

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)との緊密な関係を生かしている。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。また、平成22年4月より新研究班発足を予定しているが、国内未承認薬の使用に関して、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)」に規定する臨床研究保険の契約も行い、同倫理指針の完全遵守を徹底する。

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

- ・ Furuta T, Kimura M, Watanabe N. Elevated levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)-2 in human malaria. *Am J Trop Med Hyg* 82:136-139, 2010.
- ・ 木村幹男. 原虫と寄生虫感染症. 脳マラリア. *Clinical Neuroscience* 28:319-321, 2010.
- ・ 木村幹男. マラリア(バベシア症を含む). 今日の治療指針, 医学書院, pp209-210, 2010年
- ・ 木村幹男, 名和行文. 抗原虫薬・抗蠕虫薬. 治療薬ハンドブック 2010, じほう, pp1265-1269, 2010年
- ・ 加藤康幸. Editorial 輸入感染症. *medicina* 46:621, 2009.
- ・ 加藤康幸. 海外渡航歴と重症感染. *Intensivist* 2:91-102, 2010.
- ・ Akiyama T & Ohta N. Parasite-specific antibody profile in the aqueous humor of rabbits with ocular toxocariasis. *Parasitol Int*, in press (E-pub in December 2009),

2010.

- ・ Arizono N, Yamada M, Nakamura-Uchiyama F, Ohnishi K. : Diphyllobothriasis associated with eating raw pacific salmon. *Emerg Infect Dis.* 15:866-70, 2009
 - ・ Nara T, Katoh N, Inoue K, Yamada M, Arizono N, Kishimoto S. : Eosinophilic folliculitis with a *Demodex folliculorum* infestation successfully treated with ivermectin in a man infected with human immunodeficiency virus. *Clin Exp Dermatol.* 34:e981-3, 2009
 - ・ 有菌直樹: アニサキス症、今日の治療指針, 219, 2010
 - ・ 丸山治彦 (2009) 胆道寄生虫症 (内科学書改訂第7版 vol.4 消化管・腹膜疾患・肝・胆道・膵疾患. p.334-335.) 中山書店(東京)
 - ・ 丸山治彦 (2010) 鉤虫症(十二指腸虫症)(今日の治療指針2010、山口徹、北原光夫、福井次矢編)、pp.214-215、医学書院(東京)
 - ・ Senba Y, Tsuda K, Maruyama H, Kurokawa I, Mizutani H, Taniguchi Y. (2009) Case of creeping disease treated with ivermectin. *J Dermatol.* 36: 86-89.
 - ・ Enko K, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K, Ichiba S, Ujike Y, Nawa Y, Maruyama H, Ohe T, Kusano KF. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis* infection. *Circ J.* 73: 1344-1348.
- ### 2. 学会発表
- ・ Kimura M, Tada Y, Okabe N. Travelers' risk of malaria by destination country: a study from Japan. 11th Conference of the International Society of Travel Medicine, Budapest, 2009.
 - ・ Namikawa K, Kimura M, Ouchi K, Iida T. Problems of immunizations in Japanese travelers to developing countries. 11th Conference of the International Society of Travel Medicine. Budapest, 2009.
 - ・ 木村幹男. 「感染症講座, 輸入感染症シリーズ」. マラリア. 第83回日本感染症学会総会学術講演会, 2009年.
 - ・ 木村幹男. シンポジウム「再興感染症と輸入感染症」. 脳マラリア. 第14回日本神経感染症

- 学会学術集会, 2009年.
- 木村幹男. シンポジウム「渡航医学(旅行医学, トラベルメディスン)の現状」. 渡航医学の特徴とジレンマ. 第50回日本熱帯医学会大会, 2009年.
 - 加藤康幸, 水野泰孝, 竹下望, 氏家無限, 金川修造, 工藤宏一郎, 狩野繁之. 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50回日本熱帯医学会大会, 2009年.
 - 加藤康幸, 氏家無限, 竹下望, 水野泰孝, 金川修造. 熱帯熱マラリア軽快退院後に発熱と貧血の増悪を来した一例. 第50回日本熱帯医学会大会, 2009年.
 - 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 大西弘太郎, 有菌直樹, 河原 敦, 山本博文, 児玉常憲, 森田 豊, 田代弘治: サル条虫 *Bertiella studeri* 感染の2症例. 第20回日本臨床寄生虫学会 2009年(大阪)
 - 岩井泰博, 大石哲也, 山田 稔, 有菌直樹, 長谷川英男: 大腸漿膜下に腫瘤を形成した腸管外アニサキス症の1例. 第20回日本臨床寄生虫学会 2009年(大阪)
 - 有菌直樹, 山田 稔, 手越達也, 大西弘太郎, 武田和敏: *Anisakis simplex* complex の種鑑別のための real-time PCR 法の検討. 第65回日本寄生虫学会西日本支部大会 2009年(大阪)
 - 有菌直樹, 山本喜啓, 細川洋平, 堤 啓, 楊孝治: イヌ鉤虫によると考えられる大腸好酸球性膿瘍の1例. 第50回日本熱帯医学会 2009年(沖縄)
 - 長安英治, 吉田彩子, 西牧亜奈, 柳川紗弥香, 丸山治彦. ベネズエラ糞線虫の感染幼虫に発現している遺伝子の解析(ワークショップ「寄生蠕虫の宿主内環境への適応」) 第78回日本寄生虫学会大会, 2009年3月27-28日, 法政大学市ヶ谷キャンパス(東京)
 - 吉田彩子, 長安英治, 太田伸生, 丸山治彦. CD4+CD25+制御性T細胞の *Plasmodium chabaudi* AS 感染における原虫排除機構に対する影響 第78回日本寄生虫学会大会, 2009年3月27-28日, 法政大学市ヶ谷キャンパス(東京)
 - 丸山治彦. 皮膚病変を来す寄生虫症(教育講演: ハンセン病, 抗酸菌感染症と寄生虫感染症) 第108回日本皮膚科学会総会, 2009年4月24-26日, 福岡国際会議場(福岡市)
 - 長安英治, 吉田彩子, 丸山治彦. 発現遺伝子解析によるベネズエラ糞線虫の感染幼虫の生物学的分析. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 2009年5月10-12日, ワールドコンベンションセンターサミット(宮崎市)
 - 吉田彩子, 堀井洋一郎, 丸山治彦. ブタ回虫肺移行期幼虫 cDNA ライブラリーの構築と解析~新規 C-type レクチン遺伝子の同定~ 第20回日本生体防御学会学術総会, 2009年7月25-26日, 東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京)
 - Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu, Yoichiro Horii, Haruhiko Maruyama: Gene expression analysis of lung stage larvae of *Ascaris suum*, the swine large intestinal roundworm. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 8-11, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan
 - 丸山治彦 臨床検査で遭遇する寄生虫(特別講演)平成21年度日本臨床衛生検査技師会形態検査部門研究会, 2009年9月20-21日, 宮崎大学医学部(宮崎県清武町)
 - 丸山治彦 寄生虫の謎に挑む(シンポジウム) 第62回日本寄生虫学会南日本支部大会, 2009年11月7-8日, 福岡大学(福岡市)
 - 長安英治, 吉田綾子, 丸山治彦. Analyses of an astacin-like zinc metalloprotease of *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, パシフィコ横浜(横浜市)
 - 吉田彩子, 大岡唯祐, 長安英治, 堀井洋一郎, 林哲也, 丸山治彦. Analysis of expressed sequence tags from the migratory larvae cDNA library of the parasitic nematode *Ascaris suum*. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, パシフィコ横浜(横浜市)
 - 長安英治, 伊藤武彦, 小椋義俊, 吉田彩子, 林哲也, 丸山治彦. 第2世代シーケンサによるベネズエラ糞線虫ゲノムの解析 第8回感染症沖縄フォーラム, 2010年2月11-13日, 沖縄国民年金健康センター(宜野湾市)
 - 川合 寛, 春木 宏介, 千種 雄一. 人獣共

通感染性・サルマラリア原虫に対する市販マ
リア診断キットの反応 第69回日本寄生虫学会
東日本支部大会 平成 21 年 10 月 3 日

- ・ 林 尚子、桐木 雅史、春木 宏介、千種 雄
一. 住血吸虫症の遺伝子診断法の開発 第 37 回
獨協医学会平成 21 年 12 月 5 日
- ・ 春木宏介. 教育講演Ⅲ 寄生虫 update 第 21
回日本臨床微生物学会総会 平成 22 年 1 月 30
日

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
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨 西洋ハーブの品質確保と評価を目的とし、チェストツリー、ブラックコホシユ、イチョウ葉、ビルベリー等の各種試験法について検討した。また朮類生薬、刺五加、半夏、天南星、党参、車前子等の生薬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, 中川 誠
- (3) アサヒビール(株)未来技術研究所 庄司俊彦, 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 井藤正人, 廣田浩之
- (9) 興和株式会社富士研究所 稲木敏男
- (10) 佐藤製薬株式会社製剤研究部分析研究課長 沢泰司, 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) 湧永製薬株式会社ヘルスケア研究所分析科学研究室 市河 誠
- (14) 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, 食の安全研究所 望月直樹
- (15) 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(JP)等公的な試験法への応用まで視野にいられたものである。

