

201110020A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データ
ベース構築のための基盤整備に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

(H22-創薬総合-一般-013)

研究代表者 川原 信夫

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究 川原 信夫	1
--	---

II. 分担・協力研究報告

1. データベース構築及び遺伝子鑑別情報に関する研究 河野徳昭	
総合情報データベース構築に関する研究 河野徳昭	39
生薬オウレンの遺伝子情報について 河野徳昭	71
2. 成分分析データ情報及びさく葉標本に関する研究 瀧野裕之	
生薬の成分分析データの収集と成分データベースフォーマットの構築に関する研究 瀧野裕之	79
HPTLC による国内流通生薬の成分比較 瀧野裕之・天倉吉章	189
各種生薬エキスの一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性並びに多変量解析によるバイオマーカー探索に関する研究 瀧野浩之・大根谷章浩	213
3. 成分分析データ、遺伝子鑑別情報及び漢方処方関連情報に関する研究 合田幸広	
LC-MS/MS を用いた成分分析プロファイルに基づく生薬の化学成分情報のデータベース化に関する研究 合田幸広・鎌倉浩之	233
生薬、当帰の遺伝子情報について 合田幸広・丸山卓郎	251
漢方処方構成生薬の水煎出エキス収量に関する研究 合田幸広・袴塚高志	259
4. 生物活性情報及び成分分析データ情報に関する研究 済木育夫	
がん細胞増殖試験、NF- κ B 活性化試験及び IL-6 産生試験 済木育夫・櫻井宏明	265
樹状細胞に対する生薬エキスの効果 済木育夫・山本 武	271
抗アルツハイマー病活性を志向した in vitro assay 系による評価 済木育夫・東田千尋	281
LS-MS 分析による成分プロファイル比較 済木育夫・田中 謙	289

5. 成分分析データ情報に関する研究 (NMR 情報の集積) —LC-MS-SPE/NMR を用いた生薬成分の解析—	赤木謙一339
6. 成分分析データ情報に関する研究 (TLC 写真情報の集積)	木内文之347
7. 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究 —漢方薬に使用される薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究— 小松かつ子・合田幸広・河野徳昭	375
8. 植物組織培養情報に関する研究 —組織培養物および効率的増殖法に関する研究—	吉松嘉代429
9. 植物体栽培情報に関する研究 (効率的増殖法に関する研究)	菱田敦之441
10. 資源管理情報及び植物体栽培に関する研究 —トウキ種子の貯蔵温度および期間と発芽率の関係について—	飯田 修459
11. 内部及び外部形態情報に関する研究 外部形態および内部形態に関するデータ集積 内部形態写真及び植物体植物体栽培情報に関する研究	酒井英二 酒井英二・寺林 進 酒井英二・寺林 進465481
12. 官能データ情報の集積に関する研究 色彩計を利用した生薬の色に関する客観的評価 味認識装置を用いた生薬エキスの味覚評価に関する研究	御影雅幸・川原信夫 御影雅幸 川原信夫・安食菜穂子489511
13. 漢方薬に用いられる薬用植物の生物活性情報並びに副作用情報に関する研究 川原信夫・牧野利明	525
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	527

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成23年度総括研究報告書

漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース
構築のための基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）

研究代表者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
センター長 川原 信夫

本研究は、漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベースの構築を通じて、漢方薬の品質、有効性及び安全性確保と国内における効率的増殖法の確立及びその情報公開による薬用植物栽培振興による行政支援並びに漢方製剤原料となる貴重な遺伝資源の緊急的確保と維持を目的とした生物資源に関する研究支援、産業振興に寄与することを目的とする。

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターでは、希少資源を数多く含むこれらの膨大な資産のより積極的な活用並びに高度利用化を進めるため、保有資源に情報を付加し活用する基盤整備の一手法として、重要薬用植物約100種について、テキストデータ、写真データの収集ならびにデータベースシステムの構築を行い、2010年3月31日よりインターネット上で一般公開を開始した。本研究では、現行の薬用植物データベースの構造を基本骨格とし、1) 成分分析データ情報（TLC写真, HPLCチャート及び主要成分NMRデータ等）、2) 官能データ情報（味、色）、3) 内部形態及びさく葉標本情報、4) 資源管理情報、5) 遺伝子の鑑別部位及び基原鑑別に関する情報、6) 植物組織培養物及び効率的増殖法に関する情報、7) 植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報、8) 生物活性及び副作用情報、9) 漢方処方関連情報（エキス情報、食薬区分情報）のデータを付加した、総合的薬用植物データベースの構築を行う。これらをホームページ上に公開し、公的機関による唯一の薬用植物総合情報データベースとして、国民の健康及び研究資源の確保における情報提供に寄与する。本研究では、漢方処方エキス製剤生産量の約90%を占める最重要漢方処方44処方に配合された生薬約75種を中心に日本薬局方収載生薬の総合情報データベースの構築を試みる。

今年度は、昨年度に構築した総合データベースのパイロット版の運用を開始し、その評価並びに拠点研究者間での評価及び拠点研究者が担当する各情報パートのデータ項目の再確認作業について取りまとめを行った。総合データベースの植物・生薬基本情報、日本薬局方情報、成分情報、遺伝子情報各パートのデータ入力システムの設計・構築並びにパイロット版の評価を行い、来年度中の一部公開を目指しコア生薬5種（オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン）を中心とした各種データ入力を開始した。特に成分分析データについては質量分析データの閲覧・検索システムの開発が完了した。さらに英語版の閲覧・検索にも引き続き対応した。また、種子交換用情報管理システム、モデル試料管理システムを構築が完了し、内部情報管理の運用を開始した。一方、各種データ情報の収集に関して、収集を完了した次候補生薬15種の各種試験用エキスを作成するとともに、25種の候補生薬を選定し、試料の収集を行っている。さらに生物活性では、Calpain酵素活性に対する阻害作用、Amyloid β 誘発神経細胞死に対する阻害作用、NF- κ B活性化抑制試験等を実施している。引き続き、ITS領域を中心とした遺伝子鑑別情報解析、組織培養による増殖法、栽培の機械化、内部形態写真の撮影、色、味等の官能情報及び漢方処方エキスについても検討を行っている。

研究分担者

飯田 修

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 種子島研究リーダー

菱田 敦之

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 北海道研究サブリーダー

吉松 嘉代

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 室長

淵野 裕之

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 室長

河野 徳昭

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 主任研究員

赤木 謙一

(独)医薬基盤研究所共用機器実験室
研究員

済木 育夫

富山大学和漢医薬学総合研究所 所長

合田 幸広

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

木内 文之

慶應大学薬学部 教授

御影 雅幸

金沢大学大学院自然科学研究科 教授

小松 かつ子

富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

酒井 英二

岐阜薬科大学 准教授

研究協力者

熊谷 健夫

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 主任研究員

杉村 康司

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 研究員

林 茂樹

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 研究員

乾 貴幸

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター

大根谷 章弘

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター

藤田 愛

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター

蓮沼 タミ

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター

大谷 克城

旭川医科大学 講師

岩本 嗣

新潟大学農学部附属フィールド科学教育
研究センター 准教授

松本 敏一

島根大学生物資源科学部附属生物資源教育
研究センター 准教授

丸山 卓郎

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

袴塚 高志

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

鎌倉 浩之

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任
研究官

水上 元

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

伊藤 美千穂

京都大学大学院薬学研究科 准教授

朱 姝

富山大学和漢医薬学総合研究所 助教

田中 謙

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授

東田 千尋

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授

櫻井 宏明

富山大学大学院医学薬学研究部 教授

山本 武

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授

天倉 吉章

松山大学薬学部 准教授

吉田 隆志

松山大学薬学部 教授

好村 守生

松山大学薬学部 助教
寺林 進
横浜薬科大学 教授
牧野 利明
名古屋市立大学大学院薬学研究科
准教授
成川 佑次
慶應義塾大学薬学部 助教
高橋 豊
エムエスソリューションズ株式会社
山路 弘樹
東京生薬協会 学術委員会
石崎 昌洋
三和生薬株式会社
早川 昌子
和光純薬株式会社試薬事業部
佐藤 陽子
和光純薬株式会社試薬事業部
川崎 武志
株式会社ウチダ和漢薬研究開発部
神本 敏弘
株式会社ツムラ中央研究所
菊地 祐一
株式会社ツムラ中央研究所
近藤 誠三
小太郎漢方製薬株式会社研究所
杉本 智潮
救心製薬株式会社総合研究所
日向野 太郎
大正製薬株式会社セルフメディケーション
開発研究所
玉木 智生
日本粉末薬品株式会社研究開発部
山本 豊
株式会社栃本天海堂品質管理部
安食 菜穂子
株式会社インテリジェントセンサーテ
クノロジー

