

図1-1 13種類のED治療薬やそれらの構造類似体の移動相A溶液(0.01mg/mL)のLCクロマトグラム、トータルイオンクロマトグラム(TIC)、マスキングクロマトグラム

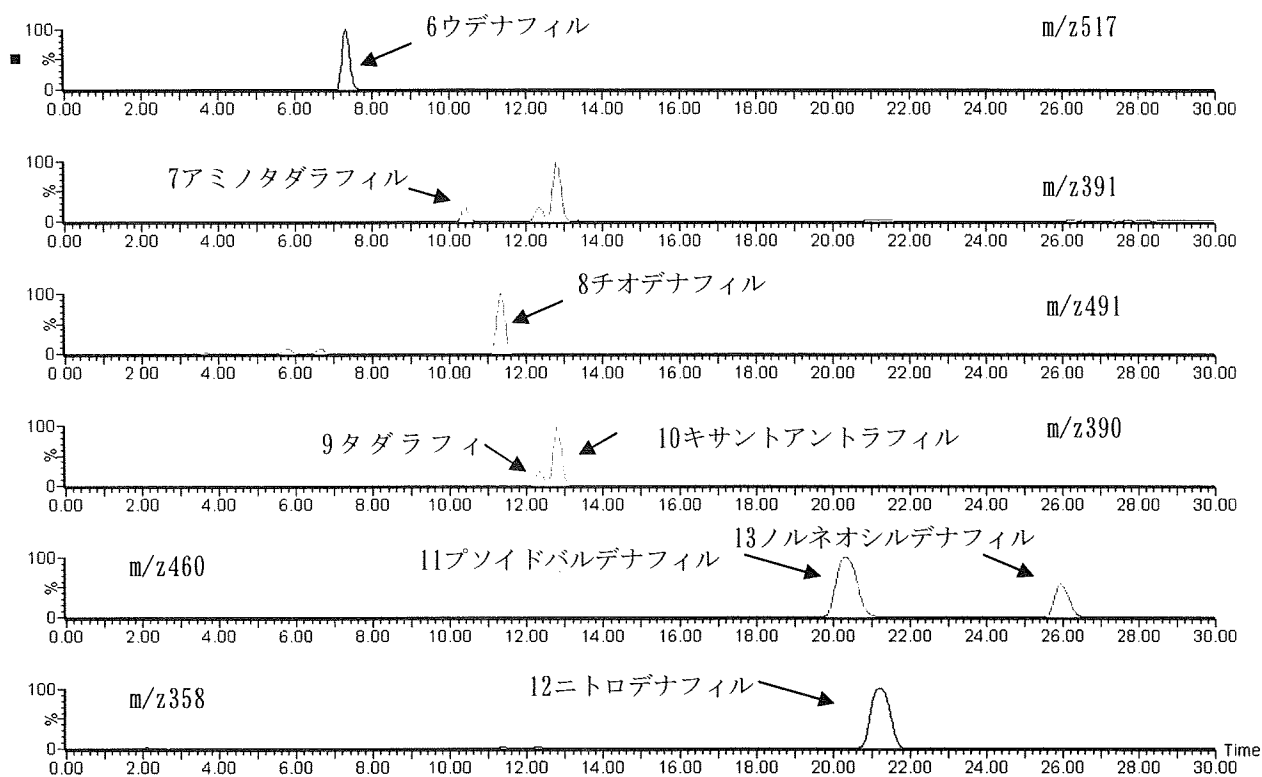


図1-2 13種類のED治療薬やそれらの構造類似体の移動相A溶液 (0.01mg/mL) のLCクロマトグラム、トータルイオンクロマトグラム (TIC)、マスクロマトグラム (図1-1の続き)

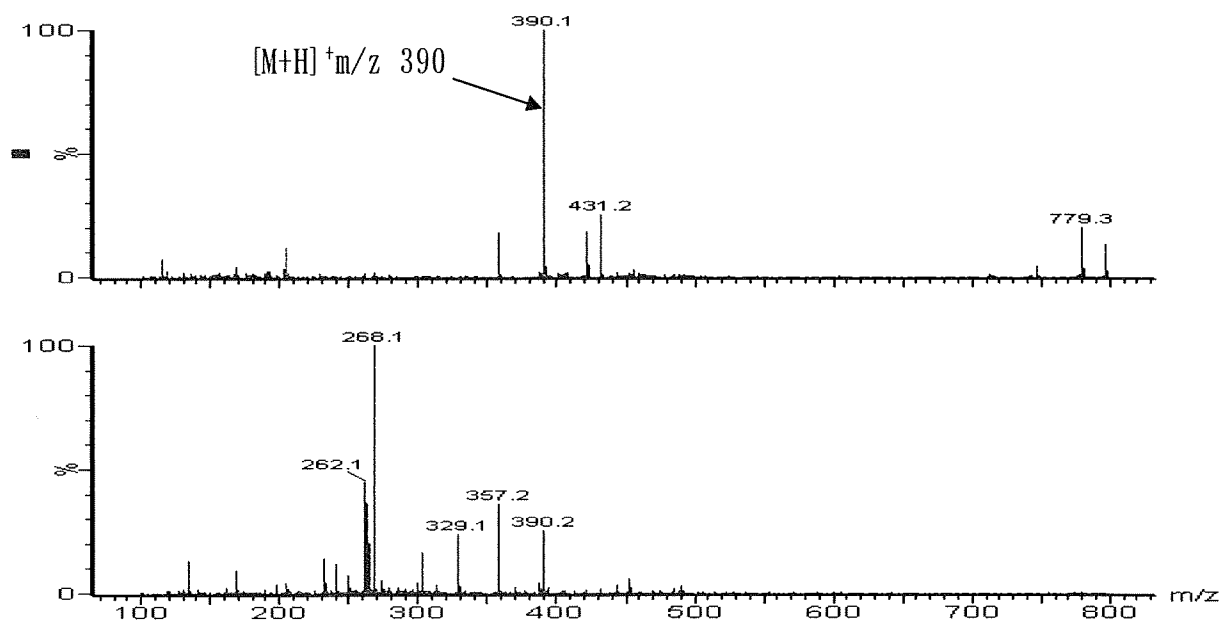


図2 タダラフィル標準試料のマススペクトル [コーン電圧 20V (上段)、60V (下段) ]