B. 研究方法

<西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究>

近縁植物を含めたチェストツリー、ブラックコホシユ及びビルベリーの植物材料(葉あるいは果実)は、それぞれ、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の種子島研究部、筑波研究部及び北海道研究部より提供を受けた。上記3種にイチョウ葉を加えた西洋ハーブ製品のうち、医薬品として欧州に流通するものは現地の薬局より入手し、健康食品として我が国に流通するものは主にインターネットを介して購入した。TLCあるいはHPLCによる確認試験、及びHPLCによる成分定量は、欧州薬

局方及び米国薬局方等の方法に準じて行った。チェストツリー、ブラックコホシュ及びビルベリーについては、それぞれの近縁植物を含めて核ゲノムリボソーム RNA ITS 領域あるいは葉緑体ゲノム *trn* 遺伝子領域等の塩基配列を、PCRダイレクトシーケンシングまたはサブクローニングを介して決定し、確認すべき目的植物に特異的な配列を見出し、その変異塩基を標的とした PCR-RFLP 法あるいは ARMS 法による遺伝子鑑定法を構築した。さらに、前出の 4 種類の西洋ハーブ製品について、その崩壊試験を日本薬局方の一般試験法に準じて行った。

<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>

本研究に使用した試料は、全て分担研究者の所属する企業が収集した生薬及び、分担研究者が、中国の産地で収集した野生及び栽培植物、分担研究者の所属する大学薬用植物園及び、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターで収集、維持している植物を使用した。PCR-RFLP に使用する制限酵素を含め、DNA の調製、PCR 等、実験に使用する試薬は、全て市販のものを使用し、実験操作も、定法に従って行った。

C. 研究結果及び考察

<西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究>

医薬品あるいは健康食品として流通する西洋ハーブ製品について、欧米諸国の公定書等に規定された方法に準じて TLC あるいは HPLC による確認試験を行ったところ、チェストツリーに関しては、医薬品、健康食品ともに正しい基原の製品と推定されたが、成分定量の結果、その主要なフラボノイド成分である Casticin について、医薬品の 10~100 倍の含量を有する健康食品がいくつか検出された。チェストツリー及びその近縁植物の遺伝子配列解析の結果、ITS 領域に多数の偽遺伝子を発見し、リボソーム RNA 遺伝子における協調進化の崩れという学術的に興味深い知見を得ると共に、同領域を避けて、葉緑体ゲノム *trn* 遺伝子領域を標的とした遺伝子鑑定法の確立に成功した。

医薬品として流通するブラックコホシュについては正しい基原と規格化された成分の含有が確認されたものの、健康食品として流通する製品の中には、異なる基原と推測される製品、及び、TLC 及び HPLC により検出可能な成分をほとんど含まない製品が見出された。さらなる確証を得るために遺伝子鑑定法を確立し、該当製品の確認試験に適用したところ、成分分析と同じ判定結果を得た。詳細な遺伝子配列解析によ

り問題のある製品の基原について検討したところ、我が国において医薬品として流通する生薬ショウマの基原植物であることが明らかとなった。

イチョウ葉については、公定書等の指標成分であるテルペンラクトンとフラボノイドの確認試験において、医薬品及び大半の健康食品の基原の正しさが確認された。また、CAD (コロナ荷電化粒子検出器) を検出器とした新規のテルペンラクトン HPLC 成分分析法の確立に成功した。一方で、LC-MS による成分定量と主成分分析の結果、人為的に特定の成分を添加したと推測される一群の健康食品の存在も明らかとなった。

ビルベリー及びその近縁植物の果実における成分分析の結果、HPLC のピークプロファイルでもビルベリーとオオバスノキ及びクロウソゴの識別は困難であったが、ITS 領域におけるビルベリー特異的変異を指標とした遺伝子鑑定法の確立により、容易に鑑定可能となった。

これら 4 種類の西洋ハーブ製品について水中での崩壊性を調べたところ、医薬品はすべて日本薬局方一般試験法の判定基準を満たしたが、健康食品の中には基準時間内においてほとんど原形のままの製品もあった。

天然物由来の西洋ハーブ製品にとって、正しい基原を保証することは極めて重要である。本研究にて検討した限り、チェストツリー、ブラックコホシュ、イチョウ葉及びビルベリーのいずれにおいても、医薬品として流通する製品については正しい基原及び規格化された成分含量が確認された。一方、健康食品として流通する製品の中には、異なる原料植物の誤用あるいは代用、エキスの過剰あるいは過小配合、特定成分の人為的添加、と疑われる事例がいくつか観察された。また、健康食品の中には、水中で 60 分以上攪拌してもほぼ原形を留める製品が存在した。このような安全性及び有効性に関する問題点を考慮すると、欧州等において医薬品として流通する西洋ハーブは、我が国で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。また、チェストツリー近縁植物の ITS 領域のように、GC 含量が特別に高い配列や偽遺伝子の存在には注意を要するものの、本研究の結果、天然物由来製品の確認試験として、遺伝子鑑定法が従来の成分分析法を補完して余りある有用な手法であるものと考えられた。

<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>

PCR-RFLP による白朮中の蒼朮に関する改定純度試験法案を作成した。次いで、本試験法について、7 機関による妥当性確認試験を実施した。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。妥当性確認試験を行った結果、本法は、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、現行の局方参考情報に示された手法ものに比べ優れた手法であることが明らかとなった。

幅広く刺五加市場品並びに、近縁植物について遺伝子に関し、核 rDNA, ITS1 領域の塩基配列の違いを利用した PCR-RFLP 法による純度試験法の検討を行った。また、*E. senticosus* には *trnK* 遺伝子に多型性が見られることが、明らかになっていることから、主産地の中国黒龍江省で本格的な調査を実施し、遺伝子多型と産地との関連を検討した。その結果、PCR-RFLP 法を利用し、エゾウコギのマンシュウウコギ類に対する純度試験法として、少なくとも 5% の混入を検出出来る方法を構築した。また、*trnK* 塩基配列の解析により、いくつかの遺伝子型については、産地を推定する事が可能である事が明らかになった。

車前子では、核 rDNA, ITS 領域の塩基配列解析により、基原種鑑別が可能である事を確認することができた。さらに、基原種と各性状との比較を行い、基原種同定への利用が期待出来る表現形質が存在する可能性が示唆された。また、リボゾーム遺伝子の ITS 領域の塩基配列をマーカーとする遺伝子鑑別法が、基原同定法として有用であることが示された。さらに、種子の 100 粒重と TLC プロファイルが、車前子の表現型による鑑別マーカーとして有用である可能性が示された。さらに、車前子の基原植物であるオオバコについて、ゲノム由来ライブラリーを、メチル化制限システムを有する大腸菌を宿主として作成した。このライブラリーを利用して、車前草・車前子の PCR-RFLP による鑑別に利用できる可能性のあるサイトを 1 個見出した。

半夏、天南星及び水半夏の標準試料及び天南星の中国市場品の葉緑体 DNA, *trnL-F* IGS 領域の塩基配列解析を行った結果、二つの制限酵

素部位のいずれかを利用した PCR-RFLP 法による *Pinellia* 属植物と *Arisaema* 属及び *Typhonium* 属植物との鑑別法が開発可能であると考えられた。一方、通常の Taq 系の酵素で増幅する場合、半夏由来の PCR 産物に取り込みミスが多いことが明らかになったことから、本方法の確立には、proof reading 酵素を用いた PCR の系を確立するか、あるいは PCR 酵素の正確性が問題とならない手法を検討する必要があることが判明した。

四川省産ガジュツ *Curcuma phaeocaulis* の根茎の抗炎症活性成分として furanodienone と curcumenol を同定した。この内、furanodienone が、Cox-2 阻害活性が強く、かつ選択性も高かった。*C. zedoaria* 由来日本産ガジュツもこれら 2 成分を含有していたが、通常含量は低かった。これらのデータをもとにして、今後、局方収載すべきガジュツの基原種について検討する予定である。

党参の主要な基原種であり、各地で栽培される *Codonopsis pilosula* は、ITS 領域の遺伝子型に地域特異性がある可能性が考えられた。また、湖北省神農架周辺では *C. tanshen* が栽培されていた。ただし、純系の *C. tanshen* ではなく、別種 (*C. henyi* と考えられる) との交配によりできた植物が多く、中には別種も含まれていた。この状況は、湖北省の党参市場品にも反映されていた。

また、TLC を利用した知母の確認試験法を確立し、本法は、一般用漢方処方エキスにも有効な試験法であることが判明した。

D. 結論

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

研究班での成果を反映しながら通知に対応し医薬品機構で承認審査がスタートしたものが複数存在する。また遺伝子的に基原の鑑別法を確立したものの 3 品目 (チェストツリー、ブラックコホッシュ、ビルベリー)、化学分析的な手法を確立したもの (チェストツリー、ブラックコホッシュ、ビルベリー、イチョウ葉他 2 品目)、海外の OTC 薬との比較検討が終了したものの上記 4 品目、既存健康食品との比較検討が終了したものが 5 品目である。次年度からの新規研究班で、引き続き西洋ハーブについて分析化学的・植物化学的検討を行うとともに、天然物医薬品として、どのように標準化を行っていくか、検討を量る予定である。

〈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〉

白朮, 蒼朮, 刺五加, Curcuma 属植物, 車前子について, 遺伝子解析を行い, PCR-RFLP を用いた白朮中の蒼朮に関する純度試験では, 機関共同試験によるバリデーションが終了し, 同法は, 第 16 改正日本薬局方参考情報として収載が決定した. また, 刺五加中のマンシュウコギについても, PCR-RFLP を用いる純度試験法を確立した. また, Curcuma 属, 車前子, 党参については分布と基原種, 成分の関係を明らかにした. なお, 車前子に関する研究は, 日本薬局方薄層クロマトグラフィー用試薬車前子確立のための基礎資料となった.