A. 研究目的

近年、代替医療として漢方薬や生薬への関心が高まる中で、生薬の安全性確保、有効利用に関して生薬の正しい認識と理解が必須である。生薬は天然物のため、栽培環境や調

製法が有効成分含量など品質を大きく左右する。漢方医療の現場で用いられる処方生薬の品質は薬効に大きく影響するため、高品質生薬の安定供給のためには生産、製造及び研究の各分野において生薬の十分な基礎データが求められる。我が国では、年間生産額1億円以上の医療用漢方エキス製剤が約90処方存在し、その生産量は平成16年現在、総計約5400トンに上る。これらの漢方処方は約100種の生薬より構成され、その殆どが日本薬局方収載生薬である。しかし原料生薬の約9割は中国等からの輸入に依存しており、特に近年、地球温暖化による生産地の砂漠化に加え、中国国内需要の増加により生薬の国内安定確保が厳しくなっている。本研究では、第一に薬用植物の総合的なデータベースを構築することにより漢方薬の品質、有効性並びに安全性確保と国内における効率的増殖法の確立及びその情報公開による薬用植物栽培振興を通じた行政支援を行う。第二に漢方製剤原料となる貴重な遺伝資源の緊急的確保と維持を目的とした生物資源に関する研究支援、産業振興を行う。

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（以下、センター）は、筑波（茨城県つくば市）、北海道（北海道名寄市）、種子島（鹿児島県熊毛郡中種子町）の3研究部を擁し、植物体約4,000点、種子約13,000点に加え、生薬標本、さく葉標本、無菌培養物、遺伝子クローンなど様々な形態の種々の薬用植物資源を収集、保存している。また、優良な種苗の提供や、諸外国の研究機関との種子交換業務をはじめとする、保有資源の提供も積極的に行っている。

センターでは、希少資源を数多く含むこれらの膨大な資産のより積極的な活用並びに高度利用化を進めるため、保有資源に情報を付加し活用する基盤整備の一手法として、第一期5カ年の中期目標のひとつに「薬用植物等の積極的な収集、保存、確実な情報整備及び行政的要請への正確な対応を行う」という目標を掲げ、これを実現するため、「センター保有の重要な薬用植物等100種につき、その特性、成分、生物活性等の情報をデータベ

ース化し公開する」という中期計画を設定した。2005年より重要薬用植物約100種について、テキストデータ、写真データの収集ならびにデータベースシステムの構築を行い、2010年3月31日よりインターネット上で一般公開を開始した。本データベースには、重要な薬用植物及び生薬の基本情報に加え、栽培指針に記載された情報をベースとした栽培法に関する情報、そして種子から植物の成長・収穫、生薬の調製に至る、のべ約1,300点の豊富な写真データが収録されている。これは、薬用植物、生薬、そして栽培に関する情報が相互参照可能な形式で収録された、初のデータベースであり、年間約2,600件のアクセスがあり、検索サイトでも検索結果のトップに表示されるなど、薬用植物に関するデータベースとして一般へも広く認知されるようになってきている。

本研究においては、前述の現行薬用植物データベースの構造を基本骨格とし、1) 成分分析データ情報 (TLC写真, HPLCチャート及び主要成分NMRデータ等)、2) 官能データ情報 (味、色)、3) 内部形態及びさく葉標本情報、4) 資源管理情報、5) 遺伝子の鑑別部位及び基原鑑別に関する情報、6) 植物組織培養物及び効率的増殖法に関する情報、7) 植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報、8) 生物活性及び副作用情報、9) 漢方処方関連情報 (エキス情報、食薬区分情報) のデータを付加した、総合的薬用植物データベースの構築を行う。

これらをホームページ上に公開し、公的機関による唯一の薬用植物総合情報データベースとして、国民の健康及び研究資源の確保における情報提供に寄与する。本研究では、漢方処方エキス製剤生産量の約90%を占める最重要漢方処方44処方に配合された生薬約75種を中心に日本薬局方収録生薬の総合情報データベースの構築を試みる。

B. 研究方法

【薬用植物総合情報データベース構築に関する研究】 (河野)

(1) 漢方薬に使用される薬用植物の総合デ

ータベースの構築

現行データベースは、植物情報、生薬情報、植物特性、成育に関する特性、文献情報、写真ライブラリーから成る。薬用植物総合データベース (以下、総合データベース) の構築においては、現行のFilemakerで構築されたデータベースの構造を骨格とし、これに以下のカテゴリを加える。1) 成分分析データ情報 (TLC写真, HPLCチャート及び主要成分NMRデータ等)、2) 官能データ情報 (味、におい、色)、3) 内部形態及びさく葉標本情報、4) 資源管理情報、5) 遺伝子の鑑別部位及び基原鑑別に関する情報、6) 植物組織培養物及び効率的増殖法に関する情報、7) 植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報、8) 生物活性及び副作用情報、9) 漢方処方関連情報 (エキス情報、食薬区分情報)。

上記各カテゴリの担当者に必要と考えられるデータ項目の設定を依頼し、これを取りまとめ、テーブルとテーブルの関連をあらわすER図 (Entity Relationship Diagram) を作製し、これに基づいてデータベース構築を行った。なお、食薬区分情報は薬用植物基本情報に追加し、また、薬局方情報を生薬基本情報に追加することとした。また、総合データベースでは、既存の薬用植物データベースに含まれる生薬や植物の学術情報に加え、国内流通生薬のモデル試料の成分分析データ、遺伝子情報、官能データ、生物活性および副作用情報等を扱うため、これらを登録可能なシステムの設計を行った。

上記カテゴリのうち、成分分析データ、日本薬局方情報の確認試験法、定量法等の情報の閲覧・検索システムは昨年度構築が完了した。今年度は、総合情報データベースの各種データを、各拠点研究者がインターネット経由でデータベースシステムへ格納または、更新するためのデータ登録システムの構築を行った。

各カテゴリの担当研究者にデータ項目の確認ならびに、英語版における英語表記の確認を要請し、それらを反映した、データ個別入力のためのデータフォーム、または、データ一括入力のためのテンプレートを設計し、

データの新規登録システムを構築した。また、登録済みのデータを訂正、追加、更新するシステムを構築した。また、ネットワークブラウザを介して一般への公開を行うための公開システムの開発を行った。

モデル試料管理システム、及び、資源管理システム、情報については後述のとおり昨年度に引き続き、別途開発を進めた。

(2) モデル試料管理システムの構築

総合データベースシステムに収載するデータを取得するため、これらのモデル試料の各社からの提供情報、各研究拠点への払い出し情報、モデル試料より調製したエキスに関する在庫情報等の管理には、総合データベース構築に先駆けて、管理専用のシステムが必要であったため、昨年度より管理システムの構築を開始した。本年度は引き続き構築を進め、構築を完了した。

