLC による確認試験を行ない、成分プロファイルには紛れがないものの、成分含量については医薬品と健康食品の間に著しい差異があり、定性的な観察ではあるが、医薬品の 100

倍量近くの成分含量を有する健康食品があることを報告した。今年度は、欧州薬局方に従ってフラボノイド Castisin の定量分析を行ない、欧州に流通する医薬品は、少なくとも Castisin の含量に関して非常に高度に規格化されていることが明らかとなった。

また、水を試験液として崩壊試験を行なった結果、欧州に流通する医薬品は日本薬局方の判定基準内で速やかに崩壊したが、健康食品の中には判定基準内に全く崩壊しないものが観察された。健康食品の場合、製品設計時及び品質管理において崩壊性は必ずしも考慮する必要がないため、医薬品との品質の差が如実に表れることになった。このような点を考慮すると、チェストツリーは積極的に一般用医薬品として流通させていく必要があるものと考えられる。

さらに、前年度にチェストツリーの核ゲノムリボソーム RNA の ITS 領域を標的とする PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定法の確立を報告したが、その際、制限酵素 *Bbe* I による切れ残りが常に生じることを観察していた。そこで、本年度、当該領域の PCR 増幅産物の塩基配列を決定したところ、ダイレクトシーケンシングでは解析不能なほど様々な配列が混在していることが分かった。そこで、PCR 増幅産物をクローニングして配列解析を行なったところ、チェストツリーの ITS 遺伝子プールには多数の偽遺伝子が蓄積していることが明らかとなった。偽遺伝子のうちの一定数は、*Bbe* I により認識されるべきチェストツリー特異的変異部位に変異を抱えているため、*Bbe* I により認識されなくなり、*Bbe* I を利用した PCR-RFLP 法において切れ残りが発生したものと考えられる。リボソーム RNA 遺伝子はゲノム上に多数散在するマルチコピー遺伝子であり、それぞれの配列は協調進化によって極めて高い相同性を有していることが一般的であるが、チェストツリーの場合は、進化上のある時点よりリボソーム RNA 遺伝子に多数の偽遺伝子が出現し、協調進化の原則が崩れたものと推測される。リボソーム RNA 遺伝子における協調進化の崩壊が発見されたのは初めてではないが、極めて稀なケースであり、植物の分子系統学上、大変興味ある知見である。一方、*trnK* 領域はシングルコピー遺伝子であることから、切れ残りが生じる可能性は考えられず、遺伝子鑑定法の標的として ITS 領域よりも優れていると思われる。

D-2 ブラックコホシュ

ブラックコホシュの特徴的成分はトリテル

ペン配糖体であるが、トリテルペンは UV 吸収が弱く、一般に UV 検出器による HPLC 分析が困難である。これに対して、前年度、ELSD (蒸発光散乱検出器) によって感度良く検出できることを示したが、今年度は、CAD による分析を試みた。CAD は球状微粒子とコロナ電極により荷電化された窒素イオンとを衝突させることで、分析成分粒子表面をプラスに帯電させ、この電荷量を電流値として測定することを原理としており、ELSD と同様に化学構造や性質に関わらず全ての揮発性成分の検出が可能であり、しかも ELSD より感度が良好とされている。結果として、ベースラインが少々乱れるものの、ELSD を凌ぐ感度でトリテルペン配糖体を検出することができた。ベースラインの問題は、サンプルの前処理を工夫することで解決を試みる予定である。