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 合田幸広: 天然物の基原と品質. Food & Food Ingredients Journal of Japan, **212** (5), 343-344, (2007).
- 2) 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), 345-356, (2007).
- 3) Sahin, F. P., Yamashita, H., Guo, Y., Terasaka, K., Kondo, T., Yamamoto, Y., Shimada, H., Fujita, M., Kawasaki, T., Sakai, E., Tanaka, T., Goda, Y., Mizukami, H., DNA authentication of Plantago herb based on nucleotide sequences of 18S-28S rRNA internal transcribed spacer region, *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1265-1270 (2007).
- 4) Maruyama, T., Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kim, I. H., Kamakura, H., Kawasaki, H., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Tada, A., Yamazaki, T., Goda, Y., Authentication and chemical study of Isodonis Herba and Isodonis extract, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**(11), 1626-1630 (2007).
- 5) 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), 374-379 (2007).
- 6) 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*, **46**, 864-869 (2008).
- 7) Maruyama T., Kamakura H., Miyai M., Komatsu K., Kawasaki T., Fujita M., Shimada H., Yamamoto Y., Shibata T., Goda Y., Authentication of the traditional medicinal plant, *Eleutherococcus senticosus* by DNA and chemical analyses, *Planta Med.*, **74**, 787-789 (2008).
- 8) Hakamatsuka, T., Safety assurance of health foods, *Bunseki*, **2009**, 149-150.
- 9) Higano T., Okamoto H., Uetake A., Aketo T., Hakamatsuka T., An analysis of anthocyanins and anthocyanidins in the bilberry health foods, *Japan J. Food Chem. Safety*, **16**, 60-65 (2009).
- 10) Kondo K., Shiba M., Yotsuyanagi Y., Nishimura N., Maruyama T., Goda Y., Discrimination between *Atractylodes Rhizome* (Byaku-jutsu) and *Atractylodes lancea Rhizome* (So-jutsu) by the PCR-RFLP analysis of ITS region on nrDNA, *J. Jpn. Bot.*, **84**, 356-359 (2009).
- 11) 丸山卓郎, 宮井美穂, 鎌倉浩之, 中島育美, 川崎武志, 小松かつ子, 藤田正雄, 山本豊, 柴田敏郎, 合田幸広, 遺伝子情報を利用したシゴカの基原種鑑別と純度試験法の検討, *生薬学雑誌*, **64**, 15-20 (2010).
- 12) Kakigi Y., Mochizuki N., Icho T., Hakamatsuka T., Goda Y., Analysis of Terpene Lactones in a Ginkgo Leaf Extract by High-Performance Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **74**, 590-594 (2010).
- 13) Maruyama, T., Kondo, K., Yotsuyanagi, Y., Yamamoto, Y., Kawasaki, T., Shiba, M., Terasaka, K., Yamane, M., Zhu, S., Sakata, K., Fujita, M., Akiyama, H., Nishimura, N., Komatsu, K., Mizukami, H., Goda, Y., "The inter-laboratory validation study for the purity test of crude drugs based on a PCR-RFLP." *J. Nat. Med.*, accepted.

2. 学会発表等

- 1) 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 年 3 月, 富山.
- 2) 合田幸広, 遺伝子情報を利用した生薬試験

- 法とその背景. 大阪生薬協会特別講演会, 2007年4月, 大阪.
- 3) 大沼美貴, 袴塚高志, 合田幸広, 小林進.
「LC-ELSDによるブラックコホシユ含有成分の分析」. 日本食品化学学会第13回総会・学術大会, 2007年6月.
 - 4) 大家真由子, Shu ZHU, 田中謙, 丸山卓郎, 合田幸広, 川崎武志, 藤田正雄, 小松かつ子. *trnK* 遺伝子の塩基配列に基づく刺五加の同定 (2), 第24回和漢医薬学会大会, 2007年9月, 富山.
 - 5) 宮井美穂, 丸山卓郎, 合田幸広, 小松かつ子, 中島育美, 川崎武志, 藤田正雄, 嶋田宏志, 山本豊, 柴田敏郎. ITS塩基配列によるシゴカの基原種鑑別 (2), 日本生薬学会第54回年会, 2007年9月, 名古屋.
 - 6) 中島育美, 川崎武志, 藤田正雄, 丸山卓郎, 川原信夫, 合田幸広, 小松かつ子, 柴田敏郎, 山本豊. エゾウコギ及び近縁植物 (マンシュウウコギ) の成分について. 日本生薬学会第54回年会, 2007年9月, 名古屋.
 - 7) 末永恵美, 丸山卓郎, 袴塚高志, 合田幸広.
「西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (2) チェストツリーの遺伝子鑑定について」. 第51回日本薬学会関東支部大会 (東京), 2007年10月.
 - 8) 丸山卓郎. 遺伝子情報を利用した生薬の純度試験-朮類生薬及び刺五加を例に-. 生薬分析シンポジウム, 2007年11月, 大阪.
 - 9) 大沼美貴, 小林進, 末永恵美, 丸山卓郎, 袴塚高志, 合田幸広, 菱田敦之, 木内文之, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (4) ブラックコホシユの遺伝子鑑定法について, 日本食品化学学会第14回総会・学術大会, 2008年5月, 西宮.
 - 10) 朱姝, 大家真由子, 田中謙, 白焱晶, 小松かつ子, 丸山卓郎, 合田幸広, 川崎武志, 藤田正雄: 刺五加の基原と品質に関する研究 (3) -中国東北地方における遺伝的・成分的多様性, 日本生薬学会第55回年会, 2008年9月, 長崎.
 - 11) 丸山卓郎, 近藤健児, 四柳雄一, 山本豊, 川崎武志, 司馬真央, 寺坂和祥, 山根真由, Shu ZHU, 坂田こずえ, 藤田正雄, 穂山浩, 西村直行, 小松かつ子, 水上元, 合田幸広, 「遺伝子情報を利用する生薬の純度試験」の改定に向けた妥当性確認試験について, 日本薬学会第129回年会, 2009年3月, 京都.
 - 12) 末永恵美, 丸山卓郎, 袴塚高志, 飯田修, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (6) *Vitex* 属植物における ITS 遺伝子領域の個体内変異, 日本薬学会第129回年会, 2009年3月, 京都.
 - 13) 大沼美貴, 小林進, 末永恵美, 丸山卓郎, 袴塚高志, 合田幸広, 菱田敦之, 木内文之, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (5) ブラックコホシユ市場品の品質評価, 日本薬学会第129回年会, 2009年3月, 京都.
 - 14) 柿木康宏, 袴塚高志, 鴨脚毅, 望月直樹, 合田幸広, LC/CADを用いたイチョウ葉エキス中のテルペンラクトン類分析, 日本薬学会第129回年会, 2009年3月, 京都.
 - 15) 袴塚高志, 末永恵美, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (7) チェストツリー製品の崩壊性について, 日本食品化学学会第15回総会・学術大会, 2009年5月, 東京.
 - 16) Goda, Y., Quality control of herbal medicines in Japan, 57th International Congress and Annual Meeting of the GA, August 2009, Geneva. (Planta Med. 75, 887 (2009)).
 - 17) 丸山卓郎, 遺伝子情報を利用した生薬の純度試験の改定について, 大阪生薬協会技術部会特別講演会, 2009年10月, 大阪.
 - 18) Emi Suenaga, Takashi Hakamatsuka, Osamu Iida, Hiroharu Fujino, Fumiya Kurosaki, Shoji Yahara, Yukihiro Goda, Phylogenetic study on *Vitex trifolia* L. using the nuclear ribosomal DNA ITS and the nuclear *FLORICAULA/LEAFY* second intron, 第32回日本分子生物学会, 2009年12月, 横浜.
 - 19) 丸山卓郎, 遺伝子情報を利用した生薬の純度試験の改定, 第38回生薬分析シンポジウム, 2009年12月, 大阪.
 - 20) 朱姝, 何敬愉, 陳芳清, 佐藤杏子, 合田幸広, 小松かつ子: 党参の基原と品質に関する研究 (1) -*Codonopsis* 属植物及び党参の ITS 領域の塩基配列について. 日本薬学会第130回年会, 2010年3月, 岡山.
- F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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、チェストツリー、ブラックコホッシュ、イチョウ葉、ビルベリー等の各種試験法について検討するとともに製品分析を行った。また半夏、天南星、党参、車前子等の生薬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 中川 誠
- (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 稲木敏男
- (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)食の安全研究所 望月直樹
- (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(JP)等公的な試験法への応用まで視野にいたったものである。

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

一般用医薬品として欧州に流通する9製品は現地の薬局で購入し、3製品については、それぞれ3ロットずつ入手した。健康食品8製品はインターネット経由で購入した。チェストツリー及び6種の *Vitex* 属近縁植物の植物体(葉)は(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター(基盤研)種子島研究部より入手した。

2) HPLC による成分分析

医薬品9製品について、錠剤あるいはカプセルの内容物を80%メタノールに溶解し、0.5%リン酸/メタノール、検出波長275nmによる逆相グラジエントHPLC分析に供した。

3) 遺伝子配列の解析

チェストツリー及び近縁植物の葉を磨砕し、DNA抽出を行い、その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 を行った。