(3) 薬用植物資源管理システムの構築

総合データベースのカテゴリ「資源管理情報」については、①センターの保有する種子、植物体等の薬用植物資源全般の資源管理、②種子交換業務の管理を行うための、センター内部での使用を主としたデータベース・在庫管理システムとして、薬用植物資源管理システム（以下、資源管理システム）の構築を、昨年度に引き続き行い、構築を完了した。

①については、保存種子約13,000点、植物体約4,000点について、現行の導入番号管理システムの機能及びデータを移植し、新たにバーコード管理システムを導入した。②については、現行の種子交換業務システム(Filemaker)の機能及びデータを移植した。

(4) データベースシステムの運用

昨年度より運用を開始したデータベースシステムのシステム及びデータの保全のため、データベースのバックアップを開始した。

【生薬の成分分析データの集積と成分データベースフォーマットの構築に関する研究】

(1) 生薬の収集とエキスの作成（渕野、大根谷、藤田、蓮沼）

昨年度に引き続き生薬関連業界に協力を求め、現在市場に流通している生薬を収集し

た。2012年2月末現在までのところ、45品目729種類の生薬が収集された。今年度は昨年度のコア5生薬（ニンジン、オウゴン、ソウジュツ、ショウキョウ、カンゾウ）に引きつづき、15生薬152種類（オウレン、ジオウ、シャクヤク、ケイヒ、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ）について、昨年度と同様に粉碎後に熱水抽出を2時間行い、凍結乾燥1週間により、最終的に熱水抽出エキス（いずれもアモルファス状）を得た。また関係拠点には、それぞれ担当の生薬、あるいは熱水抽出エキスの送付を行なった。

(2) 成分データベースフォーマットの構築（渕野）

昨年度に引き続き、データベースの入力フォーマットについて検討した。昨年度、その表示フォーマットのフレームは決定しているが、それらの入力作業の過程でいくつもの問題点が浮かび上がってきた。それらの対応について検討を行った。

(3) LC-MS 情報等の集積（渕野、合田、 済木、赤木、鎌倉、高橋、大根谷、田中）

抽出された生薬エキスについて、富山大学、国立医薬品食品衛生研究所、医薬基盤研究所の3機関においてLC-MSの検討を行い、それらの情報を集積した。最終的に産地情報や加工条件方法などの情報をもとに多変量解析を行った。さらにサンシシについてはLC-MS-NMRによる解析を試みた。

(4) TLC 写真情報の集積（木内、川原、合田、石崎、早川、佐藤、川崎、神本、菊地、 近藤、杉本、成川、日向野、山本）

生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者を中心とする研究班を組織し、実際に生薬各条に規定されたTLCによる確認試験を実施し、そのクロマトグラムを画像データとして収集した。実験には、Merck社と和光純薬工業から市販されているTLCプレートを用い、日本薬局方の生薬各条の規定に従って確認試験を実施した。なお、TLCによる確認試験を迅速化するために、従来10cmと規定されてきたTLCの展開距

離について、これを 7 cm に変更した試験も並行して行い、Rf 値並びに分離パターンに差があるかを検討した。また、クロマトグラムの色の再現性を確保するために、発色を伴う TLC 画像については日本色研の新配色カード 129a の vivid (Lot No. 00502) から 9 色 (3:yR, 8:Y, 12:G, 16:gB, 19:pB, 24:RP, W, Gy5.5, Bk) を選んで順番に並べた色見本を作成し、これを同一画面に入れて画像データを取り込んだ。

(5) HPTLC による国内流通生薬の成分比較 (瀧野、天倉、好村、吉田、川原、合田)

1) 試料、試薬および装置

試料とした国内流通品〔ソウジュツ (8 試料)、カンゾウ (16 試料)、ショウキョウ (10 試料)、ニンジン (16 試料)、オウレン (10 試料)、ケイヒ (17 試料)、オウゴン (15 試料)〕は、日本漢方製剤協会、日本生薬連合および東京生薬協会を通じて入手した。

HPTLC は、HPTLC Silica gel 60F₂₅₄ Glass plate (20×10 cm) を用いた。試料溶液注入には、TLC サンプルアプリケーション リノマート V、TLC 画像の撮影には、TLC 撮影システム TLC ビジューライザーを使用した。

検出は紫外線 (UV) 照射 (254, 366 nm)、塩化鉄 (III)・メタノール試液噴霧、希硫酸試液後加熱、バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後加熱、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液噴霧、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧のいずれかにより行った。

HPLC は Shimadzu Prominence システムを使用した。

2) TLC 条件

すべての試料溶液および標準溶液は HPTLC ガラスプレートにスポットし、約 7 cm 展開した。各スポットのバンド幅は 8 mm、バンド間隔 2 mm とした。

【漢方薬に使用される薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究】

(1) シャクヤク (小松, 朱)

1) 実験材料

シャクヤク 15 市場品を試料とした。さらに、中国内蒙古自治区またはモンゴル国で

採集した野生の *Paeonia lactiflora* 3 検体、日本富山県で栽培される *P. lactiflora* の薬用品種「梵天」1 検体及び中国四川省で採集した *P. veitchii* 1 検体を基原種同定用の比較材料として用いた。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、約 90 mg を steel beads (数粒) と共に 2 mL チューブに入れ、 -80°C で 1 時間冷凍した。TissueLyser で 30/sec、2.5 分間振動させ、試料を粉末にした。Steel beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 2 μL を取り、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、PCR 法で核 DNA の ITS 領域を増幅した。

得られた PCR 産物 2 mL について 1%アガロースゲル電気泳動法で増幅を確認した。残りの 23 mL を Wizard SV Gel and PCR Clean-up system で精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer で、塩基配列を決定した。

(2) ダイオウ (小松, 朱)

1) 実験材料

ダイオウ 9 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、110~120 mg を steel beads (数粒) と共に 2 mL チューブに入れ、 -80°C で 1 時間冷凍した。TissueLyser で 30/sec、2.5 分間振動させ、試料を粉末にした。Steel beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 2 μL を取り、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、PCR 法で葉緑体 DNA の *matK* 遺伝子と *trnK* イントロン領域の 3'側を増幅した。

得られた PCR 産物について 1%アガロースゲル電気泳動法で増幅を確認した後、精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer で、塩基配

列を決定した。

(3) マオウ (小松, 朱)

1) 実験材料

マオウ 11 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、約 90 mg を steel beads (数粒) と共に 2 mL チューブに入れ、 -80°C で 2 時間冷凍した。TissueLyser で 30/sec、2 分間振動させ、試料を粉末にした。Steel beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 3 μL を取り、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、PCR 法で *trnK* 遺伝子のイントロン領域の 5'側の前半部分を増幅した。

得られた PCR 産物について 1%アガロースゲル電気泳動法で増幅を確認した後、精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer で、塩基配列を決定した。

(4) トウキ (合田, 丸山)

1) 実験材料

トウキ 12 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、その 20 mg を液体窒素下、MM-300 を用いて粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit を用いて genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA あるいは LEAFY 遺伝子に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする核 rDNA ITS 領域あるいは LEAFY 遺伝子の 2nd intron を含む DNA 断片を増幅した。得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit により精製した後、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。

(5) サンシシ (合田, 丸山)

1) 実験材料

サンシシ 12 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、果皮部 5 mg を液体窒素下、MM-300 を用いて粉碎し、DNeasy

Plant Mini Kit を用いて genomic DNA を抽出、精製した。試料は、刻み生薬であった San-4, 7 を除き、単一個体を用いた。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA あるいは葉緑体 DNA の *trnL-F* 遺伝子に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする核 rDNA ITS2 領域あるいは *trnL-F* IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、Nova Taq DNA polymerase-Ampdirect plus の系を用い、どちらの領域も nested PCR 法を使用した。得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit により精製した後、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。

(6) オウレン (河野)