前年度における TLC 及び LC/ELSD による分析結果から、健康食品として市販されているブラックコホシュ製品のうち、植物成分を含有しないと考えられる製品、及びブラックコホシュ以外の植物に由来する製品の存在が示唆されていたが、今年度、これらの製品のうち、植物乾燥粉末の配合を謳う 8 製品について遺伝子鑑定を適用したところ、TLC 及び LC/ELSD による分析結果と全く一致する鑑定結果が得られ、ブラックコホシュ製品の基原植物同定における本遺伝子鑑定法の有用性を示すことができた。また、予備的実験での結果であるが、ブラックコホシュ以外の植物に由来すると判定された 2 製品について、その ITS 領域及び *trn* L-F 領域の遺伝子配列を解析したところ、この製品はブラックコホシュの近縁植物である *Cimicifuga dahurica* に由来することが分かった。この *C. dahurica* は、我が国において医薬品として扱われている升麻の基原植物であり、同植物の誤用は安全性の面で大変に問題が大きいものと思われる。さらに、ブラックコホシュに起因する肝障害発生の事例が報告されたことから、米国薬局方ダイエタリーサプリメント情報専門家委員会はブラックコホシュ製品の表示に関連する注意書きを要請し、欧州医薬品庁も肝障害の兆候があればブラックコホシュの摂取を止めて医師に相談するように声明を発表している。日本ではブラックコホシュまたはこれを含む食品を摂取したことによる健康被害事例は報告されていないが、2006 年 8 月に厚生労働省食品安全部基準審査課新開発食品保健対策室からも「海外におけるブラックコホシュの利用に関する注意喚起について」という声明が発表

されている。このような点を考慮すると、安全性の観点からブラックコホシュも、チェストツリーと同様、積極的に一般用医薬品として流通させていく必要があるものと考えられる。

D-3 イチョウ葉

前年度、健康食品あるいは一般用医薬品として流通するイチョウ葉製品について、TLC によりフラボノイド類及びテルペンラクトン類の成分分析を行ない、ドイツ一般用医薬品の成分パターンと近いものと、それ以外の 2 種に分類した。今年度は、個々の成分の含有量を把握して品質評価することを目標とし、LC/CAD による新規成分定量法を確立した上で、テルペンラクトン類の定量分析を行なった。イチョウ葉エキスは欧州において、血管・血液の老化にともなう諸疾患、脳機能障害の予防と改善に医薬品として用いられている。その標準化エキス EGb761 は「総フラボノイド類 24%以上、総テルペンラクトン類 6%以上を含む」という規格設定がなされている。しかしながら、有効成分の個別の規格化はされておらず、我が国での医薬品としての品質管理を念頭に置いた場合、活性成分プロファイルの解明と規格の上乗せが望まれる。欧州薬局方案では、テルペンラクトン定量法として示差屈折計検出による逆相 HPLC 分析 (LC/RID) が示されているが、LC/RID は周辺温度の影響を受けやすく、感度が低く、グラジエント溶出が行えない等の欠点を抱えているため、新規分析法として LC/CAD による品質評価法を構築した。CAD は RID と比較して測定中のベースラインの安定性も高く、多くの検体の定量分析を安定的かつ迅速に行なうことが可能となった。

本品質評価法を用いて、我が国に流通するイチョウ葉健康食品の成分分析を行なったところ、大半はドイツ医薬品規格の範囲内あるいは概ね近い値であったが、中には著しくテルペンラクトン含量が少なく、消費者にとって不利益となる可能性がある製品が市場に存在することが判明した。欧州で流通するイチョウ葉医薬品のエキス原料である EGb761 等は高度に規格設定されており、ギンコール酸などの有害物質の除去にも注意が払われているが、製法やエキスの由来が異なるものは有害物質の純度試験等が適切に行なわれている保証はなく、イチョウ葉も積極的に一般用医薬品として流通させていく必要があると考えられる。

<新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究>

D-4 朮類生薬

今回の研究結果から、PCR-RFLP による朮類生薬の鑑定法は、試験実施者の技術力、使用実験装置によらず、全機関で、同一の結果を導くことが出来、高い精度と頑健性を有する優れた方法であることが確認出来た。

D-5 党参

1) *Codonopsis* 属植物 2 種の ITS 領域の塩基配列

GenBank に登録された *C. pilosula* の ITS 領域の塩基配列と一致するものは今回の材料中には存在しなかった。*C. pilosula* の ITS 領域の配列には産地による差異がありそうであった。今回は湖北省産の同種の配列 (タイプ P-I) が明らかになり、この配列は貴州省産党参 (東京市場品) の 2 検体と一致した。甘肅省産党参 (大阪市場品) は、この配列と 2 または 3 箇所塩基が異なったが、形態的に *C. pilosula* の系統であると考えられた。産地特異性を詳細に検討する必要があるが、現段階では上流から 489 番目の塩基が Thymine であることが、*C. pilosula* の系統を特徴付けるものと考えられた。*C. pilosula* は中国各地で栽培されていることから、それらの遺伝子多型に興味を持たれた。