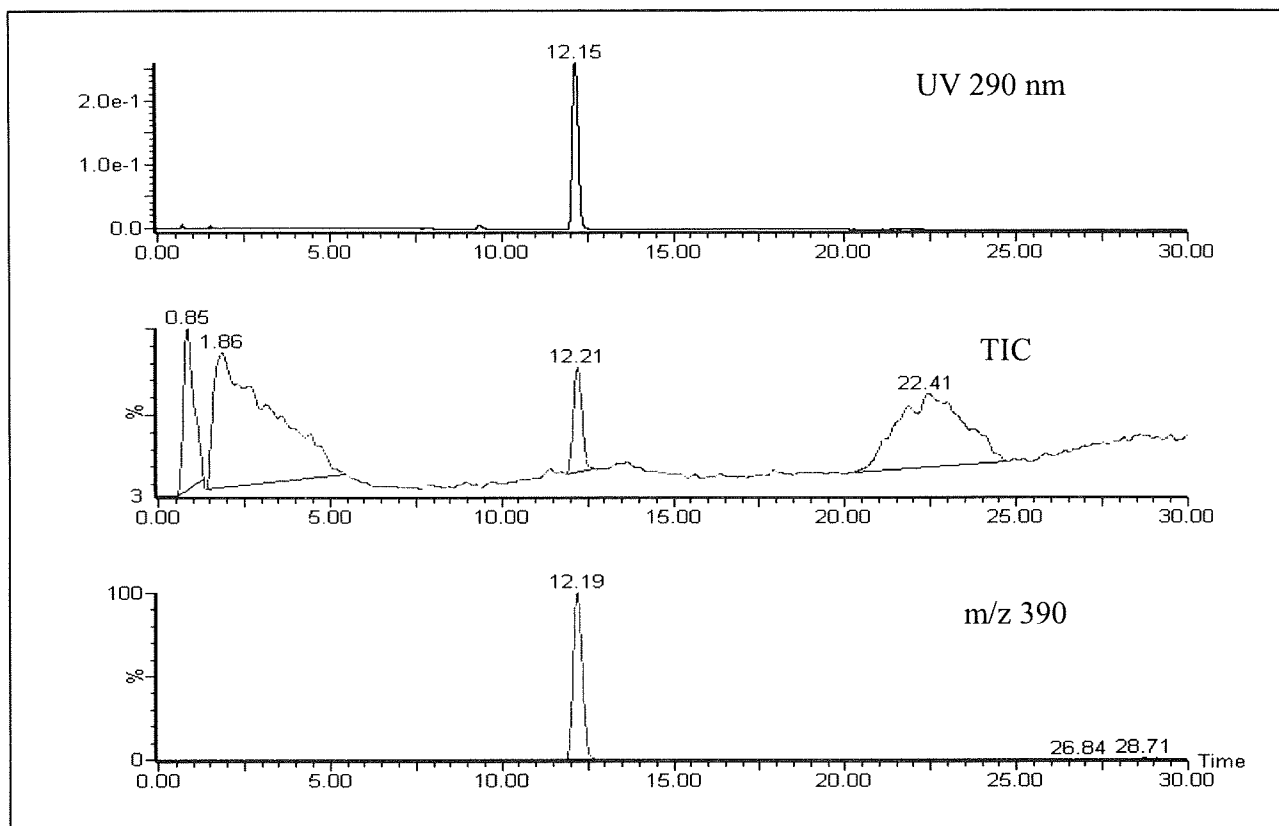


図3 強壯を標榜する健康食品のカプセル基剤抽出物のLCクロマトグラム、トータルイオンクロマトグラム (TIC)、マスキロマトグラム

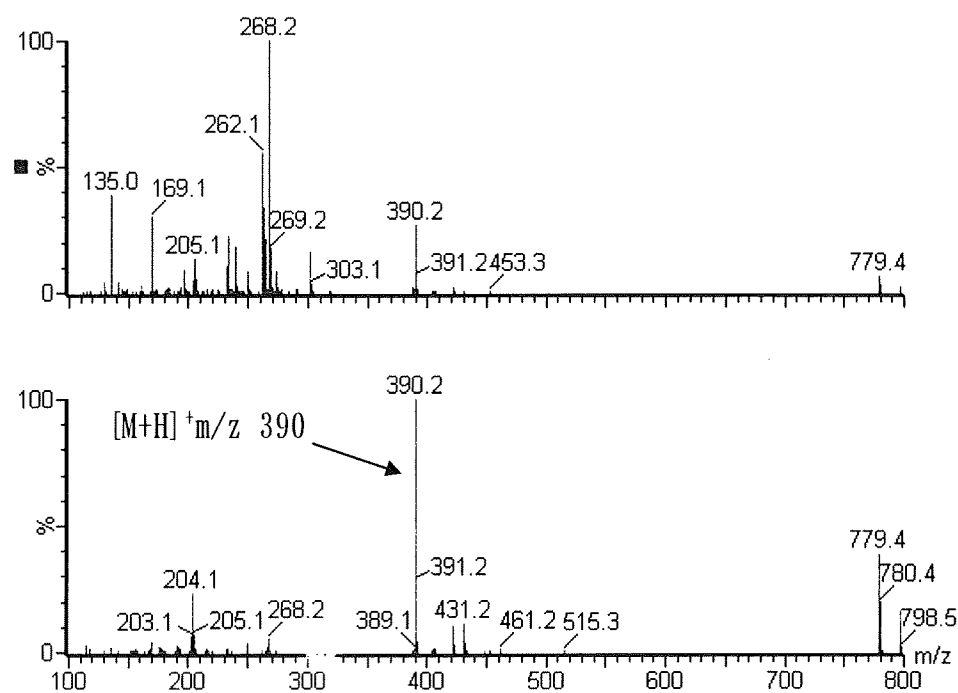


図4 強壯を標榜する健康食品のカプセル基剤抽出物のマススペクトル [コーン電圧 60V (上段)、20V (下段) ]

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析，有害性評価に関する研究  
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

協力研究者：栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

無承認無許可医薬品の規制のためのインシリコ評価法に関する研究

無承認無許可医薬品を迅速に規制、検挙するためには、これらの迅速な活性評価スクリーニングが必要である。そこで本研究では *in silico* による評価法の開発に関する研究を行っている。本年度は、ヒドロキシチオホモシルデナフィルと Human phosphodiesterase 5 (PDE5) とのコンピュータシミュレーションによる結合モデルを構築し、活性について考察した。

A. 研究目的

無承認無許可医薬品であるシルデナフィル類似物質 (PDE5 阻害剤) が健康被害の危険性があり、大きな問題となっている。これら無承認無許可医薬品を迅速に規制、検挙するためには、これら不適切な化合物の迅速な活性評価スクリーニングが必要である。しかし、*in vitro*, *in vivo* 試験では時間がかかり、迅速な対応が困難である。そこで本研究では *in silico* による評価法の開発を目的とする。

B. 研究方法

シルデナフィルは、生体内で環状グアノシリン酸 (cGMP) の分解を行っている 5 型ホスホジエステラーゼ (PDE5) の酵素活性を阻害する。(図 1, 図 2) これが NO 作動性神経に作用して血管を拡張させ、血流量が増えることによって活性を発現すると考えられている。シルデナフィル類似物質と Human Phosphodiesterase 5 (PDE5) との結合モデルを以下のようにして構築した。PDE5 の三次元構造は X 線構造 (PDB ID: 1UDT) を用いた。タンパク質内の薬物のコンフォメーションは、プログラム *MacroModel* (Schrodinger, Inc.) のコンフォメーションルサーチ (条件: Mixed MCMM / Low Mode, Amber\*) を用いて求めた。コンフォ

メーションルサーチで得られた最安定構造を結合モデルとした。水素結合を中心に結合モデルの評価を行った。

本年度はヒドロキシチオホモシルデナフィルについて行った。

C. 研究結果と考察

1. ヒドロキシチオホモシルデナフィルと PDE5 の結合モデル

ヒドロキシチオホモシルデナフィル (図 3) と PDE5 (1UDT) の結合モデルを構築した。(図 4) その結果、これらはシルデナフィルが結合した部位にほぼ同一の配向性で結合することが明らかとなった。さらに、シルデナフィルは活性ドメインにおいて Gln817 と水素結合を形成するが、これらも同様に Gln817 と水素結合を形成しうることが示された。(図 4) このことにより、これらは同一の作用機序でシルデナフィルの標的分子である PDE5 を阻害することが予測される。

D. 結論

ヒドロキシチオホモシルデナフィルが PDE5 と結合し、阻害活性を有することを定性的に予測した。今後、定量性を得るためにはさらなる検討が必要である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表等

Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y.,  
Kurihara, M., Suemune, H.  
Helical-Screw Directions of Diastereoisomeric  
Cyclic- $\alpha$ -Amino Acid Oligomers  
*Org. Lett.*, **11**, 1135-1137 (2009)

N. Suzuki, T. Suzuki, Y. Ota, T. Nakano, M.  
Kurihara, H. Okuda, T. Yamori, H. Tsumoto, H.  
Nakagawa, N. Miyata  
Design, Synthesis, and Biological Activity of  
Boronic acid-Based Histone Deacetylase  
Inhibitors  
*J. Med. Chem.*, **52**, 2909-2922 (2009)

W. Hakamata, M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio,  
T. Oku  
Design and Screening Strategies for  $\alpha$ -  
Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological  
Information  
*Curr. Top. Med. Chem.*, **9**, 3-12 (2009)

S. Honzawa, N. Takahashi, A. Yamashita, T.  
Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A.  
Kittaka

Synthesis of a  $1\alpha$ -C-methyl analogue of  
25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>: interaction with a mutant  
vitamin D receptor Arg274Leu  
*Tetrahedron*, **65**, 7135-7145 (2009)

M. Kurihara, Y. Sato, N. Yamagata, H. Okuda, M.  
Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune  
Computational Study on Helical Structure of  
 $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Oligopeptides Containing  
Chiral  $\alpha$ -Amino Acids  
*Peptide Science 2008*, 149-150 (2009)

Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka,  
A  
Cooperative Strand Invasion by Peptide Nucleic  
Acid  
*Peptide Science 2008*, 481-282 (2009)