1) 実験材料

生薬オウレン 10 市場品をモデル試料とした。さらに、下記の *Coptis* 属植物体または培養物を試料とした。

セリバオウレン (導入番号 3206-91)、キクバオウレン (導入番号 845-87)、*C. chinensis* 植物体、*C. teeta* 植物体、*C. omeiensis* 植物体、Cc (*C. chinensis* 不定胚培養物)、M (ミレン不定胚培養物)、G (ガレン不定胚培養物)、Comp (*Coptis* 属植物不定胚培養物)。

2) 実験方法

1. 生薬オウレンからのゲノム DNA 調製

モデル試料については、「原形」、「刻み」生薬の 1 片を 1 検体とした。検体 2 片を選び、それぞれに [1]、[2] とナンバリングし、それぞれから約 20-50 mg を削りとりゲノム DNA 調製用試料とした。生薬試料約 20-50 mg を直径 4.8 mm のステンレスボールと共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に 5 分間浸漬したのち破碎した。破碎粉末に 1 mL の DNeasy Plant Mini Kit AP1 バッファー及び 2 mL の RNase を加え、以後、キットのプロトコールに準拠しゲノム DNA 調製を行った。

2. 植物体または培養物からのゲノム DNA 調製

植物体の葉または、不定胚培養物の約 100

mgを試料とし、500 mLのDNeasy Plant Mini Kit AP1バッファーおよび直径4.8 mmのステンレスボール2個と共に2 mLスクリーキャップチューブに入れ、破碎した。破碎液に2 mLのRNaseを加え、以後、キットのプロトコールに準拠しゲノムDNA調製を行った。

3. ITS1領域の塩基配列情報の取得

予備実験の結果、生薬由来のDNAを鋳型に、ITS1-ITS2の全領域のPCR増幅を安定的に行うことは、その長さから困難と考えられた。そこで、ITS1領域についてPCR増幅を行い、同領域の塩基配列情報を集積することとした。

*Coptis*属植物のITS1領域のPCR増幅のために、データベースに登録のあった*Coptis*属ITS1領域の塩基配列データから新規にITS2revプライマーを設計し、使用した。

4. ダイレクトシーケンシング

PCR産物をExoSAP-ITで処理し、その5 mLをシーケンシング反応に供した。DNAシーケンシング反応は、プライマーにPCR増幅に使用したAまたはB-primerを用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitで行った。塩基配列解析は上記クローニング&シーケンシングと同様に行った。

(7) ケイヒ (伊藤)

1) 実験材料

ケイヒ 17 市場品を試料とした。また、新鮮葉サンプルとして京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園に植栽しているものを用いた。

2) 実験方法

1. DNA抽出方法の検討

各試料をはさみで細かく裁断し、さらに粉碎器を用いて粉末状にした。このケイヒ粉末試料と *Cinnamomum* 属植物新鮮葉を材料とし、DNeasy Plant Mini Kit、GMquicker 2、Isoplant、Blood & Cell Culture Mini Kit をそれぞれ用いてDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動に供し、比較した。また、DNAが抽出できていることが確認できた場合には、その抽出DNAを鋳型としてPCRを行い、生成物についてアガロースゲル電気泳動により比較した。

2. 塩基配列の比較

Cinnamomum 属各種の新鮮葉からDNeasy Plant Mini Kitを用いてDNAを抽出し、核rDNA (ITS) 領域、及び葉緑体DNA (*trnL*-intron, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *rbcL* 上流) の各領域に設計したプライマーを用いてPCRを行い、目的とするDNA断片を増幅した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、増幅断片をアガロースゲルから切り出し、NucleoSpin Extract IIにより精製した後、pCR4-TOPOに組み込み、配列解析に供した。

3. PCR-RFLP法の検討

Blood & Cell Culture Mini Kitを用い、生薬粉末 150 mg に 1 mL の Buffer G2 を加え、キットのプロトコールに従ってDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型とし、*rbcL* 上流領域をPCRにより増幅し、アガロースゲル電気泳動により増幅断片を確認後、これを切り出してNucleoSpin Extract IIにより精製した。精製したPCR増幅断片を制限酵素Dde Iで処理した後、アガロース電気泳動に供し、処理前および後のサンプルを比較した。

(8) サイコ (山路)

1) 実験材料

サイコ 10 市場品を試料とした。

2) 実験方法

1. DNAの抽出

生薬粉末約 500 μg からDNeasy® Plant Mini Kitを用いてDNAを抽出した。抽出したDNAはAE Buffer 200μLに溶解した、PCR増幅がみられなかったサンプルは、抽出したDNAをQIAGEN® Plasmid Mini Kitを用いて精製してから再度PCR増幅を試みた。

2. PCR

ITS領域はITS1とITS2の二つのスペーサー領域を別々に増幅した。使用するプライマーセットは、ITS1領域 (forward: ITS5, reverse: ITS2)、ITS2領域 (forward: ITS3, reverse: ITS4) である。

3. 精製

反応液はE-Gel® EX Gel, 2%を用いて電気泳動して分離し、目標バンドだけを切り出

して GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて精製した。

4. DNA シーケンス

精製産物を BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.1.1 と Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。シーケンスの際には PCR に用いたプライマーを使用し、両端より forward、reverse 両方を読んで配列を決定した。ダイレクトシーケンスのクロマトグラフィーに観察された塩基の重なりは IUPAC (IUB)コードに従って表記した。

(9) ジオウ (水上)

1) 実験材料

ジオウ 11 市場品を試料とした。また、カイケイジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz、アカヤジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino は、武田薬品京都薬草園から分与され、名古屋市立大学薬用植物園で栽培されているもの、金城学院大学薬学部および鈴鹿医療科学大学薬学部、医薬基盤研究所薬用資源研究センターから提供された新鮮葉も試料として用いた。

2) 実験方法

1. DNA の調製

カイケイジオウ、アカヤジオウおよび地黄からの DNA 調製には、DNeasy Plant Mini Kit を用いた。

2. 直接シーケンスによる鑑別

カイケイジオウとアカヤジオウの ITS 領域の増幅に関しては、DNA データバンクに登録されているカイケイジオウの rDNA の塩基配列に基づき、18S-rDNA の 3'-end および 26S-rDNA の 5'-end にプライマーを設計し、ITS 1, 5.8S-rDNA, ITS 2 を含む約 700 bp の領域を増幅した。

カイケイジオウとアカヤジオウの *trnK* 領域の増幅に関しては、DNA データバンクに登録されている *Rehmannia* sp. の *trnK* の塩基配列に基づき約 2500 bp の領域を 5 つに分けて増幅した。

3. カイケイジオウとアカヤジオウの ITS 領域および *trnK* 領域の塩基配列の解読

PCR 反応液を exonuclease と alkali

phosphatase 混合液で処理し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer を用いてシーケンス反応を行った。

4. ジオウの *trnK* 領域の塩基配列の解読

ジオウの DNA 調製液の 1 mL を用いて、*trnK* 領域内の 2 つの鑑別サイトを含むそれぞれ約 150 bp の領域を増幅し、PCR 反応液を exonuclease と alkali phosphatase 混合液で処理後、シーケンス反応を行った。

(10) シャゼンシ、ビャクジュツ (水上)

1) 実験材料

シャゼンシ 7 市場品及びビャクジュツ 4 市場品を試料とした。

2) 実験方法

1. DNA の調製

シャゼンシ、ビャクジュツからの DNA の調製には SNET buffer を用いた。

2. 直接シーケンスによる鑑別

シャゼンシに関しては、DNA 抽出液 1 mL を用いて約 600 bp の ITS 領域を 2 つに分けて増幅した。増幅産物を含む PCR 反応液を exonuclease と alkali phosphatase で処理後、シーケンス反応を行なった。

ビャクジュツに関しては、DNA 抽出液 2 mL を用いて ITS1 領域のうち主要な鑑別サイトを含む約 200 bp の DNA 断片を増幅した。増幅産物を含む PCR 反応液を exonuclease と alkali phosphatase で処理後、シーケンス反応を行なった。