2) 党参市場品の ITS 領域の塩基配列

湖北省は、板橋党参や五峰党参の産地として知られ、その基原種は *C. tanshen* であることが報告されている。今回北部の神農架周辺の野生品及び栽培品を収集して ITS 領域の配列を検討した結果、7 タイプの遺伝子型が認められた。4 タイプについては DNA Polymerase を変えて PCR を行い、塩基配列を再度検討する予定であるが、3 タイプ (T-I, T-II, T-III) については次のように考えられた。タイプ T-I の配列を示した植物材料はその植物形態から明らかに *C. tanshen* と考えられるが、タイプ T-II の配列を示した材料は葉が大型であり、*C. tanshen* ではなく *C. henyi* Oliv. である可能性も考えられた。タイプ T-III は、タイプ T-I と T-II のハイブリッド型であり、このタイプは栽培品のみならず野生品にも認められたことから、この植物は上記 2 種の自然交配により生じたものであると考えられた。湖北省市場品においてもこれら 3 タイプが認められ、さらに D1 のように 3 タイプ以外の配列も認められたことから、タイプ T-V や T-VI を考慮すると、*C. tanshen* には別のジェノタイプも存在する可能性が考えられた。*C. tanshen* についてもさらに検体を増やして検討する必要がある。

なお、*C. pilosula*、*C. tangshen* の異なる

ITS 領域の塩基配列を持つ 3 検体を用いて、葉緑体 DNA の *petB-petD* 領域、*trnH-psbA* 領域の塩基配列を解析し、比較したが、種間、種内において差異は認められなかった。

D-6 車前子

これまでの研究成果を基礎に、市場で入手した中国産車前子の遺伝子鑑別を試みた。その結果、3 検体のみがセイヨウオオバコを基原とするものであり、その他はすべてオオバコを基原とするものであった。車前草では、中国市場品にはオオバコを基原とするものの他に、ムジナオオバコ、セイヨウオオバコ、*Plantago erosa* などを基原とするものが多数存在していたが、これと比べると車前子では大多数がオオバコを基原とするものであり、基原的には安定していることがうかがえた。

車前子からは、Ampdirect Plus を用いて PCR の鋳型となりえる DNA が容易に調製できるので、DNA 鑑別法は車前子の基原同定法として有用であると考えられる。

セイヨウオオバコを基原とするものは、オオバコを基原とするものと比較して有意に 100 粒重が小さかった。また、TLC 上でオオバコを基原とするものには赤いスポットを認めた。これらの指標を 1 次マーカーとして用いた上で、怪しいものについて DNA 鑑別を行うという手順をとることが可能かもしれない。この点については、今後ムジナオオバコや *Plantago erosa* などを基原とする車前子入手して、より詳細な検討が必要である。

E. 結論

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

chestsutree の品質確保のため、医薬品あるいは健康食品として流通する製品の崩壊性について検討したところ、60 分経過しても水中でほとんど崩壊しない錠剤が見つかり、その他にも日本薬局方の崩壊試験の判定基準を満たさないものが検出された。ブラックコホシでは、分子遺伝学的手法による確認試験法を確立し、TLC 及び HPLC による化学的分析による確認試験法と組み合わせることにより、基原植物を特定するための確認試験法として有効に機能することを示した。イチョウ葉については、LC/CAD を用いた新規分析法を確立した。本分析法を適用して、我が国に流通するイチョウ葉健康食品の成分分析を行なったところ、ほとんどは欧州の医薬品規格と同等のレベルであったが、中にはテルペンラクトン含量が著しく少ないものもあることを明らかにした。なお、ここで