Tanaka, M., Nagano, M., Demizu, Y., Doi, M.,  
Kurihara, M., Suemune, H.  
Controlling  $\alpha$ -helical secondary structure of  
oligopeptides and its use as a chiral catalyst  
*Peptide 2008*, 104-105 (2009)

Y. Demizu, N. Yamagata, Y. Sato, M. Doi, M.  
Tanaka, H. Okuda, M. Kurihara  
Controlling the helical screw sense of peptides  
with C-terminal L-valine  
*J. Pept. Sci.* 2010, 153-158

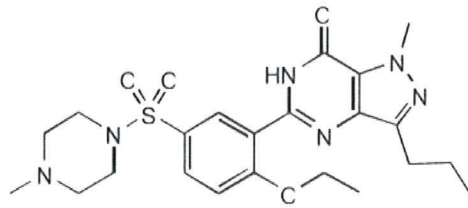


図1 シルデナフィルの構造

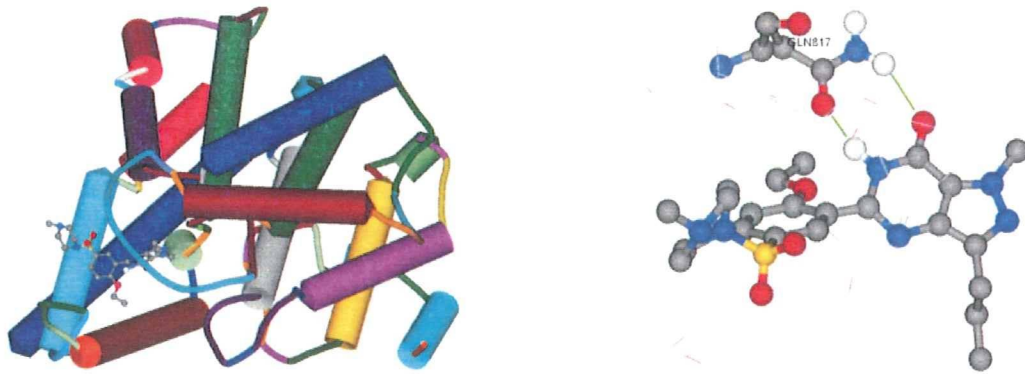


図2 シルデナフィルが結合した PDE5 の X線構造 (PDB ID: 1UDT) (左), PDE5 との水素結合 (右)

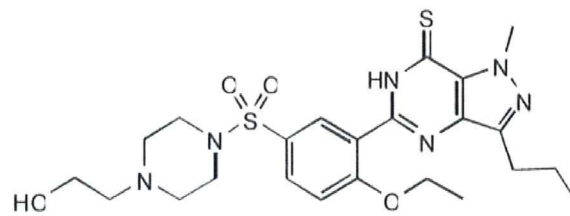


図3 ヒドロキシチオホモシルデナフィルの構造

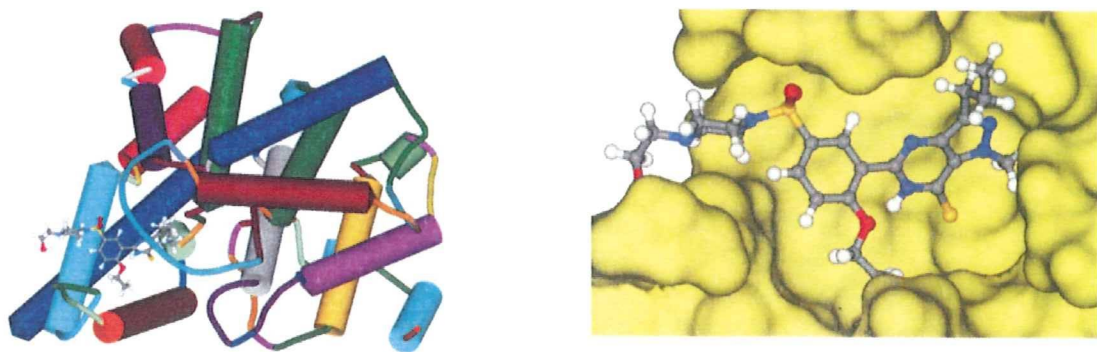


図4 ヒドロキシチオホモシルデナフィルと PDE5 との結合モデル

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析，有害性評価に関する研究  
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

「いわゆる健康食品」から検出された勃起不全（ED）治療薬類似構造化合物の  
Phosphodiesterase 6（PDE6）阻害活性について

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

研究要旨 「いわゆる健康食品」に違法に混入された ED 治療薬の構造類似化合物の有害事象に関しては不詳であるが，類推される副作用で，危険度が高いもののひとつに，同じ酵素ファミリーである PDE6 阻害が考えられる。PDE6 は主に網膜に発現しており，PDE6 阻害の程度によっては ED 治療薬の構造類似化合物による視覚障害も懸念される。これらの点から「いわゆる健康食品」から単離・精製した ED 治療薬類似構造化合物の PDE6 阻害活性試験を行った。その結果，これらの化合物は，ED 治療薬と同等かより強い活性を示し，ED 治療薬構造類似化合物による色覚異常の副作用が生じる可能性が示唆された。

協力研究者

最所和宏 国立医薬品食品衛生研究所生薬部  
主任研究官

#### A. 研究目的

ED 治療薬（医薬品成分）であるシルデナフィル（商品名バイアグラ），バルデナフィル（商品名レビトラ），タダラフィル（商品名シアリス）等や，これら医薬品成分の一部改変した構造をもつヒドロキシホモシルデナフィル，ホモシルデナフィル，ホンデナフィル，プソイドバルデナフィルアミノタダラフィル等の新規な成分を，強壯を謳う健康食品に偽って意図的に添加した事例が後を絶たない。

ED 治療薬は phosphodiesterase（PDE）ファミリーのひとつである PDE5 を阻害することにより活性を示す。ED 治療薬に類似した構造を持つ化合物に関しては，ヒト PDE5 の活性部位と

の結合シミュレーション<sup>1,2)</sup>の結果，ED 治療薬と同様に PDE5 阻害活性を有すると推定された。さらに，単離・精製し構造解析に供した化合物の一部については，PDE5 阻害活性試験を行い，ED 治療薬と同等の活性を示すことを明らかにしてきた<sup>15,16)</sup>。

一方，ED 治療薬の構造類似化合物の有害事象に関しては不詳であるが，類推される副作用で，危険度が高いもののひとつに，同じ酵素ファミリーである PDE6 阻害が考えられる。PDE6 は主に網膜に発現しており，副作用として色覚異常が報告<sup>10)</sup>されているシルデナフィルの場合，PDE5/PDE6 の IC50 値比が 1/10<sup>3)</sup>であることから PDE6 阻害の程度によっては ED 治療薬の構造類似化合物による視覚障害も懸念される。これらの点を考慮して，ED 治療薬構造類似化合物の PDE6 阻害活性試験を行うこととした。

## B. 研究方法

試料：アミノタダラフィル (ATDF, 1), プソイドバルデナフィル (PVDF, 2), チオデナフィル (TSDF, 3), ホンデナフィル (HNDF, 4), ノルネオシルデナフィル (NNSDF, 5) 及びニトロデナフィル (NTDF, 6) はそれぞれが含まれていた「いわゆる健康食品」から単離・精製したものを用いた。各 ED 治療薬及びその類似化合物 1~6 の構造を図 1 に示した。

### PDE6 阻害活性試験<sup>3, 4)</sup>

ウシ網膜由来 PDE6 を用い、基質 cGMP の加水分解産物 5' GMP をさらにヌクレオチダーゼでグアノシンとし、反応液を陰イオン交換樹脂カラムに供し、流出液のグアノシン量を測定することにより、阻害活性を測定した。

40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM 2-mercaptoethanol を含む酵素液に、10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup> M の試料溶液を加え、さらに 1 μM の基質溶液を加え 30 °C 30 分間反応させた、反応を停止させた後、ヘビ毒溶液を加えて加水分解を行い、これを陰イオン交換樹脂に供し流出液を集めグアノシン量を測定した。

## C. 研究結果

### PDE6 阻害活性試験

図 2 に、それぞれの化合物の対数濃度-PDE6 阻害活性曲線を示した。各濃度における阻害活性率を● (ATDF), ■ (PVDF), ▲ (TSDF) 及び○ (HNDF) で示した。また、表 1 にそれぞれの化合物及び対照に用いた zaprinast の IC<sub>50</sub> 値を示した。