【組織培養物及び効率的増殖法に関する情報に関する研究】(吉松、乾、河野、岩本、松本)

(1) 組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のためのデータベース項目の設定

文献情報及び実際の実験で収集するデータ (オリジナルデータ) 項目、データ内容及び各データの形式の設定と写真、図表及び文献等の名前付けのルール決めを行った。

(2) 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献調査

第1コア及び第2コア生薬基原植物について、植物組織培養による増殖法に関する文献調査を行い、設定したデータベース項目への入

力を行った。

(3) オリジナルデータ取得のための、植物組織培養物の育成

データベースオリジナルデータ取得用の植物組織培養系誘導のための材料が入手できた植物について、常法による殺菌後、各種培地への植付け及び恒温室での培養を行い、培養系の誘導、増殖法の検討を行った。

【植物体栽培及び効率的生産法に関する研究】 (菱田、大谷、河野、林、飯田、熊谷)

(1) 生薬、薬用植物における無機成分の多元素一斉測定法の検討

トウキ、ホッカイトウキおよびセンキュウの部位別の無機成分含量を測定するために、ICP 発光分光光度計を用いた高感度多元素分析法を応用して測定した。リン (P)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、亜鉛 (Zn)、カドミウム (Cd)、クロム (Cr)、コバルト (Co)、銅 (Cu)、ニッケル (Ni) および鉛 (Pb) の各元素は、試料 250.0 mg を硝酸-過酸化水素を用いた湿式灰化法で分解して測定試料を調製した。分解した試料溶液は、5% 硝酸溶液を用いて 50 mL に定容し、微細な粒子をろ過・除去して分析試料とした。分析試料の各元素の含量は ICP 発光分光光度計 iCAP 6300 DUO により測定した。

なお窒素含量は、250.0 mg の試料をケルダール法により分解し、分解試料中の窒素量をケルオート DTP-4 を用いて測定した。

(2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

ホソバオケラの大規模栽培化に不可欠な効率的な種苗調製法および定植法を検討した。種苗調製法では親株を格子状に裁断する機械的裁断法、定植法ではポテトプランターを用いる方法を実施し、手作業による従来法と比較した。

(3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性 (ORAC) について

生薬「甘草 (14 点)」および「黄芩 (16 点)」から抽出された生薬エキスと、北海道研究部で保存されている黄芩の基原植であるコガネバナの植物体 (葉、茎および根の各部位)

の抗酸化能を評価した。抗酸化評価法は、ORAC 値を指標とした測定を行った。

【薬用植物の資源管理情報に関する研究】 (飯田、杉村、淵野、熊谷)

今年度は貯蔵温度を 5°C、-1°C および -20°C の 3 段階で 5 年間貯蔵したトウキ種子の発芽率の推移を観察、調査した。5°C 貯蔵は種子島研究部で、-1°C と -20°C 貯蔵は筑波研究部で行い、それぞれの種子の発芽試験は貯蔵した研究部で行った。

【漢方薬に用いられる薬用植物の内部及び外部形態情報に関する研究】 (酒井、寺林)

昨年入手したカンゾウ、ニンジン、ソウジュツ、ショウキョウ、オウゴンの 5 品目の市場流通生薬について、鋸、剪定ばさみを用いて小片とし、さらに鉄製の乳鉢を使用して粉末とした。今回、篩い分けは行わず、十分に粉末となったと判断したところで、スライドガラス上にマイクロスパーテル約 1/3 程度の粉末をとり、グリセリン水を 1 滴加えた。数分間放置し充分なじんだところで、有柄針を用いて攪拌し、カバーガラスをかけ観察用プレパラートとした。粉末の観察に際しては、今回調査した文献情報に加えて、中華人民共和国薬典中薬材外形組織粉末図解、同中薬粉末顕微鑑定彩色図集を鑑別の指標として観察した。また、日本薬局方の生薬の性状に記載される用語のうち、結晶細胞列、でんぷん粒に着目し、それらが記載されている生薬についても同様の方法で粉末とし、観察用プレパラートを作成した。日本薬局方一般試験法生薬試験法〈5.01〉の鏡検にしたがって光学顕微鏡にて観察を行い、写真撮影にはデジタルマイクروسコープ VHX1000 を用いた。

【漢方薬に用いられる薬用植物の生物活性情報に関する研究】

(1) 樹状細胞に対する生薬エキスの効果 (済木、山本)

1) 実験材料

本研究に使用された 17 種の生薬エキス試

料（オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、ジオウ、ケイヒ、オウレン、トウキ、シャクヤク、サイコ、マオウ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、サンシシ、シャゼンシ）は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料のなかから提供された。本研究では、これら生薬エキスの各ロットを等量混合した生薬エキス標準品を調製し、この生薬エキス標準品を用いて生物活性を測定し、生物活性が検出された生薬エキスについて、個々の生薬エキスのロットを用い生物活性の測定を行った。

2) 実験方法

雄5-12週令のBALB/cマウスの両足の大腿骨と頸骨より骨髓細胞をクリーンベンチ内で無菌的に採取した。この骨髓細胞を培養し、未成熟樹状細胞を採取した。未成熟樹状細胞を96well plateに播種し、0.1 μ g/mlもしくは0.5 μ g/mlの濃度のLipopolysaccharide (LPS)により24時間刺激を行ない、成熟化を誘導した。同時に、100 μ g/mlの濃度で各生薬エキスを添加し、24時間処置した。その後、樹状細胞を回収し、細胞表面分子をFITC標識Anti-mouse CD80、PF-cy7標識Anti-mouse CD86、PE標識Anti-mouse MHC class II、APC標識Anti-mouse CD11cを用いて蛍光染色し、フローサイトメーターによりCD11c陽性細胞を樹状細胞としてCD11c陽性樹状細胞の各細胞表面分子の発現について解析を行った。また、7AADにより死細胞の核染色を行い、フローサイトメーターによりCD11c陽性樹状細胞の生存率を測定した。

(2) 抗アルツハイマー病活性を志向した in vitro assay系による評価（済木、東田）

1) 実験材料

今年度は、オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、シャゼンシの17種について活性を検討した。Calpain 酵素阻害活性については、さらに、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウを

加えた20種について検討した。いずれも、異なる産地のサンプルを等量混合したエキスを別途準備し、それを用いてまず一次評価を行った。

2) 実験方法

1. Calpain 酵素阻害活性

Calpain-Glo Protease Assay kitを用いた。Glo 試薬に精製calpain (2 nM) と生薬エキス(1 μ g/ml, 10 μ g/ml)を同時に加え、Calpain酵素活性による発光反応に対する影響を検討した。ポジティブコントロールとしては、calpain阻害剤MDL28170 (0.5 nM–1 μ M)を用いた。阻害活性としての値は、Calpain酵素未添加のブランクでの発光値を100%として算出した。

2. Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制作用

胎生14日齢のddYマウスから取り出した胎児をPBSで洗浄後、断頭し、初代培養用に作成した培地に入れた。培地中で、実体顕微鏡下で大脳皮質のみを単離した。大脳皮質を安全キャビネット内で約1 mm角に切断した。遠心した後、上清を除去し、沈殿物に0.05% trypsin-0.53 mM EDTA solutionを2 mL加え、懸濁した。37°Cで15分間、5分置きに攪拌しながらインキュベーションし、培地を4 mL加え、700 rpmで3分間遠心して上清を除去し、沈殿に0.004% DNase I -0.03% trypsin inhibitor PBS溶液を2 mL加え、懸濁した。さらに、37°Cで15分間、5分置きに攪拌しながらインキュベーションし、培地を4 mL加え、3分間遠心し、沈殿に培地を4 mL加えた。細胞塊が見えなくなるまで穏やかに懸濁した後、70 μ m nylon cell strainerで濾過した。さらにHBSS溶液で細胞を2回洗浄し細胞液とした。前日にコーティングした及び白色96-well細胞培養用マイクロテストプレートに、0.5 x 10⁵ cells / wellになるよう播種した。37°C、10% CO₂、飽和水蒸気下で培養を開始し、翌日に培地を全量、馬血清の代わりにB-27 supplementを含む新しい培地で交換した。その際、20 μ M A β (25-35)及び生薬エキス(1 μ g/mL, 10 μ g/mL)を同時処置し、2日後にcell viabilityを測定した。Cell viabilityは、A β (25-35)とエキスとの同時処置期間終了後、96-wellマイクロ