4) 遺伝子配列による系統解析

決定された遺伝子配列に基づき、DNA 二次構造の自由エネルギーを mFold により予測した。また、塩基配列のアライメントを行った後、ClustalW により系統樹を作成した。

5) マイクロアレイ解析

乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* の全ゲノム配列情報 (全長 2,039,414 bp, 1,820 ORF) を基に、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た。

B-2 ブラックコホシュ

1) 材料

安定性試験に供した医薬品 1 製品は、欧州の薬局で購入した。健康食品のうち、成分分析 (TLC 及び LC/ELSD) 及び遺伝子鑑定による基原植物確認試験に用いた 16 製品及び崩壊試験に供した 4 製品はインターネットで購入した。

2) TLC による確認試験

順相 HPTLC を用い、トルエン/ギ酸エチル/ギ酸 (50:30:20) を溶媒として展開、アニスアルデヒド-硫酸処理し、加熱した。

3) LC/ELSD による成分分析

逆相系カラムを使用、1%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った。

4) 崩壊試験

6 検体について、水を試験液として JP15 局一般試験法に従い崩壊試験を行なった。カプセルについては補助盤を用いた。

5) PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定法

健康食品 16 製品のうち、植物乾燥粉末の配合を謳う 9 製品についてこれまで確立した方法により遺伝子鑑定を行った。

6) ARMS 法による遺伝子鑑定法

前項において抽出した DNA を鋳型として、*trnL-F* 領域の一部分を増幅する PCR を行なった。PCR 増幅には、ブラックコホシュ特異的認識プライマーセット及び、近縁 6 種由来の同領域を認識するプライマーセットを用いた。得られた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含有健康食品 16 製品は小売店及びインターネット経由で購入した。欧州で流通するイチョウ葉エキス含有医薬品 2 製品は現地で購入した。

2) UPLC-PDA-TOF/MS によるフラボノイドの分析

製品を粉碎しメタノールを加え、超音波処理

し溶解させた後、精製水加え一定量とし、逆相、0.1%ギ酸及び 0.1%ギ酸アセトニトリルを移動層とするグラジエント溶出 UPLC-PDA-TOF/MS に供した。

3) 主成分分析

解析ソフトはエクセル統計 2008 を使用し、各製品を分析して得られたそれぞれのピークの面積百分率データ (測定 n=3) を用いた。

4) 崩壊試験

健康食品 10 製品について、JP 一般試験法に従い、崩壊試験を行なった。

B-4 ビルベリー

1) 材料

ビルベリー及びその近縁植物 7 種 (コケモモ、ツルコケモモ、クロマメノキ、イワツツジ、ウスノキ、オオバスノキ、クロウスゴ) の果実及び葉は、基盤研北海道研究部より提供を受けた。ビルベリー標榜健康食品 6 種はインターネットを経由して購入した。

2) TLC によるアントシアニン類の分析

欧州薬局方 (EP) の確認試験法に準じ、ビルベリー及びその近縁植物 7 種果実の粉碎品をメタノール抽出し試料溶液を調製、順相 TLC 分析に供した。展開溶媒は 1-ブタノール/水/ギ酸混液 (65:19:16)、検出は目視で行った。

2) HPLC によるアントシアニン類の分析

EP を参考にして独自に開発した品質保証法に従って分析を行った。ビルベリー及びその近縁植物 7 種果実粉碎品に塩酸メタノール溶液 (1→50) を加え、振とう抽出して試料溶液を調製し、HPLC 分析に供した。カラムは逆相を用い、薄めたギ酸及び水/アセトニトリル/メタノール/ギ酸混液によるグラジエント溶出を行ない、535nm の検出波長により観察した。

3) 遺伝子配列の解析

ビルベリー及び近縁 7 種植物の葉及び果実を凍結後に磨砕、DNA を抽出した後に、ITS 領域特異的プライマーを用い PCR を行い、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

4) ARMS 法による遺伝子鑑定法

抽出 DNA を鋳型として、ITS 領域の一部分を対象に、ビルベリー選択型 5' プライマーあるいはビルベリー排除型 5' プライマー、及び共通の 3' プライマーを用いて PCR を行った。

5) PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定法

ビルベリー及びその近縁植物遺伝子の ITS 領域の一部を PCR により増幅、遺伝子断片の一定量を制限酵素 *Afe I* により消化し、本反応液を電気泳動により分離した後に観察した。

6) 崩壊試験

ビルベリー標榜健康食品6種について、JP一般試験法に従って試験を行った。

<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>

B-5 半夏及び天南星

本研究に使用した試料は、全て分担研究者の所属する企業が収集した生薬を使用した。

まず、試料について、鏡検とTLCによる鑑別について検討した。次いで、葉緑体DNA中の *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA) 領域を標的配列とした遺伝子情報による鑑別法について検討した。

本検討では、各試料20mgより、DNAを抽出、精製し、これを鋳型とし、葉緑体DNA、*trnL* (UAA) 3' exon 及び *trnF* (GAA) 遺伝子領域内に設計されたプライマーを用い、PCRを実施、*trnL-trnF* intergenic spacer (IGS) 領域を含むDNA断片を増幅した。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムを使用、分子系統樹はKimura's two parameter による遺伝距離を用いたNJ tree法により作成した。

また、ITS領域を対象として、制限酵素CseI, BssHII, AcuIを利用したPCR-RFLPによる半夏、掌葉半夏、水半夏、天南星の鑑別試験法についても、別に検討した。

B-6 党参

党参は『中華人民共和国薬典』に2種1変種が基原植物として記載されているが、地方的には *C. subglobosa* W. W. Sm., *C. tubulosa* Kom., *C. nervosa* Nannf., *C. canescens* Nannf., *C. clematidea* C. B. Clarke なども使用される。本研究では、*Codonopsis* 属植物の遺伝子多型に基づく同定法を開発を検討した。今年度は、党参の産地である甘粛省、重慶市(元四川省)及び湖北省、等で資源植物の栽培状況の調査を行い、収集した栽培・野生植物35検体及び党参市場品8検体について同様の解析を行った。上記の検体について葉または根から全DNAを抽出、これを鋳型にし核ITS領域をPCR法で増幅した。

B-7 リボゾームRNA遺伝子に代わる鑑別遺伝子領域の探索

リボゾーム遺伝子やイントロン領域に存在するトランスポゾン、マイクロサテライト等の反復配列中ではシトシン塩基が高い頻度でメチル化されている。そこで、メチル化制限能を有する大腸菌株を宿主としてオオバコのゲノムライブラリーを作成し、その中から車前子・車前草の鑑別に利用できるマーカーサイトの探索を試みた。ゲノムライブラリーの作成には、分担研究者の所属する大学薬草園で栽培し、遺伝子塩基配列からオオバコ *P. asiatica* である

ことを確認した個体を用いた。車前子は、前年度用いた生薬標本を利用した。

B-8 知母

サルササポゲニン、チモサポニンA-III、マンギフェリンの3成分を対象としてTLCによる確認試験法を検討した。

<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9製品につき、EPに準じHPLC成分分析を行った。9製品の溶出パターンは極めて類似していたが、1日量あたりに換算したcastisin含量を比較すると、0.015~0.164mg/dayの差異が観察された。但し、同製品のロット間ではcastisin含量の変動係数(Cv)が3.2~5.9%であり、良く揃っていた。

2) 遺伝子配列による系統解析

サブクローニングすることにより得られた複数のITS遺伝子配列を用いて、それぞれの植物における系統樹を作成したところ、機能性遺伝子と予測されるグループIと偽遺伝子と予測されるグループIIに分類された。グループIIの遺伝子には、C塩基からT塩基へのトランジション変異が多く観察され、グループIの遺伝子配列と比較してGC含量の低下が観察された。また、mFoldを用いてITS2の二次構造エネルギーを予測したところ、グループIと比べて、グループIIのエネルギーが高く、構造的に不安定であると推測された。

PCRにはtaq及びpfxの2種類のDNA polymeraseを用いたが、taqにより増幅された配列のほぼすべてがグループII(偽遺伝子)に分類され、pfxにより増幅された配列にも植物の種類により0~50%の偽遺伝子が観察された。

3) 腸内細菌 *L. reuteri* に対する影響

L. reuteri の遺伝子発現に対するチェストツリーの影響について解析した。投与後5分、15分及び60分において、対照試料の2倍以上に発現が上昇するものは、12個、36個及び12個観察され、また、1/2以下に発現抑制されるものは、25個、3個及び50個観察された。前年度までの研究において、ブラックコホシで処理した *L. reuteri* では、プリン塩基合成に関与する遺伝子群の一過性の発現抑制と、糖代謝及びピリミジン塩基合成に関与する遺伝子群の発現上昇が観察されたが、チェストツリー

の場合はこれらの遺伝子群の発現に変化は起こらなかった。また、ブラックコホシユ処理によって誘導されたいくつかのリボソーム遺伝子に加え、多くの種類のリボソーム遺伝子がチエストツリー処理によって一斉に誘導された。

C-2 ブラックコホシユ

1) TLC 及び LC/ELSD による確認試験

健康食品として流通する 16 製品を EP に準拠し TLC 及び LC/ELSD により分析したところ、12 製品において標準品の actein 及び 27-deoxyactein と同じ Rf 値及び保持時間にスポット及びピークが観察され、全体のプロファイルもよく類似していた。ただし、2 製品において標準品と異なる Rf 値に強いスポットが観察され、さらに他の 2 製品で全体的にほとんどスポット及びピークが観察されなかった。