## D. 考察

表 2 に ED 治療薬の PDE5 及び PDE6 阻害活性 (文献値)<sup>3, 5-14)</sup> と今回試験を行った構造類似体の PDE5<sup>15-16)</sup> 及び PDE6 阻害活性を示した。

ED 治療薬は、PDE6 阻害に対して、より選択的に PDE5 阻害活性がある。PDE5/PDE6 阻害活性比は、シルデナフィル, バルデナフィルで 10 倍程度, タダラフィルでは、1000 倍程度であ

る。また、PDE6 阻害活性において、バルデナフィルでは、桿体 (rod) 及び錐体 (cone) 視細胞間で 6 倍近く活性に差があることが知られているが、シルデナフィル及びタダラフィルでは大きな違いは無い。

今回の試験では、プソイドバルデナフィル (PVDF, 2, 別名 piperidenafil) の PDE6 阻害活性が最も強く、その IC<sub>50</sub> 値は、0.21 nM と、PDE5 に対する値 0.48 nM よりも小さいものであり、本化合物はより選択的に PDE6 を阻害することが明らかとなった。同化合物は、2005 年 (平成 17 年) に違法薬物市場に出現し<sup>17)</sup>、日本では、平成 17 年 11 月 22 日に、愛知県の業者が販売した製品から検出された (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/11/h1122-2.html>) のを始めとして、我々の実態調査においても平成 17 年度、18 年度に複数回検出がなされている化合物である。また、厚生労働省のサイトにおいても、本化合物は、平成 17 年後半から平成 19 年にかけて 14 件の検出が報告されている (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>)。本化合物は、PDE6 阻害活性が PDE5 阻害活性を上回るものであることから、ED 治療薬様の作用が生じるときには、明らかに、副作用である色覚異常を生じる可能性が高く、非常に注意を要する化合物と考えられる。なお、本化合物は、その末端構造から、バルデナフィルよりも代謝されにくいことが予想され、血中濃度が減衰されにくい一方、脂溶性が高いことから脳血液関門を通過しやすいため、神経系にもよりダメージを与える可能性が高いことが指摘されている<sup>15)</sup>。

3-6 のシルデナフィル系の化合物では、IC<sub>50</sub> 値は、数 nM-数 10 nM であり、この値は、PDE5 に対するものと比較して、4 倍から 6 倍程度大きいものであり、その選択性は、10 倍程度あるシルデナフィルと比較して小さくなっていた。従って、これらの化合物も、シルデナフィルよりも、副作用である色覚異常が生じる可能性が明らかに高いものと考えられる。



タダラフィル構造類似化合物の1の場合、その阻害活性は1mMでも25%しか阻害をしめさず、IC50値は、明らかに、PDE5に対するものより大きいものと考えられた。従って、本化合物の場合、タダラフィルと同様に、PDE5選択阻害活性が強く、PDE6阻害による副作用の可能性はそれほど高くないものと推定された。なお、本化合物は、その構造よりタダラフィルより反応性が高いものと考えられることから、不可逆的な酵素阻害を起こす可能性が示唆されており<sup>15)</sup>、その点を考えると、危険性は高い化合物であるものと考えられる。

通常、ED治療薬構造類似化合物が「いわゆる健康食品」に混入されている量は、PDE5阻害活性をある程度考慮した量である。従って、2, 4-6のような化合物を意図的に混入した「いわゆる健康食品」では、基となったED治療薬よりもPDE6阻害が強く現れ、色覚異常の副作用が生じやすいことが強く懸念された。

今回、PDE6阻害活性について試験を行ったが、これらED治療薬構造類似化合物の、他のPDEファミリーに関する阻害活性については明らかにされておらず、その副作用は未知である。従ってこの様な物質を含む「いわゆる健康食品」を摂取することは非常にリスクの高い行為であると考えられ、引き続き、監視、取締まりが重要であるものと考えられた。

## E. 結論

1. 「いわゆる健康食品」より単離したED治療薬構造類似化合物1-6についてPDE6阻害活性試験を行い、その阻害活性をPDE5のものと比較した。その結果、2において、よりPDE6選択的に阻害活性を示すことが明らかとなり、本化合物では、色覚障害の副作用の危険性が高いことが明らかとなった。

2. シルデナフィル類似化合物でも、シルデナフィルと比較して、PDE5選択性は、小さくなっており、混入されている構造類似化合物量を考えると、シルデナフィルと同様の副作用が生じ

る可能性がより高いものと考えられた。

## 参考文献

- 1) 栗原正明, 合田幸広: 無承認無許可医薬品の規制のためのインシリコ評価法に関する研究, 厚労科研費(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)の有効性及び安全性等の評価に関する研究平成17年度分担研究報告書
- 2) 栗原正明, 合田幸広: 無承認無許可医薬品の規制のためのインシリコ評価法に関する研究, 厚労科研費(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究平成20年度分担研究報告書
- 3) Ballard, S. A., Gingell, C. J., Tang, K., Turner, L. A., Price, M. E. and Naylor, A. M.: Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes, *J. Urolol.*, **159**, 2164-2171 (1998)
- 4) 実験はCerep社(Poitiers, France)で行われた。
- 5) Gresser, U., Gleiter, G. H.: Erectile Dysfunction: Comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil. Review of the literature, *Eur. J. Med. Res.*, **7**, 435-446(2002)
- 6) Keating, G. M. and Scott, L. J.: Vardenafil. A review of its use in erectile dysfunction, *Drugs*, **63**, 2673-2703 (2003)
- 7) Turko, I. V., Ballard, S. A., Francis, S. H. and Corbin, J. D.: Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds, *Mol. Pharmacol.*, **56**,

- 124-130 (1999).
- 8) Kotera, J., Fujishige, K., Michibata, M., Yuasa, K., Kubo, A., Nakamura, Y. and Omori, K.: Characterization and effects of methyl-2-(4-aminophenyl)-1,2-dihydro-1-oxo-7-(2-pyridinylmethoxy)-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-3-isoquinoline carboxylate sulfate (T-1032), a novel potent inhibitor of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5), *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1333-1341 (2000).
- 9) Wang, P., Wu, P., Myers, J. G., Stamford, A., Egan, R. W. and Billah, M. M.: Characterization of human, dog and rabbit corpus cavernosum type 5 phosphodiesterases, *Life Sci.*, **68**, 1977-1987 (2001).
- 10) Weeks II, J. L., Zoraghi, R., Beasley, A., Sekhar, K. R., Francis, S. H. and Corbin, J. D.: High biochemical selectivity of tadalafil, sildenafil and vardenafil for human phosphodiesterase 5A1 (PDE5) over PDE11A4 suggests the absence of PDE11A4 cross-reaction in patients, *Int. J. Impotence Res.*, **17**, 5-9 (2005).
- 11) Corbin, J. D., Beasley, A., Blount, M. A. and Francis, S. H.: vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5), *Neurochem. Int.*, **45**, 859-863 (2004).
- 12) Blount, M. A., Beasley, A., Zoraghi, R., Sekhar, K. R., Bessay, E. P., Francis, S. H. and Corbin, J. D.: Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation, *Mol. Pharmacol.*, **66**, 144-152 (2004).
- 13) Curran, M. P. and Keating, G. M.: Tadalafil, *Drugs*, **63**, 2203-2212 (2003).
- 14) Kotera, J., Fujishige, K., Michibata, H., Yuasa, K., Kubo, A., Nakamura, Y. and Omori, K.: Characterization and effects of methyl-2-(4-aminophenyl)-1,2-dihydro-1-oxo-7-(2-pyridinylmethoxy)-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-3-isoquinoline carboxylate sulfate (T-1032), a novel potent inhibitor of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5), *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1333-1341 (2000)
- 15) 鎌倉浩之, 合田幸広: 「いわゆる健康食品」から検出された勃起不全 (ED) 治療薬類似化合物について, 厚労科研費 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) の有効性及び安全性等の評価に関する研究 平成 17 年度分担研究報告書
- 16) Goda, Y., Kamakura H., Functional Food, Erectile dysfunction drug ingredients and related compounds found in health foods and their adverse effects, **2**, 198-202 (2008)
- 17) Reepmeyer, J.C., Woodruff, J.T., Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a hydrolytic technique for the detection and structure elucidation of a novel synthetic vardenafil designer drug added illegally to a "natural" herbal dietary supplement, *J. Chromatogr. A.*, **1125**, 67-75 (2006).
- 18) 日本医薬品集フォーラム: 日本医薬品集医療薬 2008 年版, じほう, 東京