テストプレートを室温で30分静置した。30分後、CellTiter-Glo試薬を100 μ L / wellずつ加え、2分間攪拌し、室温で10分間静置した。その後、GENiosマルチプレートリーダーを用いて、発光シグナルを測定した。阻害率の値が正の数として100%に近くなれば、正常細胞の生存率に近づいている、すなわち神経保護作用があることを示す。

3. Amyloid β 誘発の神経突起萎縮に対する抑制作用

胎生14日齢ddYマウスより大脳皮質神経細胞を初代培養し、培養開始3日後、37°Cで4日間インキュベーションし線維化させた10 μ M A β (25-35)を処置し、そのまま3日間培養した。その後、各濃度の生薬エキスを処置し3日後に固定した。薬物処置期間終了後、培地を除いてPBSで洗浄し、4% paraformaldehyde-PBS溶液を各wellに約150 μ Lずつ加え、90分間室温で静置し、細胞を固定した。その後、全量100 μ Lの1次抗体溶液を加え、4°Cで一晩反応させた。1次抗体には、マウス抗リン酸化型NF-Hモノクローナル抗体(1:500)、ラビット抗MAP2ポリクローナル抗体(1:500)を用いた。翌日、1次抗体溶液を除き、全量100 μ Lの2次抗体溶液を加え、遮光下の室温で2時間反応させた。反応後、2次抗体溶液を除き、PBSで5分間、2回洗浄し、Aqua Poly Mountで封入した。蛍光顕微鏡を用いて、各薬物処置を施したwellから648 μ m \times 860 μ mで10枚の画像をデジタル画像撮影装置DP70を用いて取得した。それらの画像について、画像解析ソフトNeurocyte Image Analyzer ver.1.5を用いて、画面全体のpNF-H陽性、MAP2陽性の神経突起の長さを測定した。また、各画面中のMAP2陽性の神経細胞体の数を測定し、画面全体の軸索あるいは樹状突起の長さを神経細胞体の数で割ることにより、神経細胞当たりの長さを算出した。

(3) がん細胞増殖試験、NF- κ B活性化試験およびIL-6産生試験 (済木、櫻井)

1) 実験材料

本研究に使用された生薬試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究セン

ターが提供を受けた試料である。被検生薬が各アッセイ系で活性を示すのかを検証する目的で、生薬ごとに各ロットを等量ずつ混ぜた標準ロットを作製し、試験に供した。今後、この標準ロットで活性が認められるものについては、各ロットの再アッセイを行い、ロット差を検討することにした。

本年度検討した生薬は、以下の17種である。オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジユツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、シャゼンシ。

2) 実験方法

1. 細胞培養

HeLa細胞はDMEM+10% FCS培地で培養した。また、ルシフェラーゼアッセイには、NF- κ B結合配列を4つタンデムに持つレポータープラスミドを安定発現するHeLa- κ B6細胞を用い、親株のHeLa細胞と同様の方法で培養した。

2. がん細胞増殖試験

HeLa細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に生薬エキスを添加した。その24時間後にWST-1試薬を加え、吸光度(450 nm)を測定した。陽性コントロールとして、doxorubicinを10 mg/mLで添加した。生薬は10 mg/mLの水溶液を作製し、最終濃度100 μ g/mLで試験を実施した。

3. NF- κ B 活性化試験

HeLa- κ B6細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に最終濃度100 μ g/mLで生薬エキスを添加した。その30分後にTNF- α を最終濃度10 ng/mLとなるように添加し、さらに6時間培養した。培養上清を取り除き、細胞溶解液を調製し、ピッカジーンを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

4. IL-6 産生試験

HeLa- κ B6細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に最終濃度100 μ g/mLで生薬エキスを添加した。その30分後にTNF- α を最終濃度10 ng/mLとなるように添加し、さらに6時間培養した。培養上清を回収し、ELISA法によりIL-6濃度を測定した。

(4) 一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性に対する生薬エキスの効果(湧野、大根谷、高橋、藤田)

1) 実験材料

本研究に使用した試料は、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターがデータベース構築のために作製した国内市場品の熱水抽出エキスを用いた。また、細胞は、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いた。

2) 実験方法

1. 細胞培養

培地は F-12 Ham 培地に FBS を 10%、L-glutamine を 2 mM になるように加えた。RAW264.7 は、インキュベーターにて培養し、コンフルエントになり次第、継代した。継代はおおよそ週 2 回行ない、必要に応じてアッセイに用いた。

2. NO 産生抑制試験法

RAW264.7細胞を96ウェルプレートに播種し、インキュベーターにて2時間培養し、接着させた。mouse recombinant interferon (IFN)-gおよびlipopolysaccharide (LPS)をそれぞれ、最終濃度が0.3 ng/mL、100 ng/mLになるように加え、さらにDMSOに溶解した生薬エキス (100 µg/mL) を添加し、インキュベーターにて16時間培養した。ポジティブコントロールとして、*N*^G-monomethyl-L-arginine acetate (100 µM) を用いた。試験は3回行ない、結果はMean±S.E.で示した。

3. 多変量解析

解析は、多変量解析ソフトウェアSIMCA P+ ver. 12.0.1を用いた。

【漢方薬に用いられる薬用植物の官能評価に関する研究】

(1) 色彩計を利用した生薬の色に関する客観的評価 (御影)

色彩計はコニカミノルタ製のCM-3500dを用い、標準光D65による測定値を $L^*a^*b^*$ (エルスター、エースター、ピースター) 表色系で表現した。生薬はミキサーで粉碎し、すべてを150µmの篩を通した。先ず粉末色の反射光を測定した。次いで粉末を10倍量のエタノールで抽出した色の透過光を光路長10mmのセルに入れて測定した。さらに、粉末を100倍量の熱水で抽出して同様に透過光を測定したのち、その熱水抽出液に一定量の塩化第二鉄試液、水酸化ナトリウム試液およびヨウ素試液を加えた後の透過光の色を測定した。色座標上に各生薬の測定値をプロットし、それぞれの特徴を検討した。また、各分析値間の色差 (Δ 値) を求め、考察を加えた。

セルに入れて測定した。さらに、粉末を100倍量の熱水で抽出して同様に透過光を測定したのち、その熱水抽出液に一定量の塩化第二鉄試液、水酸化ナトリウム試液およびヨウ素試液を加えた後の透過光の色を測定した。色座標上に各生薬の測定値をプロットし、それぞれの特徴を検討した。また、各分析値間の色差 (Δ 値) を求め、考察を加えた。

(2) 味認識装置を用いた生薬エキスの味覚評価 (川原、安食)

1) 実験材料

昨年度に引き続き、生薬関連業界の協力の元、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターによって収集、抽出、凍結乾燥された生薬エキスを検討対象として用いた。今年度は、収集された生薬のうちの5品目、オウレン (10 検体)、ケイヒ (17 検体)、ジオウ (11 検体)、シャクヤク (15 検体)、トウキ (12 検体) について検討した。

2) 装置

味測定には味認識装置 SA402B を用いた。各味要素を検出するための脂質膜センサは、C00, AE1, AN0, AAE, CT0 及び BT0 の 6 種類のセンサを用いた。