2) ITS 領域の PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定

前年度までに確立した PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定法を適用したところ、TLC 及び LC/ELSD 分析において標準品のスポットが観察された製品では、増幅された遺伝子断片が制限酵素 *Bst* B I により切断されたが、標準品と異なる Rf 値及び保持時間にスポット及びピークを与えた 2 製品においては切断されなかった。また、TLC 及び LC/ELSD 分析においてスポット及びピークを与えなかった製品では、PCR 増幅産物自体が生成しなかった。

3) *trn* L-F 領域の ARMS 法による遺伝子鑑定

前年度までに構築した ARMS 法による遺伝子鑑定法を用いて、前項と同じ検体を分析してみたところ、PCR-RFLP 法と同等の鑑定結果を得た。

4) 基原の異なる製品の基原種同定

前項までの分析においてブラックコホシユとは異なる植物の使用が疑われた製品について、ITS 領域及び *trn* L-F 領域の塩基配列を決定したところ、ブラックコホシユの近縁植物の *C. dahurica* であることが判明した。

5) 崩壊試験

健康食品として流通する 4 製品について崩壊試験を行なったところ、ハードカプセルの 2 製品については JP の判定基準内で崩壊したが、錠剤の 2 製品のうち 1 製品は判定基準 (30 分) 内に崩壊せず、ほとんど原形のままであった。

C-3 イチョウ葉

1) フラボノイドの網羅的解析

ドイツ薬局方及び米国薬局方におけるイチョウ葉エキス製品のフラボノイド定量分析では、試料調製に際して塩酸酸性にて加水分解を行い、フラボノイド配糖体をアグリコンへ変換した上で HPLC 分析を行う。本研究では、イチ

ョウ葉エキス製品に含まれるフラボノイド類を、加水分解することなく UPLC-PDA-TOF/MS による網羅的分析に供した。健康食品 16 製品及び医薬品 2 製品の分析クロマトグラムを基に主成分分析を行ったところ、4 つのグループ (I~IV) に大別された。健康食品 8 製品は医薬品 2 製品と同じグループ I に分類された。グループ II の 1 製品は ginkgetin などの biflavone を含有し、またグループ III の 3 製品からはフラボノイドアグリコンの quercetin が大量に検出された。

2) 崩壊試験

健康食品 10 製品について検討したところ、素錠とフィルムコーティング錠の各 2 製品は、60 分以上経っても崩壊せずに原形のままであり、またソフトカプセルのうち 1 製品は JP 判定基準 (20 分) 内に崩壊しなかった。

C-4 ビルベリー

1) TLC による成分組成の比較

ビルベリー果実において、Rf 値 0.46 に赤紫色のシアニジン 3-O-グルコシド (標準物質) のスポットを認めた他、EP の記載事項と同様な結果を得た。これと比較して、イワツツジ、ウスノキ、コケモモ及びツルコケモモは、ビルベリーと異なるクロマトグラムを示し、オオバスノキ、クロウスゴ及びクロマメノキは、ビルベリーとの識別が困難であった。

2) HPLC による成分組成の比較

ビルベリー乾燥エキス標準溶液において、欧州薬局方に規定される 15 種のアントシアニンのピークを認め、ビルベリー果実も同等のクロマトグラムを示した。これと比較して、イワツツジ、ウスノキ、コケモモ及びツルコケモモは、ビルベリーと異なるクロマトグラムを示した。クロマメノキは、上記 4 植物と比較すると、ビルベリーと類似したクロマトグラムを示したが、1 部のピークが欠落していた。オオバスノキ、クロウスゴは、ビルベリーと極めて良く似たクロマトグラムを示し、15 種すべてのアントシアニンのピークを認めた。

3) ITS 領域の塩基配列比較

ビルベリー及びその近縁植物 7 種の ITS 領域の塩基配列を決定し、さらに公的データベースよりハイブッシュブルーベリー及びクランベリーの登録配列を加えて配列比較を行い、ビルベリーに特異的な変異塩基を 1 つ見出した。

4) ARMS 法によるビルベリーの遺伝子鑑定法

ITS 領域に見出されたビルベリー特異的な変異部位を標的として、ビルベリーとその近縁植物を識別する ARMS 法による遺伝子鑑定法を確立

した。

5) PCR-RFLP 法によるビルベリーの遺伝子鑑定法

ITS 領域内のビルベリー特異的変異塩基を含む 6 塩基が制限酵素 *Afe* I によって切断されるように PCR プライマーを設計し、ITS 領域の PCR 増幅断片のうち、ビルベリーに由来するもののみが制限酵素 *Afe* I で切断されることを確認し、PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定法を確立した。

6) 崩壊試験

ビルベリー標榜健康食品について 6 検体ずつ崩壊試験を行なったところ、2 種のフィルムコーティング錠はいずれも判定基準 (60 分) 内に崩壊しない検体を含み、また、4 種のカプセル剤のうち 1 製品には判定基準 (20 分) を満たさない検体があった。

<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-5 半夏及び天南星

鏡検では一部結晶形の異なるものは鑑別可能であったが、それ以外のもは区別できないことが判明した。また TLC ではいずれも鑑別が困難であった。

そこで、葉緑体 DNA 中の *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA) 領域を標的配列とした遺伝子情報による鑑別法について検討した。各試料より調製した DNA を鋳型に用いて、Ampdirect Plus-Nova Taq の系で、PCR を行うことにより、目的の *trnL*-F IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより、塩基配列を決定した。試料 Ten-1 及び Ten-10 は、同一の配列を示し、Blast Search program によるデータベースとの同源性検索の結果、*A. ciliatum* var. *liubaense* (Acc. no.: AY275586) と一致した。Ten-8 及び Ten-9 も、互いに同一の配列を示し、データベース上の *A. franchetianum* (AM933350), *A. polyphyllum* (AY248955), *A. ciliatum* (AY248950), *A. aff. Pingbianense* (AY376849), *A. jinshajiangense* (AY275589), *A. formosanum* (AY275588), *A. consanguineum* (AY275587) の配列と一致した。Ten-2 は、データベース上に一致する配列は無く、Ten-8 及び -9 の配列に一致した 7 つの配列及び *A. fargesii* (AY275581), *A. candidissimum* (AY275580) と最も高い同源性 (99%; 369/371) を示した。ただし、*Arisaema* 属植物は、非常に多くの種が存在し、それらはいずれも、*trnL*-F IGS 配列において非常に高い同源性を有しているため、この領域の配列から種を特定することは困難であった。Ten-3 から

Ten-7 及び Han-9 は、データベース上の *P. pedatisecta* の配列 (AM933351; AY275624, AF469021) と一致あるいはほぼ一致した。Han-1 から Han-4 は、データベース上の *P. ternata* (AY248968, AF469023) 及び *P. yaoluopingensis* (AF469020) の配列と一致した。Han-5 から Han-8 は、データベース上の *T. flagelliforme* (AB494486) の配列と一致した他、*T. blumei* (AY275630) などと高い同源性を示し、*Typhonium* 属植物であると推定された。以上の結果、*Arisaema* 属及び *Typhonium* 属植物において、制限酵素 *Hinf*I, *Mly*I あるいは *Bs*II 認識配列を示す一方、*Pinellia* 属では、一塩基の違いにより認識配列とならないことから、これらの領域の塩基配列の違いを利用し、*Pinellia* 属と *Arisaema* 属及び *Typhonium* 属植物を区別出来ると考えられた。また、データベース上の他の *Arisaema* 属及び *Typhonium* 属植物もこの領域の塩基配列は、同様であった。

本研究に用いた試料のダイレクトシーケンスでは、いずれも一塩基の挿入/欠失配列の混入に由来するシーケンスパターンを示した。これは、単一個体内に複数配列を有することを示している。従って、サブクローニングにより単一個体由来の PCR 産物の個々の塩基配列を確認した。サブクローニングを行った 6 個体は、いずれも、ダイレクトシーケンスからの結果とは、異なる塩基配列を多数含み、ダイレクトシーケンスの結果と一致する塩基配列を示したクローンは、Ten-2 及び Ten-4 におけるそれぞれ 2 クローンのみであった。特に半夏においては、他の試料に比べ、非常に多くの塩基置換が認められた。単一個体由来の PCR 産物から、このような多くの塩基配列が得られた原因としては、次の二つが考えられる。①単一個体内に葉緑体 DNA が多数存在するため、*trnL*-F IGS 配列には、個体内多型が存在する。② PCR 増幅の際の DNA polymerase による塩基の取り込みミスである。この点を明らかにするために、次に、proof reading 酵素である KOD あるいは KOD FX DNA Polymerase による PCR を行い、その増幅産物を同様に、サブクローニングした。その結果、半夏を除く全ての試料で、全クローン、ダイレクトシーケンスの結果と一致する塩基配列を示した。また、半夏においても、Ampdirect Plus-Nova Taq の系を使用した際に比べると塩基置換の数が著しく減少した。

ITS 領域の PCR-RFLP における半夏、掌葉半夏、

水半夏, 天南星の区別に関しては, 現時点では「半夏について切断なし」, 「その他のものは切断」を確認できる試験法は開発できなかった.