F. 健康危機情報

プソイドバルデナフィルは、より PDE6 選択的に阻害活性を示すため、色覚障害の副作用が出現する危険性が高い。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表等

1) 鎌倉浩之，最所和宏，合田幸広「ED 治療薬

類似化合物の PDE6 阻害活性について」第 16 回日本食品化学学会総会・学術大会(2010. 6) 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



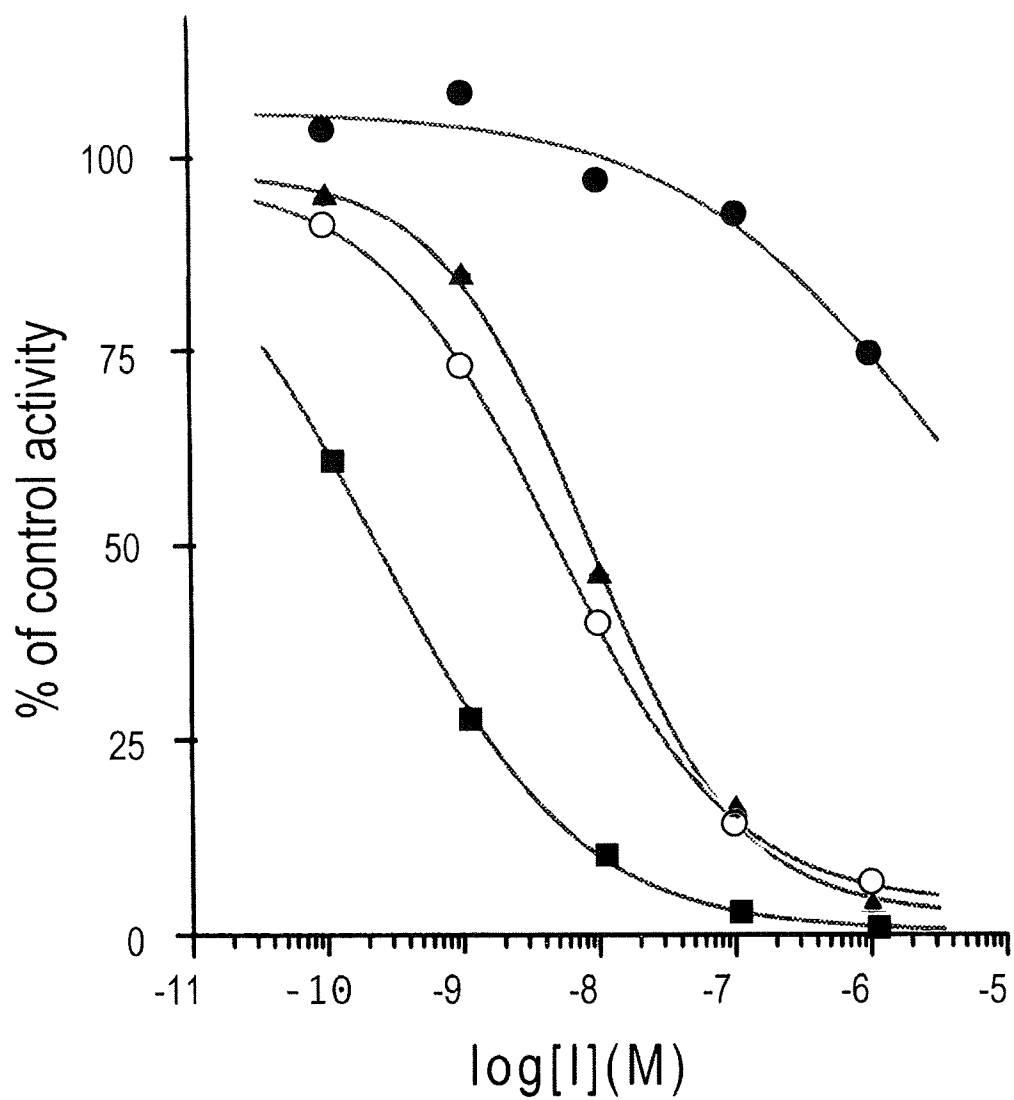


図2 ATDF (●), PVDF (■), TSDF (▲) 及び HNDF (○) それぞれの対数濃度-PDE6 阻害活性曲線

表 1 ED 治療薬類似構造化合物及び対照化合物 (zaprinast) の PDE6 の 50%阻害活性値 (IC<sub>50</sub>)

	IC <sub>50</sub> (nM)	nH*
ATDF	> 1000	-
PVDF	0.21	0.6
TSDF	8.5	0.8
HNDF	5.0	0.7
NNSDF	11	0.6
NTDF	33	0.7
zaprinast	290, 250	0.9

\*) Hill constant

表 2 ED 治療薬とその類似構造化合物の PDE5 及び PDE6 阻害活性

compound	IC <sub>50</sub> (nM)	
	PDE5	PDE6
sildenafil	3.5~4.0 <sup>3,7-11)</sup> , 1.3 <sup>*)</sup>	29 <sup>14)</sup> , 33 <sup>3)</sup> , 37 (rod) <sup>5)</sup> , 34 (cone) <sup>5)</sup>
vardeafil	0.091~0.7 <sup>5,10-13)</sup>	3.5 (rod) <sup>5)</sup> , 0.6 (cone) <sup>5)</sup>
tadarafil	0.9~1.8 <sup>5,6,10,11)</sup>	730 <sup>6)</sup> , 1260 (rod) <sup>5)</sup> , 1300 (cone) <sup>5)</sup>
ATDF	0.18 <sup>*)</sup>	> 1000 <sup>*)</sup>
PVDF	0.48 <sup>*)</sup>	0.21 <sup>*)</sup>
TSDF	-	8.5 <sup>*)</sup>
HNDF	1.2 <sup>*)</sup>	5.0 <sup>*)</sup>
NNSDF	2.9 <sup>*)</sup>	11 <sup>*)</sup>
NTDF	5.5 <sup>*)</sup>	33 <sup>*)</sup>

\*) our results

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析, 有害性評価に関する研究  
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別  
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 徳本廣子

センナ茎由来と称する食品中に、「専ら医薬品成分」であるセンナの小葉や葉軸, 果実などが混入している例が明らかにされている。刻みの製品であれば, 肉眼でもこれらの混入を判別することは可能であるが, 製品が粉末状の場合, 特に茎と葉軸の鑑別は難しい。この問題を解決するため, 本研究では, 鏡検により, センナ茎粉末と葉軸粉末が鑑別できるかどうか検討した。

その結果, センナの茎には, 規則的に気孔が分布する部位があり, この部位はほぼ方形～等径性多角形の表皮系細胞より形成されている一方, 気孔周辺の表皮細胞の長軸方向の径は, ほとんど全て, 気孔のものより小さいことが判明した。これに対し葉軸では, 主として長軸方向に長い長方形～長六角形の表皮細胞より形成されており, 気孔周辺の表皮細胞は近接した気孔よりも長軸方向の径が大きいことが判明した。さらに茎, 葉軸を混合した粉末においても, 出現する表皮片は由来する組織に見られた特徴をよく表しており, 両者を区別することが可能であることが判明した。

以上, 本研究により, 気孔周辺の表皮細胞の形状を観察することで, センナ茎粉末中に混入した「専ら医薬品成分」である葉軸粉末を容易に確認できることが明らかとなった。

## A. 研究目的

センナの茎は痩身を目的とした食品としてティーバッグなどに用いられているが, 市販製品中に医薬品の常用量に近いセンノシドが検出される例が後をたたく, そのような製品中に、「専ら医薬品成分」であるセンナの小葉や葉軸, 果実などが混入している例が明らかにされている<sup>1-5)</sup>。刻みの製品であれば, 肉眼でもこれらの混入を判別することは可能であるが, 製品が粉末状の場合, 特に茎と葉軸の鑑別は難しく, 多数の試みはなされているものの<sup>2,5,6)</sup>, 著者らが知る限り, 両者を明確に区別できる特徴について報告された例はない。本研究では, 上記の問題を解決するため, 鏡検により, センナ茎粉末と葉軸粉末が鑑別できるかどうか検討した結果, 気孔周辺の表皮細胞の形状を観察することで, センナ茎粉末中に混入した「専ら医薬品成分」である葉軸粉末を容易に確認できることが明らかとなったので報告する。さらに, センナ各部位を鑑別するためのマニュアルとすべく, 他の部位の組織も含め組織の特徴点を示した基準となる写真を掲げた。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### 1.1 栽培品