3) 試料の調製

5種類の生薬エキスそれぞれについて、数段階の濃度条件で測定を行い、各生薬サンプルの至適測定濃度を検討し、以下の様に決定した。即ち、オウレン: 0.1 mg/mL、ケイヒ: 1 mg/mL 及び 5 mg/mL、ジオウ: 5 mg/mL、シャクヤク: 5 mg/mL 及びトウキ: 5 mg/mL である。ケイヒについては、測定に用いるセンサによって至適と考えられる濃度が異なっていたため、2種類の濃度で測定を試みることにした。その後、全生薬エキスサンプルについて下記のように調製し、味測定に供した。

4) 測定方法

味認識装置を用いて味の測定を行った。塩化カリウム (10 mM) と酒石酸 (0.1 mM) を溶解した水溶液を出力値コントロールとした。試料液の出力値について、ヒトが感じる味強度の違いを推定し、得られた推定値を各味要素の数値とした。今回、本装置を用いて

推定した味の要素は、酸性苦味、酸性苦味後味、渋味、渋味後味、塩基性苦味後味、旨味、塩味及び塩酸塩苦味後味である。尚、塩味を検出するセンサ (CT0) はクエン酸などの有機酸類にも応答する。

【漢方薬に用いられる薬用植物の生物活性情報並びに副作用情報に関する研究】(川原、牧野)

厚生労働省医薬食品局が発行する医薬品・医療機器等安全性情報からは、漢方製剤に関する副作用情報を収集、整理した。また、NPO医学中央雑誌刊行会が発行する医中誌Webデータベースに登録されている抄録のある学術論文を、「漢方」と「副作用」をかけて検索した。さらに、米国立医学図書館が提供する医学・生物文献データベース、MedlineのWeb一般公開版PubMedに登録されている学術論文を、“kampo” OR “kanpo” と “adverse effects” OR “side effects”をかけて検索した。得られた論文について、情報を整理し、データベースに登録するためのExcelフォーマットに入力した。

【漢方処方構成生薬の水煎出エキス収量に関する研究】(合田、袴塚)

1) 実験材料

局方生薬のエキス収量測定においては、黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、国内主要生薬メーカー5社(A社、B社、C社、D社及びE社と仮称)より日本薬局方規格品で漢方処方調剤用の刻み生薬を購入して用いた。また、生薬原料のエキス収量測定においては、甘草に関して、医薬基盤研究所薬用植物資源センターが収集したものをを用いた。

2) 機器

生薬あるいは生薬原料を煎じる際には、らくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥はFREEZE DRYER FDU-830を用いて行った。生薬の粉末化には、Vibrating Sample Mill TI-200を用いた。

3) 局方生薬煎出エキスの調製と収量測定

黄連、桂皮、地黄、芍薬あるいは当帰について、刻み生薬 20 gをポットに取り、400

mLの水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を3000 rpmで5分間遠心し、上澄液をあらかじめ重量を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させてエキスを調製した。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を差し引くことで算出した。

4) 生薬原料煎出エキスの調製と収量測定

甘草の生薬原料サンプルについて、原形のものハサミで5~10mmに切り刻んだ。刻んだサンプルをVibrating Sample Millで粉砕した。粉末サンプル20 gをポットに取り、400 mLの水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を3000 rpmで5分間遠心し、上澄液をあらかじめ重量を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させてエキスを調製した。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を差し引くことで算出した。

C. 研究結果

【薬用植物総合情報データベース構築に関する研究】

(1) 総合データベース登録システムの構築

研究分担者が各拠点からインターネット経由でデータ登録を行うための登録システムを開発した。システムは一般ユーザ用と管理者用の機能を区別し、管理者はユーザ管理やデータの公開権限の変更等が行えるようにした。また、公開システムとは異なり、カテゴリごとにデータを入力する分担研究者が異なるため、できる限り、カテゴリごとに表示を区別するようなシステム画面構成にした。また、本データベースシステムでは、登録されるデータは、各拠点研究者の未公開データも含まれる。そこで、全てのデータについて個別に「公開」、「医薬基盤研内公開」、「非公開」の設定が行えるシステムとなっている。「医薬基盤研内公開」または、「非公開」と設定したデータについては、公開システムでは表示されない。

(2) 薬用植物データベースシステム(公開システム)の機能拡張

平成24年度末に計画しているインターネ

ット上での一般公開のために、トップページから日本語版、英語版の切り替えが行えるようにした。また、今後、増加していくデータの中から、ユーザが目的のデータに効率よく辿りつけるよう、検索機能を強化した。とくに、化合物の構造式検索においては、構造式描画ソフトChemDraw (PerkinElmer Inc.) で作成した構造式をCopy & Pasteで貼り付け、検索できるように改善した。

なお、生薬情報、薬用植物、化合物情報を初期の窓口として、関連するすべての情報をマウスクリックで辿れるユーザフレンドリーなデータベースシステムを構築するという基本方針については前年度から変更していない。

(3) 資源管理システム及びモデル試料管理システムの構築

資源管理システム及びモデル試料管理システムは、データベースソフトAccessで構築した。

資源管理システムは、試用版を、実際の資源管理業務で試験運用し、問題点を点検し、それらをシステム構築に反映させ、実務システムとして稼働を開始した。

モデル試料管理システムについては、試用版をモデル試料の在庫管理、及び、エキス調製等の実際の業務で試験運用し、問題点を点検し、それらをシステム構築に反映させ、実務システムとして稼働を開始した。

両管理システムに収載されたデータは、総合データベースシステムとの間で、関連データが参照されるシステムとなっている。

(4) データベースシステムの運用

本システムで採用しているリレーショナルデータベース(MySQL)のバックアップを開始した。これは、FireWallの中に配置されているデータベースサーバに外付けディスクを取り付け、定期的にデータベースのバックアップを行うものである。

【生薬の成分分析データの集積と成分データベースフォーマットの構築に関する研究】

(1) 生薬の収集とエキスの作成

生薬に関しては、日本漢方製剤協会、日本

生薬連合、東京生薬協会の協力が得られ、市場流通品の提供を受けた。収集した生薬は昨年度のコア5生薬(ニンジン、オウゴン、ソウジュツ、ショウキョウ、カンゾウ)に引きつづき、15生薬152種類(オウレン、ジオウ、シャクヤク、ケイヒ、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ)であり、これらの生薬を中心にLC-MSの検討を行った。

粉碎後熱水抽出後の操作は基本的には遠心分離にて行なったが、生薬により遠心分離ができない場合があった。遠心分離を行なった生薬は、オウレン、ケイヒ、ゴシツ、ジオウ、シャクヤク、シャゼンシ、センキュウ、ソヨウ、ダイオウ、トウキ、であるが、サイコ、サンシシ、ビャクジュツについては遠心分離では浮遊物が多い、あるいはゲル状になり遠心分離では上澄み液が採取できないため、吸引濾過にて行なった。またブクリョウは粉末にした後の熱推移抽出では、ほとんど抽出エキスが得られなかった。

(2) 成分データベースフォーマットの構築

今年度から化合物データの入力作業を始めたが、その入力フォーマット上でいくつか問題が生じた。以下にそれらの詳細を示す。

1) NMR情報の新規入力

一例として、「化合物関連情報を追加」→「検索」→「4で絞込み検索」→「4'-O-Glucosyl-5-O-methylvisamminol (4'-O-グルコシル-5-O-メチルビサミノール)」を選択このようにするとエラーが出て化合物名が呼び出せないという現象が起きた。化合物情報では入力できるが、そこで入力した化合物名が呼び出せない。4'の「'」がシステム上使用できないとなると化合物の名称において「'」は位置を表す重要な記号であるので、使用できないというのは入力上非常に問題である。