C-6 党参

1) *Codonopsis* 属植物の ITS 領域の塩基配列

2009年度に収集した *Codonopsis* 属植物のうち, 甘肅省採集品は *C. pilosula* (6 検体) または *C. pilosula* var. *modesta* (3 検体), 重慶市採集品は 2 検体が *C. pilosula*, 湖北省採集品は 1 検体が *C. pilosula* var. *modesta* であったが, 両地域採集品の多く (重慶市 13 検体, 湖北省 10 検体) は *C. tangshen* であった. それらの ITS 領域の塩基配列は, ITS1 領域が 257 bp, 5.8S rRNA 遺伝子領域が 163 bp, ITS2 領域が 253 bp であった. *C. pilosula* には 6 タイプ (P-I, I', II, II', III, III') の塩基配列が見出されたが, GenBank に登録されている塩基配列 (Acces. No. EF190460; P-0 とする) と相同の配列を持つ検体はなかった. 昨年度に湖北省産野生品で見出されたタイプ P-I が甘肅省採集品 2 検体 (Cgs-6-1, Cgs-7) で見出された. 6 タイプは上流から 122 番目に Cytosine (C)/Thymine (T) の 2 重ピーク (Y) が観察されるかまたは稀に T であり, 226 番目は Y または C, かつ 489 番目は T または稀に Y である点が共通した. タイプ P-II の塩基配列では 122 番目が C/T (Y) であり, タイプ P-0 と PM-0 (Acces. No. EF190461) との交配が考えられた. *C. pilosula* var. *modesta* には 4 タイプ (PM-0, I, II, III) の塩基配列が見出され, タイプ PM-0 は GenBank に登録されている同変種の配列 (Acces. No. EF190461) と一致した. 4 タイプは上流から 122 番目の塩基が T, 226 番目は C, かつ 489 番目は T または稀に Y である点が共通した. タイプ PM-II の塩基配列では 489 番目が T/C (Y) であり, タイプ PM-0 と T-I との交配が, タイプ PM-III の塩基配列では 500 番目が Guanine (G)/Adenine (A) であり, タイプ PM-0 と T-0 (Acces. No. EF190462) との交配が考えられた. *C. tangshen* には昨年度と同様の 4 タイプ (T-I~IV) の塩基配列と, タイプ T-I の 2 塩基置換, タイプ T-II の 1 塩基置換, タイプ T-III の 1 または 2 塩基置換をもつ配列の計 9 タイプの塩基配列が見出された. T-IV 以外の 8 タイプは共通して, 上流から 122 番目の塩基が T, かつ 489 番目は C または C/T (Y) の 2 重ピークが観察された. タイプ T-III では 135 番目が G/A (R) であり, タイプ T-I と T-II との交配が考えられた. タイプ T-IV 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. なお, GenBank に

登録されている配列 (タイプ T-0) と同じ配列をもつ検体は見出されなかった.

2) 党参市場品の ITS 領域の塩基配列

主として中国甘肅省産の党参市場品について, 各 1 検体を抜き取り, 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. 広州市場で入手した野党参 (TMPW No. 26660) は, 植物材料では見出せなかったタイプ P-0 の塩基配列を示し, また同市場の黄党参 (No. 26662) はタイプ P-I の配列, さらに西安市場の甘肅省隆興産条党参はタイプ P-II の配列をそれぞれ示し, 基原種は *C. pilosula* であった. 甘肅省文県で入手した紋党参のうち 1 市場品 (No. 26655) と江西省南昌市場の党参 (No. 26666) は PM-0 の配列を示し, *C. pilosula* var. *modesta* 基原であった. 文県市場の紋党参の別の市場品 (No. 26669) は T-I の配列, 陝西省鳳凰市場の地元産の鳳党 (No. 26670) は T-III の配列を示し, *C. tangshen* 基原であった. 雲南省香格里拉市場の党参 (No. 26665) はいずれの塩基配列とも一致しなかったが, タイプ P-II の配列に類似し, これとは 135 番目に A/G (R) のヘテロ型塩基が見られる点で異なった. タイプ T-II の関与が考えられる.

C-7 リボゾーム RNA 遺伝子に代わる鑑別遺伝子領域の探索

1) ライブラリーの構築

高等生物のゲノム中に存在している反復配列 (トランスポゾン, マイクロサテライト, リボゾーム遺伝子など) は高等動物では CpG, 高等植物では CpNpG 配列のシトシン残基が高度にメチル化されている. 大腸菌には MrcA および MrcBC システムというメチル化シトシン制限システムがあり, メチル化された DNA を切断する. 遺伝子クローニングの目的のためには, これらの制限システムを欠損した大腸菌株を用いることになる. 本研究では, 逆にこれらのメチル化制限システムを利用して, ゲノム DNA のメチル化されていない領域を主として含む DNA ライブラリーを構築した. オオバコのゲノム由来の DNA 断片をインサートとして含むプラスミドを保持する 194 個の大腸菌コロニーについて, プラスミド由来の配列をプライマーとするコロニー PCR を行い, インサートサイズを調べた. さらに, 生薬への DNA 鑑別への応用を考えて, 300~1,000bp のサイズのインサートを保持するコロニーとして 65 コロニーを選んでプラスミドを抽出しシーケンシングした. 塩基配列が解読できた 62 の断片について, シーケンシング特異的なプライマーを設計し, ゲノム DNA を鋳型

として PCR を行い、予想されるサイズの DNA 断片の生成を確認した。

2) PCR-RFLP 鑑別マーカーの探索

ゲノム DNA を鋳型として行なった PCR によって増幅が確認できた 62 個のゲノム断片配列のうち 10 個の配列 (P1~P10) について、制限酵素認識サイトを検索し、適当なサイズの制限酵素断片を生じる 4 塩基認識制限酵素を選択した。PCR によって増幅した断片を選択した制限酵素で処理し、予想されるサイズの断片が得られることを確認した。4 種の異なる基原植物に由来する生薬から調製した DNA を鋳型として、上記の P1~P10 のゲノム DNA 断片を増幅した。オオバコ以外の種からの増幅を可能にするためにアニール温度は 50°C とした。10 個のうち 9 個の配列は 4 種の試料のいずれからも増幅できたが、1 つの配列 (P8) は、*P. depressa* と *P. major* からは増幅できなかった。このことは、PCR プライマーとして用いた領域の塩基配列が、これらの 2 種ではオオバコと異なっていることを示唆している。増幅産物を制限酵素処理して生じる制限酵素断片を電気泳動によって分離した。その結果、P1~P7, P9, P10 では各種の制限酵素を用いても試料間で切断パターンの差は認められなかったが、P5 では、*Dde* I または *Hinf* I を用いて切断した場合に *P. major* を基原とする生薬で他の生薬とは異なる電気泳動パターンが検出できた。

C-8 知母

抽出後、ヘキサン/アセトン混液 (7:3) を展開溶媒とした TLC を行い、バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧し、100°C で 1 分間加熱することで、サルササポゲニンを確認する手法、酢酸エチル/水/ギ酸/酢酸 (100) 混液 (20:6:3:3) を展開溶媒とした TLC を行い、希硫酸を噴霧し、105°C で 5 分間加熱し、チモサポニン A-III 及びマンギフェリンを確認する確認試験法を確立した。次に、逆相 TLC を用い、より高感度な分析法について検討したところ、水/メタノール/リン酸混液 (60:40:1) を展開溶媒として TLC を行ったのち、希硫酸を噴霧、加熱した後、紫外線 (主波長 365nm) を照射し、マンギゲリンを確認する方法で、順相のものより 10 倍以上の検出感度 (検出限界: 3 ng) が得られることが判明した。さらに、加味四物湯、桂枝芍薬知母湯、滋腎通耳湯、清熱補血湯の 4 処方について、逆相 TLC による確認試験を実施した結果、どの処方エキスからもマンギフェリンが良好に検出され、知母抜き処方エキスからは検出されないことが明らかとなった。

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

前年度までに、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、フラボノイド Castisin の含量にして、医薬品の 100 倍量近くの含量を有する健康食品があることを報告した。今年度は、欧州に流通する 9 種類のチェストツリー医薬品を入手して解析したところ、成分プロファイルは極めて類似しており、正しいチェストツリー原材料が使用されているものと思われたが、Castisin 含量に 10 倍程度の幅を観測した。またチェストツリーを含む *Vitex* 属植物の ITS 領域は、大量の偽遺伝子をゲノム上に蓄積していることが分かり、さらに、*Vitex* 属植物 ITS 領域の機能性遺伝子群は、他の植物と比較して高い GC 含量 (65%以上) と安定した二次構造を有していることも明らかとなった。これほど高い GC 含量を有する領域は、*taq* などの一般的な DNA polymerase では PCR 産物を与えないが、*Vitex* 植物の場合は GC 含量の低い偽遺伝子が大量に存在するため、様々な変異を含有する偽遺伝子が代替的に PCR 増幅され、遺伝子鑑定やダイレクトシーケンスを混乱させることが分かった。上述の現象は、GC リッチな配列の増幅に適した *pfx* 等の使用や、一般的な DNA polymerase 反応に DMSO を添加することで回避が可能であり、GC 含量の高い領域を遺伝子鑑定の標的とする場合には、DNA polymerase の選択等の PCR 条件の設定には注意を払う必要があることが分かった。一方、前年度までの研究において、ITS 領域を対象とする遺伝子鑑定法に加えて、我々はシングルコピーの *trnK* 領域を対象とした遺伝子鑑定法も確立しており、ITS 領域に多くの変異を抱えるチェストツリーの場合は、後者の方法が遺伝子鑑定法として適しているものと思われた。また、マイクロアレイによる解析の結果、チェストツリーは *in vitro* 培養したヒト腸内細菌 *L. reuteri* に対して一過性に急激なタンパク質合成を上昇させる効果を示すことが分かった。前年度までに行ったブラックコホシユ処理の場合と比較して、広範囲のリボソーム遺伝子を誘導させていたが、これが単に *L. reuteri* の増殖を促進させるものであるか、特異的な成分の生産につながるものであるか、遺伝子発現の動きだけで判断が付かず、今後メタ