アレキサンドリアセンナ *Cassia acutifolia* (2008-10-A21), チンネベリセンナ *C. angustifolia* (2008-10-B9)。

医薬基盤研究所種子島研究部栽培品を東京都世田谷区に移し継続栽培。2008年10月-2009年5月に簡易温室にて生育中の株を使用。

#### 1.2 乾燥標本

アレキサンドリアセンナ *C. acutifolia* (2009-10-C1, 2009-10-C2), チンネベリセンナ *C. angustifolia* (2009-10-D1, 2009-10-D2)。

富山大学薬学部付属薬用植物園栽培品。2009年10月に採集し腊葉としたものを使用。

### 2. 使用機器と試薬

#### 2.1 機器

外部形態の観察にはルーペおよびキーエンスデジタルマイクロスコープズームレンズ(VH-Z25)を用い, 10~175倍(=15インチモニター上での倍率)にて観察, 内部形態および粉末の観察には, オリumpa

ス光学顕微鏡BH-2を用い、常光および偏光下で観察した。切片の作成には凍結マイクローム(ヤマト光機工業)を使用した。キーエンスデジタルマイクروسコープ(KEYENCE VH-8000C)を用い、測定および写真の撮影を行なった。

## 2.2 試葉

封入剤としてグリセリン水(グリセリンと精製水を 1:1 で混合したもの)を使用した。

## 3. 方法

### 3.1 材料の調製

栽培品は、生育中の株の中央部、先端部および基部を含む数箇所から、茎、葉軸を採取して試料とした。組織の概要を把握するため、切片を作成し観察に供した。表皮細胞の観察には、最外層を徒手により剥離して作成した切片を用いた。さらに各組織を数日間風乾したのち、部位別に粉末を作成し、80 号篩または 100 号篩通過粉末について、組織の出現状況を比較した。最後に各組織混在下での出現状況を把握するため、約 5cm の茎 1 本、葉軸 2 本を混合した粉末を作成し、表皮細胞の出現状況を確認、鑑定の際の留意点を検討した。

乾燥品(1.2 富山大学より提供)は、茎、葉軸の先端部、中央部、基部より、組織を削り取り、または粉末を作成し試料としたほか、適当な大きさに切断した組織片を、暫時水に浸したのち、剥離切片を作成し表皮細胞の観察を行い参考とした。

その他、果軸、小葉、果実についても観察を行なった。

## 3.2 プレパラートの作成および鏡検

### 3.2.1 切片

マイクロームにより作成した切片および徒手により剥離した表皮は、スライドガラス上にとり、封入剤としてグリセリン水を 1~2 滴滴下した後、気泡が封入されないようカバーガラスで覆い、40 倍、100 倍、400 倍で鏡検し、計測を行なった。マイクロームにより作成した切片の厚さは 20~40 $\mu\text{m}$ 。表皮の剥離切片は各部位につき 10 検体を目安に作成し、観察、計測を行なった。気孔の副細胞、ならびに毛の周囲の表皮細胞を除く、ほぼ連続した 10 個の表皮細胞について、測定した長軸方向の径を比較検討に用いた。さらに同一視野および同一切片中に出現した気孔について、長軸方向の径(孔辺細胞の長径)を測定し、表皮細胞との比較に用いた。400 倍で鏡検した際の視野あたり、または撮影した写真(対物レンズ 40 倍

×FKレンズ 2.5 倍)1 枚中に出現する気孔の数を、気孔の分布の目安とした。

### 3.2.2 粉末

時計皿にグリセリン水を数滴滴下し、ここに少量の試料をとりガラス棒でかき混ぜた後、2~3 分以上放置して気泡を除いた。この少量をガラス棒の先でスライドガラスにとり、封入剤としてグリセリン水を 1 滴加えた後、組織片が重ならずほぼ均等に広がるようカバーガラスで覆い、100 倍および 400 倍で鏡検した。

それぞれの特徴となる要素を把握したうえで、表皮組織を中心に観察を重ねた。気孔を伴う表皮の破片は、気孔の分布状態を確認し、1 片あたり、副細胞および毛の周囲の細胞を除く 10 個の表皮細胞について、長軸方向の径を測定した。気孔を伴わない表皮細胞の破片は長径の測定を行ない、参考とした。破片が小さく、細胞数が 10 に満たないものでは、測定可能な細胞全てについて測定を行い、データを細胞数 10 あたりの数値に換算し、参考とした。

### 3.2.3 顕微鏡写真の撮影

特徴的な要素について顕微鏡写真を撮影し、組織の比較を行なった。

## C. 研究結果および考察

### 1. 外部形態

使用した検体の形状を plate1:pl.1 に、アレキサンドリアセンナ(*Cassia acutifolia*)について、外部形態の特徴を示した写真を pl.2 に示す。各部位の特徴は次のとおりであった。

茎には、互生する葉(葉柄)およびその脱落した痕を認めた。節には托葉および芽またはそれらの脱落した痕を認めた。全体的に剛毛および球状の毛が分布していたが、球状の毛は、採取後、時間の経過とともに萎むものが多く見られ、乾燥した試料ではほとんど認められなかった。

葉軸には、対生する小葉(小葉柄)およびその脱落した痕を認めた。葉軸表面は多数の剛毛および球状の毛に覆われ特徴的であったが、乾燥したものでは、剛毛が目立ち、球状の毛が認めにくくなるが多かった(pl.2 \*参照)。葉の向軸面に相当する側には、長軸方向に長い溝が認められた。

果軸には、互生する果実(果柄)およびその脱落した痕を認めた。果軸の表面は滑らかで、毛はほとんど認められなかった。小葉および果実の表



面は、多数の毛で覆われていた。採取直後の検体では、小葉や果実の表皮にも球状の毛が観察できた。

これらの外部形態的な特徴は、チンネベリセンナ (*C. angustifolia*) においても、同様に認められた。

## 2. 内部形態

### 2.1 切片による観察

試料が粉末となった際に出現する組織片の形態およびその由来を正しく把握するため、あらかじめ、植物体中央部の組織を用い、特徴を把握した。茎、葉軸の横断面および縦断面に見られる組織の顕微鏡写真を pl.3~4 に示す。

#### 2.1.1 茎 (pl.3)

横断面は、ほぼ円形を呈し、表皮に続き、わずかな厚角組織、皮層の柔組織、環状に配列した繊維束を認めた。その内側には環状に連なる並立維管束および髄を認めた。縦断面は、主として長軸方向に長い細胞からなるが、表皮細胞は小型で、特徴的であった。繊維束の外方に接し、シュウ酸カルシウムの結晶を含む結晶細胞列を多数認めた。結晶は主として単晶、薄膜方形の細胞におおむね 1 個ずつ含まれ、数細胞連なって観察された。結晶は皮層の柔組織や放射組織中にも認められ、放射組織では、主として集晶を含む結晶細胞列をなしていた。道管は、単せん孔を有する短い有縁孔紋道管のほか、螺旋紋道管や網紋道管が認められた。

#### 2.1.2 葉軸 (pl.4)

横断面は、ほぼ円形を呈すが、葉の向軸面に相当する側に、突出する 2 条の稜を認めた。稜には 2~数層の厚角組織が明瞭、これに続く柔組織は葉緑粒に満たされていた。各稜には、おおむね 1 条の並立維管束を認めた。稜を除く部位では、表皮に続き 1~2 層の厚角組織、ほぼ環状に配列した繊維束を認め、これに囲まれるように、独立した維管束が、向軸側に 3 条、背軸側に 1 条走行していた。中央には髄を認めた。縦断面は、表皮、皮層共に長軸方向に長い細胞からなっていた。維管束には単せん孔を有する短い有縁孔紋道管のほか、径の細い螺旋紋道管や環紋道管が認められた。柔細胞中にシュウ酸カルシウムの集晶を認めた。