2) モデル試料の生薬写真

生薬写真をモデル資料管理システムにアップロードして、それが総合データベースのモデル生薬の項目に表示される仕様になっていたはずが、その項目が見当たらなくなっ

ている。

3) 入力システム

入力システムにおいて、LC-MS 情報の MS の TIC の JCAMP データが、メモリ数が膨大になるためそのままアップロードが難しいことが分かった。可能であれば NMR 同様 TIC の JPEG 画像も表示できるようにしたい。

(3) 各種生薬の LC-MS 等の情報集積

1) オウレンの LC-MS データ

オウレンの XIC に使用した各 m/z 値 (320, 338, 336, 352) は、それぞれ Coptisine, Columbamin, Berberin, Palmatine の M^+ に相当する。その他の成分として、 m/z 342 と 322 に顕著なイオンを示すマススペクトルを与える成分が確認される。 m/z 336 と 352 の XIC については、エキスに依って 2 本のピークが観測され、それぞれ保持時間の短い方の成分がエキスに対して特徴的な動きを示す。即ち、13.3 分の m/z 352 成分は NIB-115 と NIB-185 でのみ観測され、14.3 分の m/z 336 成分は NIB-115 と NIB-185 では検出されない。その他の成分の中にも、この 2 エキスに対して特徴的な動きを示しているものが認められた。

2) オウレンの多変量解析

日本産と中国産との間で完全に異なった LC-MS データを与えたことから、主成分分析においても明瞭なグループ分けが可能であった。TLC において日本産は R_f 値 0.3 付近のスポットを欠いていることが認められた。

判別解析を日本産と中国産の間で行なったところ、高い信頼度で判別することが出来た。また S プロットにてそのマーカ化合物を特定したところ、 m/z 352, 320 であり、それぞれ rt などから考え、palmatine, coptisine と推定された。

3) トウキの LC-MS データ

正負両イオン極性で 12 種類のトウキエキス試料を測定し、それらの LCMS を測定したところ、それぞれ若干異なるパターンやピーク強度を示しており、中でも正負両イオン極性において最もピーク数の多い TIC を示したトウキ-162 について、各成分のマス

スペクトルを抽出した。両極性で検出されている成分が非常に少なかった。正イオンデータにおける m/z 247、負イオンデータにおける m/z 355 など、一つの m/z 値でトレースした抽出イオンクロマトグラムにおいて複数のピークが確認された。

4) サンシシの LC-MS データ

各サンシシエキスにおいて、UV, TIC クロマトグラム共に全体的なパターンには殆ど違いが無かった。サンシシエキスには配糖体と思われるピークが多数含まれていることが明らかとなった。

5) サンシシの多変量解析

サンシシには国内産の山梔子のほか、中国産の水梔子と呼ばれる長手のものが流通している。またその中間種もあるとされる。産地別また長手、丸手別に判別解析を行ったところ良好な結果が得られた。S プロットにおいて、マーカ化合物を検討したところ 16.17 min, m/z 331.197 がマーカになりうる成分と推定された。その MS/MS では m/z 169 が product ion として観測されるが -162 は脱 hexose に相当することから hexose を糖部とする配糖体と推定される。

6) ジオウの LC-MS データ

抽出イオンクロマトグラムの強度より、各エキスにおける主成分は三糖あるいは四糖であり、それらの強度比はエキスによって差が見られた。負イオン検出データの保持時間 11.4 分のマススペクトルにおいて m/z 341 イオンと共に検出されている m/z 455 イオンは、341 との質量差が 114 Da であることから、系内に微量にコンタミしている TFA 付加によるイオンであると推測される。

7) ジオウの多変量解析

ジオウには乾ジオウと熟ジオウがあるが、今回の検討試料の中で乾、熟と記載があるもののみで判別解析を行なった結果、良好な信頼度で判別が可能であった。市場流通品ジオウの熱水抽出エキスの LC-MS から主に試料間で差がみられたが、確認試験法の結果と合わせると、mannitriose のみが一致する。局方確認試験法では抽出条件は水+メタノールでの室温抽出のため 2 時間熱水抽出条件では

オリゴ糖の一部開裂などの変化が起きていると予想される。

8) ゴシツの LC-MS データ

保持時間 2~3 分付近には、正負共に糖由来のマススペクトルを確認することができる。保持時間 13 分付近に、Pos で m/z 346、Neg で m/z 344 に顕著なイオンを示すマススペクトルが得られた。これらは、それぞれ整数分子質量 345 の分子に対する $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ イオンとして帰属することができる。これらイオンからのプロダクトイオンスペクトルにおいては、 m/z 152, 150 が観測されるが、これは 194 u のフラグメントの脱離であり、グルクロン酸に相当する。保持時間 17.5~18 分に、Pos で m/z 481、Neg で m/z 479 にイオンを示す 2 成分が確認できる。これらのイオンは、それぞれ整数分子質量 480 の分子に対する $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ イオンとして帰属することができる。これら 2 成分は、若干異なるプロダクトイオンスペクトルを示しており、異性体の関係にあると考えられる。

9) ケイヒの LC-MS データ

ケイヒの全イオンクロマトグラム (TIC) よりケイヒの特徴的な成分であるケイアルデヒドは保持時間 21.2 分付近に検出された。これらのクロマトグラムにおいて高い強度を示した成分が検出された。

10) シャクヤクの LC-MS データ

シャクヤクの特徴的な成分であるペオニフロリンは 9.7 分付近に、アルビフロリンは 9.1 分付近にそれぞれ検出された。これらのクロマトグラムにおいて高い強度を示した成分が検出された。

11) LC-MS-NMR 情報の集積

サンシシの多変量解析の結果より分子量 330 の含有化合物が示唆されていたことから、NMR 測定のための LC-MS 分析を行い、データが再現するかを確認した。この結果、リテンションタイムが 16.17 min. の分画が 331.197 m/z となっており、本分画が目的の化合物を含む分画と考えられた。カラム、流速等が異なっている分析条件であるが、スペクトルはよく再現できていた。本分画の質量

数は、353.2 m/z であり、サンシシの LC-MS 測定データ 331.197 m/z と比較すると、差は 22 m/z となり、ナトリウム付加体のマススペクトルが得られていることが明らかとなった。リテンションタイム 15.8 min. のメインピークのマススペクトルは 411.2 m/z の質量数であることが明らかとなり、分子量 388.37 である Geniposide のナトリウム付加体と推察された。これらの分画を SPE 装置に導入し、リテンションタイム 15.8 min. の分画は 6 回インジェクトし、積算は 640 回で NMR 測定を行った。

(4) TLC 写真情報の集積

1) TLC の画像データの集積

今年度は、昨年度からの継続分も含め、アカメガシワ、アラビアゴム、アロエ、ウワウルシ、エンゴサク、オウギ、ガイヨウ、カシユウ、カッコウ、カッコン、カンキョウ、キクカ、ケイガイ、ゲンチアナ、コウイ、コウジン、コウベイ、サイコ、シャクヤク、センナ、センブリ、ダイオウ、チクセツニンジン、ニンジン、ビンロジ、ボウフウ、ボクソク、リュウタン、ローヤルゼリーについて画像データを集積した。

2) TLC プレートが Rf 値に与える影響

日本薬局方の一般試験法<2.03>薄層クロマトグラフィーでは、使用する薄層板について、通例としてその作製法を規定している。この規定は、薄層板を自分で調製することを前提としたものであるが、現在では、通常市販の薄層板が使用されており、現在最も一般的に使用されていると思われる Merck 社製の薄層板と、国産メーカー品として Wako 社製の薄層板を比較すると、品目によっては展開結果に差があることがこれまでの検討で明らかになっている。そこで、今年度も引き続きこの 2 社の TLC プレートをを用いた場合の展開結果を比較検討した。

まず全体的な Rf 値の再現性について見ると、これまでの検討結果と同様に、試験法を厳密に守ることにより、良好な Rf 値の再現性を得ることができ、Merck 社と Wako 社の薄層板の差について見ると、やはりこれまでの結果同様 Merck 社より Wako 社のプレート