ボローム解析などの成分レベルでの検討が必要と思われる。

D-2 ブラックコホシュ

前年度までに、健康食品として流通するブラックコホシュ製品の TLC 及び LC/ELSD による予備的な実態調査について報告したが、本年度は 16 製品を入手し、遺伝子鑑定も加えて本格的な調査を行った。16 製品中 4 製品に品質上の問題点を確認され、そのうち 2 製品はほとんど植物成分を含まず、また、残りの 2 製品は異なる材料植物に由来することが分かった。遺伝子配列を解析した結果、後者の 2 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、生薬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。また、健康食品の中には JP で規定される時間内に水中で全く崩壊しないものがあった。従って、安全性及び有効性の面を考慮すると、ブラックコホシュ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た。

D-3 イチョウ葉

ドイツ薬局方、米国薬局方及び EP 案に収載されているイチョウ葉エキス製品の成分定量法においては、フラボノイド類とテルペンラクトン類が指標成分とされ、フラボノイド類の定量においては、フラボノイド配糖体を加水分解してフラボノイドアグリコンに変換した後に LC/UV にて測定する分析法が規定されている。本方法のクロマトグラムは単純であり、定量対象成分が 3 化合物程度で済むため簡便ではあるが、エキス中に含有される実際のフラボノイド組成を把握することができない。そこで、本研究では、加水分解していない検体を材料に、UPLC-PDA-TOF/MS システムによるフラボノイド類の網羅的定量分析を行った。国内に流通している健康食品 16 製品と海外医薬品 2 製品について検討し、その主成分分析の結果から対象製品を 4 グループに大別したが、医薬品 2 製品と同じグループに分類されたのは 8 製品であった。一方、イチョウ葉エキス中にほとんど含有されないことで知られているフラボノイドアグリコンの quercetin を大量に含むグループ (3 製品) が見出された。これは、quercetin あるいは quercetin を主成分とする天然物が人為的に添加された結果と推測されるが、加水分解処理した検体を分析した場合は見逃す可能性が高い事象であった。医薬品においては、製品自体の規格検査に加えて、製造工程の GMP 管理が徹底しているため、このような事象に遭遇するこ

とはないものと思われるが、健康食品として流通する製品の製造管理には、一部に極めて憂慮すべき状況があることが判明した。また、水を試験液として崩壊試験を行なった結果、健康食品として流通するイチョウ葉エキス製品の中には 60 分以上経っても崩壊しないものが観察され、有効性の観点から大きな問題が提起された。これらの点を考慮し、イチョウ葉エキスも積極的に一般用医薬品として流通させることが重要であると考えられた。

D-4 ビルベリー

本研究ではビルベリー及びその近縁植物の果実を対象として、TLC 及び HPLC による成分比較を行った。ビルベリー近縁植物 7 種のうち、イワツツジ、ウスノキ、コケモモ及びツルコケモモについては、アントシアニンを指標とした TLC 及び HPLC 分析において、ビルベリーと明らかに異なるクロマトグラムを示し、簡単に識別が可能であった。クロマメノキの TLC 展開像はビルベリーとよく似ていたが、HPLC プロファイルは明確に異なっていた。一方、オオバスノキ及びクロウソゴについては TLC 分析及び HPLC 分析による識別が困難であった。オオバスノキ果実はビルベリー果実よりも大型であり、また、ビルベリー果実が輪状のがくを残存させるのに対して、オオバスノキ果実及びクロウソゴ果実は五角形のがくを残存させることから、果実の注意深い性状比較により識別は可能であるが、さらに明確な識別法が必要であった。そこで、本研究では遺伝子鑑定法を適用することとし、ハイブッシュブルーベリー及びクランベリーを加えた 9 種の近縁植物について、ビルベリーの核ゲノムリボソーム RNA の ITS 領域の塩基配列と比較を行い、ビルベリー特異的な変異を見出した。そして、この変異を標的として、ARMS 法及び PCR-RFLP 法を利用した遺伝子鑑定法を構築し、ビルベリーの鑑別に成功した。以上のように、成分分析と遺伝子鑑定法を組み合わせることにより、ビルベリー製品の基原植物に関する簡便かつ明確な確認が可能となった。また、水を試験液として崩壊試験を行なった結果、ビルベリーの場合もは判定基準内に崩壊しない健康食品が検出された。

<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>

D-5 半夏及び天南星

半夏、天南星及び水半夏の標準試料及び天南星の中国市場品の葉緑体 DNA, *trnL-F* IGS 領域の塩基配列解析を行った結果、二つの制限酵素部位のいずれかを利用した PCR-RFLP 法に

よる *Pinellia* 属植物と *Arisaema* 属及び *Typhonium* 属植物との鑑別法が開発可能であると考えられた。一方, Ampdirect Plus-Nova Taq の系で増幅した PCR 産物の塩基配列は, 少数の塩基が異なる類似配列の集合であることが, サブクローニングの結果より明らかになった。この現象は, KOD や KOD FX などの proof reading 酵素により増幅した PCR 産物では減少したことから, PCR 酵素による塩基の取り込みミスが主要因であると思われた。この現象は, 特に半夏由来の PCR 産物において特に顕著であった。本研究の最終目的である「遺伝子情報を用いた半夏の *Arisaema* 属及び *Typhonium* 属植物に対する純度試験の開発」においては, *Arisaema* 属及び *Typhonium* 属植物に特異的な塩基配列を検出する方法の開発が要求されるが, 半夏由来の PCR 産物に取り込みミスが多いことは, 偽陽性を生じる危険性が高いことを意味しており, 看過出来ない。Proof reading 酵素の利用により, この現象は回避可能であるが, 現在市販されている proof reading 酵素は, いずれも Ampdirect Plus-Nova Taq の系に比べ増幅力に劣る。また, 生薬のような DNA polymerase の活性を阻害するような成分を多量に含む試料由来の DNA からの PCR では, 鋳型となる DNA を高純度で抽出, 精製することが要求される。これを避けるためには, DNA polymerase 阻害物質の働きを抑制する Ampdirect Plus の利用は欠かせない。以上のことから, 複数個体の混合試料に適用可能な PCR-RFLP 法の実現には, 検出感度の向上の他に, proof reading 酵素の阻害物質の働きを抑制することが PCR 試薬が必要であると考えられた。

D-6 党参

今回 *Codonopsis* 属 2 種 1 変種で見出された塩基配列のうち, 各種の基本的な配列は, P-0, PM-0, T-I, T-II であると考えられる。さらに, これらの配列を持つ純系植物は互いに交配し, 結果として各種において多型性が認められる結果となったものと考えられる。

C. pilosula var. *modesta* は形態的に *C. pilosula* と酷似するが, 植物全体に毛が少ないことが特徴であるとされる。遺伝子解析の結果から, 上流から 122 番目と 226 番目の塩基がそれぞれ T と C であることが *C. pilosula* var. *modesta* の特徴であると考えられた。*C. pilosula* は上記 2 箇所でヘテロ型の塩基を示す検体が多く, *C. pilosula* の純系と *C. pilosula* var. *modesta* が自然交配し, 栽培されている可

能性が考えられた。一方, *C. pilosula* var. *modesta* においても *C. tangshen* の関与が考えられる検体があった。これらの *C. pilosula* の系統と *C. tangshen* と区別するためには, 上流から 489 番目の塩基の配列が有用であることが判った。

C. tangshen には, 大きく 3 タイプ (T-I, T-II, T-III) の塩基配列が認められ, タイプ T-III は, タイプ T-I と T-II の交配が裏付けられるタイプであった。このタイプは野生品にも栽培品にも認められた。さらに, 野生品と栽培品にはともに 3 タイプの 1 または 2 塩基置換した配列をもつタイプの混在が確認された。T-II の配列を持つものは, 昨年度も 1 検体で認められたが, これには花や果実がなく, 葉が大型であることから, *C. henyi* Oliv. である可能性も考えられると考察した。今年度の解析結果では, T-II の遺伝子型を示す検体が多数あり, それらの外部形態的特徴はほぼ *C. henyi* と合致したが, 同種の重要な特徴とされる開花時に萼が反り返り, 花柱が 3 裂であるなどの点は異なっていた。本報告では便宜上, これらの検体も *C. tangshen* とした。今後, 3 タイプが共生している地点における再調査が必要である。

D-7 リボゾーム RNA 遺伝子に代わる鑑別遺伝子領域の探索

ゲノム断片 62 クローンについて, blastx と tblastn のアルゴリズムを使用したデータベースサーチを実施した。生薬鑑別への応用を考えて, サイズの小さいゲノム DNA を主として解析対象としていること, オオバコ属植物の遺伝子配列に関する情報量が少ないこともあって, 相同配列のヒット率は必ずしも高くなかった。また, 配列を決定した領域のうち 10 個について PCR-RFLP を試みたところ, *P. major* に由来する生薬の鑑別に利用できる可能性のある 1 領域が見出された。