#### 2.1.3 小括

以上、切片の観察により、茎、葉軸の特徴が明

らかとなったが、両者に形態の類似した細胞が存在することも確認され、粉末の鑑定に際し、全ての組織片を対象とした比較では、その由来の断定が極めて困難であることが示唆された。そこで、部位により特徴の現れやすい表皮に着目し、鑑定の指標とすることを試みた。

### 2.2 表皮剥離(表面視)による比較

表皮細胞の形態的な特徴を pl.5~7 に示す。

#### 2.2.1 茎 (pl.5)

アレキサンドリアセンナの中央部の茎 (B-b) には、気孔が分布する部位とほとんど気孔を認めない部位が、交互に長軸方向(茎の伸長方向)に長く配列していた。気孔が分布する部位は、主としてほぼ方形~等径性多角形の表皮細胞よりなり、時に連続した 3~7 個以上の細胞の両端に、先端の尖った細胞を認め、あたかも紡錘形の細胞が分裂したような一連の配列が見られた。気孔は長軸方向に規則的に配列するが、その分布はまばらで、400 倍観察下で撮影した写真 1 枚中にはおおむね 0~1 個の気孔が観察された。茎の先端部から得られた表皮を除き、気孔が 3 個を超える例はほとんどなかった。気孔の周囲には、主として 5~6、おおむね 4 以上のやや小型の細胞からなる副細胞が認められた。副細胞は近接した表皮とほぼ同様の形状を示したが、円形に配列し、特徴的であった。毛および毛の基部付近の細胞は、長軸方向に長いものや放射状に配列するものがあり、周囲の表皮細胞とは形態を異にしていた。チンネベリセンナにおいても同様の特徴を認めた。

先端部、基部を含め各部位における、表皮細胞の長軸方向の径を測定したところ、アレキサンドリアセンナの平均は 17~23  $\mu\text{m}$ 、チンネベリセンナでは 20~22  $\mu\text{m}$  であった。気孔(孔辺細胞)の径はアレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナともにおよそ 25~35  $\mu\text{m}$ (以後、気孔の大きさのおおよその目安として 30  $\mu\text{m}$  を用いる)で、いずれも気孔のほうが大きかった。各部位における表皮細胞と気孔の長軸方向の径を Table 1. に示す。また、測定した表皮細胞の長軸方向の径の値の分布状態を検討したところ、茎では使用した部位や植物の種類によらず、約 90%以上の表皮細胞が、30  $\mu\text{m}$  に至らないことが判明した。表皮細胞の径の累積百分率を Table 2. に示す。

気孔がほとんど存在しない部位は、主として長軸方向に長い長方形の表皮細胞よりなっていた。

この部位に気孔が介在する場合、気孔はこの大型の細胞に隣接することはなく、小型の副細胞を伴い、周囲には、ほぼ方形～等径性多角形の表皮細胞が2～3列配列し、気孔が分布する部位と同様の形状を示していた。

### 2.2.2 葉軸(pl.6)

稜が認められたことから、部位により表皮細胞の形状が異なることが予想されたため、観察は、稜にはさまれ溝を形成している部分(a)、稜の先端から葉軸側面にかけて(b)、背軸側(c)の3箇所に分けて行なった。

稜にはさまれた部位(a)は、主としてほぼ方形～等径性多角形の表皮細胞よりなり、多数の気孔や単細胞毛および腺毛が認められた。気孔はほぼ長軸方向に配列。副細胞は主として5～6個の細胞よりなり、円形に配列していた。その分布は多く400倍での観察下、1視野あたり10数個を超える気孔を認めた。写真中にもおおむね4～5個の気孔を認めることができた。毛の基部では、表皮細胞がわずかに放射状に配列していた。アレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナ共に表皮細胞の長軸方向の平均径は約30 $\mu$ mと小型で、茎と形態が類似していたが、近接した気孔の平均径より大きく、測定した表皮細胞の約半数のものは、気孔のおよその大きさである30 $\mu$ mよりも大きい細胞であった。

稜から葉軸の側面に相当する部位(b)は、長軸方向に長い長方形～長六角形の表皮細胞よりなり、背軸面に近いほど、長径の大きい細胞が多く認められた。気孔はほぼ長軸方向に配列、主として5～6個の円形に配列した副細胞に囲まれていた。毛の基部付近の表皮細胞は放射方向に配列し、他に比べ長く特徴的であった。気孔や毛の分布は、稜にはさまれた部位(a)より疎であったが、茎に比べて多かった。気孔は1視野あたり8～10個またはそれ以上、1枚の写真中にはおおむね1～4個認められた。表皮細胞の平均径は、アレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナ共約40 $\mu$ mを示し、気孔の平均径を超えていた。また測定に用いた表皮細胞の約80%以上のものは、30 $\mu$ mよりも大型であった。

背軸側(c)ではほとんど全ての細胞が長軸方向に長い長方形を呈していた。気孔の分布は少なく、わずかに認められた気孔は、長軸方向に配列、副細胞は主として5～6個よりなっていた。毛の基部

付近の表皮細胞は長軸方向に長く特徴的であった。アレキサンドリアセンナでは、表皮細胞の平均径は約40 $\mu$ m、約80%の細胞は、30 $\mu$ mを超えていた。チンネベリセンナの表皮細胞はアレキサンドリアセンナに比べ、小型であったが、半数以上の細胞は30 $\mu$ mを超えていた。

### 2.2.3 果軸(pl.7-1)

部位により方形～ほぼ等径性で茎の表皮細胞に類似するものや、長多角形の細胞で葉軸の細胞に類似するものが認められた。気孔はわずかに出現、ほぼ長軸方向に配列、その径は茎、葉軸に認められた気孔よりもわずかに大きかった。副細胞は主として5～6個。毛およびその脱落した痕はほとんど見られなかった。表皮細胞の径の平均は葉軸のものと同様であったが、ばらつきが大きかった。測定した表皮細胞の約60%は、気孔よりも大きかった。

### 2.2.4 小葉(pl.7-2)

茎、葉軸中に小葉が混入している場合も想定し、形状の再確認を行なったところ、センナ葉の特徴とされてきた多角形の表皮細胞<sup>7-10)</sup>のほか、細胞壁が入り組み波型を呈した細胞が観察された。

アレキサンドリアセンナでは、葉身全体に広く波型の細胞が認められた。多角形の表皮細胞は、主脈をはじめとする各葉脈付近で認められ、葉脈上は、長軸方向に長い長形の細胞よりなっていた。葉脈部を除き多数の気孔を認めた。配列に方向性はなく、その多くは、孔辺細胞に平行な2個の細胞に囲まれているか、または大小異なる3個の副細胞により囲まれていた。毛の周囲の細胞は放射状に配列しており、周囲の細胞とは形状を異にしていた。

チンネベリセンナでは主として多角形の表皮細胞が観察されたが、葉縁部でわずかに細胞壁にやや入り組みのある波型の細胞が、認められた。葉脈上の表皮細胞は長軸方向に長い長形の細胞からなっていた。葉脈部を除き、多数の気孔を認めた。配列に方向性はなく、2～3個の副細胞に囲まれていた。

### 2.2.5 果実(pl.7-3)

果実には特殊な形態を示す要素が多いため、実際の鑑定の際、表皮以外の要素が重要となる可能性が高いが、参考として外果皮の写真を掲載した。

### 2.2.6 葉軸に特徴的な表皮と、類似の形状を示

## す表皮 (pl.8)

各組織にはさまざまな形態を示す表皮細胞が認められたが、葉軸の特徴となる表皮 (pl.8-1)、およびこれによく似た形態を示す表皮を (pl.8-1-2~4) に掲げた。

葉軸の特徴的な表皮は、長軸方向に長い長方形~長六角形の表皮細胞で、5~6個の副細胞に囲まれた気孔が、ほぼ長軸方向に配列、表皮細胞の径は気孔よりも大きかった。一方、茎の長軸方向に長い表皮細胞よりなる部位では、気孔がほとんど認められなかった (pl.8-2)。また、果軸の表皮では、長軸方向に長い細胞が認められたが、気孔、毛共にほとんど認められなかった (pl.8-3)。小葉の葉脈上の表皮は気孔の分布が少なく、近接する気孔の副細胞は2~3であった (pl.8-4)。