D-8 知母

簡便な試料調製で漢方処方エキス中の知母を確認する方法を確立した。汎用漢方処方に配合される生薬としてオンジにマンギフェリンが含有される報告がある。オンジが配合される漢方処方では加味温胆湯, 加味帰脾湯, 帰脾湯, 天王補心丸, 人参養榮湯等であるが, これらの処方ではチモ配合処方とは重複しないため, 同物質の確認は有効であるものと考えられる。

E. 結論

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

ブラックコホシユ, イチョウ葉及びビルベリ

一の品質確保のため、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、健康食品の中には、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JPの崩壊試験の判定基準を満たさないものが検出された。チェストツリーでは、欧州に流通する9種の医薬品についてHPLCによる成分分析を行い、すべての製品について成分プロファイルが極めて類似し、高度に規格化されていることが明らかとなった。ブラックコホシュでは、TLC及びHPLCによる成分分析とPCRによる遺伝子鑑定法を組み合わせ、我が国に流通する健康食品の実態を調査したところ、ほとんど植物成分を含まない製品や誤った原料植物に由来する製品の存在が確認された。イチヨウ葉については、医薬品あるいは健康食品として流通する製品に対してLC/PDA/MSによる網羅的成分解析を行い、その主成分分析から、健康食品の中に医薬品と異なる成分プロファイルを持つグループの存在が明らかとなった。ビルベリーでは、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すことができた。なお、ここで挙げたもの以外の西洋ハーブについても良好な研究成果が得られているが、承認申請との関係において現時点では公開を見送ることとする。

〈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〉

遺伝子情報を利用した半夏及び天南星の開発には、proof reading 酵素を用いたPCRの系を確立するか、あるいはPCR酵素の正確性が問題とならない手法を検討する必要があると思われる。

党参の産地である甘粛省、重慶市及び湖北省の調査により、『中華人民共和国薬典』に記載される党参の基原種である *C. pilosula*, *C. pilosula* var. *modesta* 及び *C. tangshen* を収集し、それらのITS領域の塩基配列を検討した結果、それぞれの種に基本的な遺伝子型として、タイプ P-0, PM-0, T-I, T-II が見出された。さらに、党参市場品においては、2種1変種の純系と考えられる遺伝子型の他、交配に由来すると考えられる遺伝子型が存在することが明らかとなった。

オオバコのゲノム由来ライブラリーをメチル化制限システムを有する大腸菌を宿主として作成した。このライブラリーを利用して、車

前草・車前子のPCR-RFLPによる鑑別に利用できる可能性のあるサイトを1個見出した。

TLCを利用した知母の確認試験法を確立し、本法は、一般用漢方処方エキスにも有効な試験法であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higano T., Okamoto H., Uetake A., Aketo T., Hakamatsuka T., An analysis of anthocyanins and anthocyanidins in the bilberry health foods, *Japan J. Food Chem. Safety*, **16**, 60-65 (2009).
 - 2) Kondo K., Shiba M., Yotsuyanagi Y., Nishimura N., Maruyama T., Goda Y., Discrimination between *Atractylodes Rhizome* (Byaku-jutsu) and *Atractylodes lancea Rhizome* (So-jutsu) by the PCR-RFLP analysis of ITS region on nrDNA, *J. Jpn. Bot.*, **84**, 356-359 (2009).
 - 3) 丸山卓郎, 宮井美穂, 鎌倉浩之, 中島育美, 川崎武志, 小松かつ子, 藤田正雄, 山本豊, 柴田敏郎, 合田幸広, 遺伝子情報を利用したシゴカの基原種鑑別と純度試験法の検討, *生薬学雑誌*, **64**, 15-20 (2010).
 - 4) Kakigi Y., Mochizuki N., Icho T., Hakamatsuka T., Goda Y., Analysis of Terpene Lactones in a Ginkgo Leaf Extract by High-Performance Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **74**(3), 590-594 (2010).
 - 5) Maruyama, T., Kondo, K., Yotsuyanagi, Y., Yamamoto, Y., Kawasaki, T., Shiba, M., Terasaka, K., Yamane, M., Zhu, S., Sakata, K., Fujita, M., Akiyama, H., Nishimura, N., Komatsu, K., Mizukami, H., Goda, Y., "The inter-laboratory validation study for the purity test of crude drugs based on a PCR-RFLP." *J. Nat. Med.*, accepted.
- ### 2. 学会発表等
- 1) 袴塚高志, 末永恵美, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究(7)チェストツリー製品の崩壊性について, 日本食品化学学会第15回総会・学術大会, 平成21年5月, 東京.
 - 2) Emi Suenaga, Takashi Hakamatsuka, Osamu Iida, Hiroharu Fujino, Fumiya Kurosaki, Shoji Yahara, Yukihiro Goda, Phylogenetic study on *Vitex trifolia* L.

using the nuclear ribosomal DNA ITS and the nuclear *FLORICAULA/LEAFY* second intron, 第 32 回日本分子生物学会, 平成 21 年 12 月, 横浜.

- 3) Goda, Y., Quality control of herbal medicines in Japan, 57th International Congress and Annual Meeting of the GA, August 2009, Geneva. (*Planta Med.* 75, 887 (2009).
- 4) 丸山卓郎, 遺伝子情報を利用した生薬の純度試験の改定について, 大阪生薬協会技術部会特別講演会, 2009 年 10 月, 大阪.
- 5) 丸山卓郎, 遺伝子情報を利用した生薬の純度試験の改定, 第 38 回生薬分析シンポジウム, 2009 年 12 月, 大阪.
- 6) 朱姝, 何敬愉, 陳芳清, 佐藤杏子, 合田幸広, 小松かつ子: 党参の基原と品質に関する研究 (1) —*Codonopsis* 属植物及び党参の ITS 領域の塩基配列について. 日本薬学会第 130 回年会, 2010, 3/28-30, 岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

先端技術を応用した製剤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 薬品部

研究者 川西 徹

研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨 機能性製剤の品質確保の方策の策定にむけて、(1)リポソーム製剤、ナノ粒子製剤、難溶性製剤等の製剤機能評価法；(2)超難溶性薬物の可溶化法として注目されている非晶質化製剤、ナノ微粒子化製剤、Cocrystal 製剤における可溶化等に関する物性評価法；(3)医薬品製造工程のオンラインリアルタイムモニタリングへの応用を視野にいれた分析法 に関する研究を行った。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 四方田千佳子
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 伊豆津健一
- (3) 星薬科大学薬学部 米谷芳枝
- (4) 国立がんセンター 松村保広
- (5) 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作
- (6) アステラス製薬 北村 智
- (7) 大鵬薬品 馬場一彦
- (8) ニプロパッチ 山内仁史
- (9) ヤンセンファーマ 中島辰巳
- (10) 富山産業 中川知秀
- (11) 国立医薬品食品衛生研究所 吉岡澄江
- (12) 国立医薬品食品衛生研究所 阿曾幸男
- (13) 国立医薬品食品衛生研究所 宮崎玉樹
- (14) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (15) 塩野義製薬 村主教行
- (16) 第一三共製薬 中上博秋
- (17) 中外製薬 小川 裕
- (18) 武田薬品 池田幸弘
- (19) 国立医薬品食品衛生研究所 檜山行雄
- (20) 東邦大学薬学部 寺田勝英
- (21) 国立医薬品食品衛生研究所 坂本知昭
- (21) 国立医薬品食品衛生研究所 小出達夫
- (22) ファイザー 山田清孝
- (23) パウレック 高嶋武志
- (24) 参天製薬 木村章男
- (25) 塩野義製薬 片岡隆博
- (26) 武田薬品工業 小澤昭夫
- (27) 日揮 渡辺恵市郎
- (28) 田辺三菱製薬 土屋 亨

A. 研究目的

ナノテクノロジー等の先端技術を利用し、製剤に機能を付与した機能性製剤は、既存の医薬品資源の有用性の向上あるいはゲノム創薬等の新しい手法で見いだされる医薬品シーズを有効かつ安全な医薬品とする上で重要な技術である。本研究は、品質確保の方策が確立していない機能性製剤について、産官学が共同して品質確保の方策を策定するための基礎データを得ることを目的として実施する。

研究は (1)いくつかの機能性製剤の製剤機能評価法開発、(2)非晶質化法、ナノレベル微粒子化法あるいは可溶化剤適用によって製造した超難溶性製剤の製剤機能解析法開発および品質確保の方策の検討、(3)機能性製剤等の製剤開発および製法工程管理の方策の検討 から構成される。

B. 研究方法

(1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

1-1)多変量解析(クラスター分析)により市販リポソーム製剤の品質と製剤特性の関係を検討、さらに指標薬物を封入したリポソームを調製、薬物の放出への試験液中の界面活性剤および細胞培養液・上清等の影響を検討；1-2)フィチン酸(イノシトール 6 リン酸: IP6)を用いたキレート法によりリポソームにイリノテカンを封入し、封入効率と血中滞留性および抗腫瘍効果を検討、さらに腫瘍抗原タンパク質を内包した両親媒化ポリγ-グルタミン酸(γ-PGA)ナノ粒子(NP)を作製しマウスに投与、腫瘍の生着率等を検討；1-3)開発段階にあるミセル体制剤につき薬理、抗腫瘍効果、毒性のプロファイルを基礎と臨床の両面から検討；1-4)舌表面を模した多孔板と上顎の役目を果たす重りおよび水分供給機構を持つ装置を用い、口腔内崩壊錠の崩壊性等を検討；1-5)フローセル法を用い