以上、各組織から出現する、長軸方向に長く、葉軸の表皮に類似する表皮細胞には、気孔が少ないことが明らかとなった。従って、粉末状態となった製品を鑑定する際には、気孔を認めない表皮を比較の対象からはずすことで、より正確に由来を判断することが可能となるものと考えられた。なお、葉軸の表皮のうち背面に由来する表皮は、気孔が少ない。従って、粉末となった場合、葉軸由来であっても、背面の表皮細胞では、気孔を認めない場合が多いことを付記する。(pl.8-1-2)。

### 2.3 粉末とした際の各組織の出現状況

各部位別に作成した粉末を用い、特徴となる要素を把握したうえで、表皮組織を中心に観察を重ねた。粉末とした際出現する組織片を pl.9~11 に示した。

#### 2.3.1 各部位を粉末とした際の表皮細胞の出現状況 (pl.9, 10)

アレキサンドリアセンナの茎、葉軸の粉末中に出現した組織を pl.9, pl.10 に示す。茎、葉軸共に最も多量に出現したのは柔細胞の破片で、髓に由来するものは大型であった。繊維は主として数本が束となり、大型の組織片として認められた。各種道管の破片も確認しやすい組織片である。単独で出現するほか他の道管や柔細胞を伴っていることが多かった。茎、葉軸で出現する道管の種類、量、などに明らかな差はなかったが、径の細い螺旋紋道管や環紋道管などは葉軸に多く見られた。小さな破片ではあったが、Hの字型を呈する厚角組織も比較的目立つ組織であった。毛は剛毛の破片が出現し、確認が容易であったが、球状の腺毛は確認が困難であった。葉軸の組織で葉緑粒

を伴う破片が多く出現した。

表皮細胞の破片は出現頻度が少ないものの、比較的確認しやすい要素である。破片は、主として表面視で出現、茎では方形~ほぼ等径性の多角形の細胞が連なった破片として認められた。気孔を伴う破片の出現が少ないため、毛やその脱落痕などにより表皮細胞であることを判定した。葉軸では長多角形の細胞からなり、破片中に1~2個の気孔を伴うものが多かった。葉緑粒を伴い緑色の破片として出現することが多かったが、大型の細胞よりなることがあり、破片中の細胞数が10に満たないことも多かった。

果軸を粉末にした際出現する要素についても観察を加えたところ、表皮細胞は、葉軸の細胞に類似した組織片であったが、気孔の分布が少ないため、気孔を伴うことは殆どなかった。

#### 2.3.2 茎、葉軸を混合した粉末での表皮細胞の出現状況と由来の判定 (pl.11)

茎と葉軸を混合して粉末としたものについて、出現した表皮の破片30個について、表皮細胞10個の径を測定したところ、全てが気孔の平均的な径と考えられる30 $\mu$ m以下の細胞よりなっていた破片が12個、反対に全て30 $\mu$ m以上の細胞よりなっていた破片が10個あった。さらに30 $\mu$ m以下の細胞が1~2細胞のものが3個認められた。

前者12個の破片は、方形~等径性の表皮細胞からなる破片で、各破片で測定した細胞の平均径は、おおむね15~20 $\mu$ mを示し、気孔よりも小型の細胞よりなっていたことから、茎に由来する表皮片と判定。後者13個の破片は長多角形の表皮細胞からなる破片で、平均径はおおむね40~60 $\mu$ mを示し、気孔よりも大型の細胞よりなっていた。気孔を複数個伴う破片も見られたことより、葉軸に由来する表皮片と判定。これらの特徴は、予め粉末にする前に観察しておいた各々の組織の特徴とも一致した。

今回観察した組織片では、表皮細胞と気孔の大きさの関係から、由来を推定した結果と表皮細胞の形状観察から、由来を推定した結果がよく一致していた。一方、気孔より大型の細胞よりなる破片で、気孔を伴わないものについては、葉軸以外の組織に由来する可能性がある。従ってこのような細胞を判定に用いるのは危険である。今回判定に用いなかった破片は5個であった。出現した表皮片の約8割のものは判定が可能な破片であると考え

えられる。

#### 2.4 小括

以上の結果、試料が粉末となっている場合でも、表皮細胞の形状を確認することで、由来する組織の鑑定が可能であることが明らかとなった。センナ茎の粉末を鏡検した際に出現する組織片のうち、気孔を伴う表皮の破片で、表皮細胞が長方形～長六角形の細胞からなり、かつそれらの長軸方向の径が気孔の孔辺細胞の径よりも大きいものが多く認められる場合には、葉軸組織の混入が推定される。

センナの茎や葉軸について外部形態を用いて判別することは各所により行なわれてきたものと思われるが、これまで鑑別のための基準となる資料が示されていないことから、これらも含め、鑑別のための組織の特徴を Table 3. に示した。

#### D. 結論

植物の茎のように縦方向に長く伸びる組織では、その方向に長い細胞からなることが多い。センナ茎の場合も、多くの組織は長軸方向に長いものであったが、表皮細胞は、長軸方向の径が短く、等径性のものが多く認められ、センナ茎の特徴と考えられた。観察する部位により、長軸方向に長い細胞が連なる部分も認めたが、その様な細胞からなる部位には、気孔がほとんど分布しておらず、前者との区別が可能であった。一方で、葉軸の表皮細胞は主として長軸方向に長く、気孔の分布も多い点で、等径性の細胞よりなる茎の表皮との区別が可能であった。今回のように、気孔を伴う表皮片に限定し、表皮細胞と気孔の大きさの関係に着目して鑑定を行なうことにより、粉末状態となったセンナの組織の由来を容易に判定できるようになるものと考ええる。さらに、これらの表皮細胞の特徴を把握しておくことで、センナ茎の粉末に小葉が混入した場合や、小葉の粉末中に夾雑する茎や葉軸などについても、鑑別が行なえるものと考ええる。

#### E. 略語

c: cambium, ca: clustered crystal, cf: crystal fiber, co: collenchyma, collenchymatous cell, cs: solitary crystal, cx: cortex, ep: epidermis, epb: abaxial epidermis, epd: adaxial epidermis, fb: fiber bundle, h: hair, hb: bristle hair, hg: glandular hair, m: medulla, md: midrib, p: parenchyma, parenchymatous cell,

pfs: simple perforation, ph: phloem, r: ray, sta: starch grain, sto: stoma, v: vessel, vb: vascular bundle, vc: scalariform vessel, vd: bordered pit vessel, vs: spiral vessel, vg: ring vessel, x: xylem

#### F. 引用文献

- 1) Takashi K., Michiko K., Setsuko S. and Motoyoshi S. *Shokuhin eiseigaku zasshi*, **41**, 303-306(2000)
- 2) Yoichi Y., Sachiko T., and Toshinori T. *Annual Report of Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research* (2006), **32**, 45-51 (2005)
- 3) Mariko M., Taeko K. and Kimio N. *Annual Report of Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment* (2007), **18**, 66-69 (2006).
- 4) Ishii T., Saijo M., Hasegawa T., Takahashi K., and Nagata T., *Abstracts of papers, 45th "Zenkoku Eisei Kagaku Gijyutu Kyougikai"* Saga, Saga, Dec. 2008, pp.203-204
- 5) Suzuki S., Arakane M., Yoshizawa M., Kitagawa S., Shiota H., Satou Y., Kishimoto S., Mori K. and Hagino S., *Abstracts of papers, 45th "Zenkoku Eisei Kagaku Gijyutu Kyougikai"* Saga, Saga, Dec. 2008, pp.205-206
- 6) Takanashi M., Sakai E., Tanaka T., Maruyama Y., Arao M., Morinaga H., *Abstracts of papers Vol.2, 128<sup>th</sup> Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Yokohama, Mar. 2008, p.4*
- 7) Heber W. Y., "Textbook of Pharmacognosy," 6<sup>th</sup>ed, The Blakiston Company, Philadelphia, 1950, pp. 459-465
- 8) Betty P. J. and Derek W. S. "Atlas of Microscopy of Medical Plants Culinary Herbs and Spices," CRC Press, Inc., N.W., 1990, pp. 214-215
- 9) Mitiiti F., "Shouyakugaku," Nanzanndo, Tokyo, 1957, pp.220-222
- 10) 徐国鈞ら, "中国薬材学", 中国医薬科技出版社, 北京, 1996, pp.879-881

#### G. 研究発表

##### 1. 誌上発表

現在準備中