

で Rf 値が大きい傾向にあった。また、これまでの検討で、酸性物質では両社のプレート間で Rf 値に大きな差が見られることが明らかになっているが、今回の検討でもセンノシド A を指標成分とするセンナの確認試験で大きな差が見られた。センノシド A はカルボキシル基を有する酸性化合物であり、今回の結果は、これまでの結果と一致している。

今回検討した生薬のうち、局方に Rf 値が規定されているアカメガシワ、エンゴサク、カッコウ、コウベイ、ボクソについて、局方に規定された Rf 値と実際に得られた値を比較すると、局方に規定された値は Merck 社製プレートで得られた値とほぼ一致していた。なお、16 局で収載されたコウベイについては、局方規定値と実際に得られた値とが 0.1 程度異なっており、条文作成時の誤記と思われる。

3) 展開距離と Rf 値の再現性に関する検討

同一機関で行った展開距離 7 cm と 10 cm の TLC を比較すると、多くの場合両者の間にクロマトグラムのパターンの差はほとんどなく、スポットの確認には全く支障がないことが明らかとなった。また、指標成分スポットの Rf 値を比較しても、展開距離の差による Rf 値の変化はほとんど見られなかった。しかし、近接したスポットとの分離が必要な試験では、展開距離を短くすると分離が不十分になる品目も見られ、ボクソクやエンゴサクの確認試験に於いては 7 cm の展開では近接したスポットの分離が不十分であるため、10 cm の展開が必要と判断された。一方、展開に必要な時間について見ると、7 cm の展開に必要な時間は、ほとんどの溶媒系で 10 cm 展開するのに必要な時間の半分程度であった。今年度検討した展開溶媒系は 10 cm の展開に 2 時間程度を必要とする 1-ブタノール/水/酢酸(100)を含む展開溶媒系と較べると展開時間が短いものばかりであるが、展開距離を 30% 短くすることにより、展開に要する時間を半分近くに短縮できるメリットは大きいものと考えられる。

(5) HPTLC による国内流通生薬の成分比較

1) 各生薬の HPTLC 分析

各生薬国内流通サンプルについて、それぞれ試料溶液を調製し、研究方法に記した方法で HPTLC 分析を行った。試料溶液のスポットには、ばらつきをなくす目的で TLC サンプルアプリケーションを用い、TLC 画像の撮影には専用機である TLC ビジュアライザーを用いた。各生薬の結果を以下に記す。

(ソウジュツ) *n*-ヘキサン抽出物を *n*-ヘキサン/アセトン系溶媒で展開し、希硫酸噴霧後加熱することで、数個のスポットを確認することができた。

(カンゾウ) 局方の確認試験法に準じて HPTLC 分析を行った。カンゾウの国内市場品 16 試料について、glycyrrhizic acid および liquiritin を標準品として、HPTLC 分析した結果、すべての試料において 2 化合物の鮮明なスポットを観察した。

(ニンジン) 局方の確認試験法に準じて HPTLC 分析を行った。ニンジンの国内市場品 16 試料について、ginsenoside Rg₁ および ginsenoside Rb₁ を標準品として、HPTLC 分析した。その結果、標準品 2 化合物とともに、他の ginsenoside 類のものと考えられるスポットが 10 個近く観察された。

(ケイヒ) 局方の確認試験法に準じて HPTLC 分析を行った。ケイヒの国内市場品 17 試料の HPTLC 結果は、紫外線 (254 nm) 照射、次いで 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン試液噴霧による検出により、すべてに共通で明瞭な 1 スポットが確認された。

(ショウキョウ) 局方の確認試験法に準じて HPTLC 分析を行った。国内市場品 10 試料の HPTLC 結果では、すべての試料において標準品である [6]-gingerol のスポットが確認された。

(オウレン) 局方の確認試験法に準じて HPTLC 分析を行った。国内市場品 10 試料の HPTLC 結果では、すべての試料において標準品である berberine のスポットが観察された。

(オウゴン) オウゴン 15 試料について、局方の TLC 確認試験に準じて HPTLC 分析を行った。その結果、大きく 3 つの領域に明瞭な

スポットが観察された。

【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

*Paonia*属植物の核rDNAのITS領域の塩基配列は、ITS1領域が267 bp、5.8S rRNA遺伝子領域が164 bp、ITS2領域が222 bpであった。これまでSang T.らにより、*P. lactiflora*を識別するためのITS領域の塩基配列が報告されているため、それと比較した結果、シャクヤク15市場品はすべて*P. lactiflora*基原であった。*P. lactiflora*は種内多型が顕著であり、全検体にヘテロ型の塩基を示す箇所が認められ、交配が行われてきたことが示唆された。

(2) ダイオウ

ダイオウ市場品の*matK*遺伝子全領域の塩基配列を決定し、これまでの当研究室の研究結果と比較した。*matK*遺伝子全領域は長さ1517 bpであった。9市場品はすべて*Rheum palmatum*に由来し、そのうち6市場品はRPI系統でRp4の遺伝子型 (AB115670)、2市場品はRPII系統でRp5の遺伝子型 (AB115671)、1市場品はRPIII系統でRp13の遺伝子型 (AB115680) をそれぞれ示した。

(3) マオウ

現在までの研究結果に基づき、マオウの基原解析に有用である葉緑体DNAの*trnK*遺伝子のイントロン領域の前半部分に着目し、解析を行った。*trnK*イントロンの5'側約1200 bpの塩基配列を解析した結果、11市場品のうち、内蒙古自治区産の9市場品が同じ配列を示し、*Ephedra sinica*の同領域の配列 (AB453807) と完全に一致した。新疆ウイグル自治区産マオウ (NIB-034) の配列は、*E. equisetina*の同領域の配列 (AB453795) と完全に一致し、*E. sinica*の配列と8箇所に塩基の違いが認められた。甘粛省産マオウ (NIB-210) の配列は、*E. intermedia*の同領域の配列 (AB453797) と完全に一致し、*E. sinica*の配列と比べると4箇所に塩基置換、1箇所に38 bpの長い挿入が認められた。

従って、今回解析したマオウ11市場品の基原植物は、内蒙古自治区産の9市場品がすべて

*E. sinica*であり、新疆ウイグル自治区産及び甘粛省産各1市場品がそれぞれ*E. equisetina*及び*E. intermedia*であった。

(4) トウキ

1) 核 rDNA ITS 領域

解析を行った 12 検体全てが、599 bp の配列を有していた (ITS1-5.8S-ITS2)。その内部配列は、To-2, 3, 7 で、64 番目の塩基が G/C、To-5 において、584 番目 (ITS2 として 206 番目) の塩基が同じく G/C であった点を除き、全ての検体で一致した。また、これらの配列は、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 上の *A. acutiloba* の配列 (Acc. No.: AB569093) と上記のヘテロ部位を除き一致した。また、ヘテロ部位の認められなかった To-1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12 では、完全に一致した。一方、データベース上の *A. sinensis* (Acc. No.: AF393784) 及び *A. gigas* (Acc. No.: DQ263580) とは、それぞれ、91.0-91.2% 及び 98.0-98.2% の相同性に留まり、これらの種とは、明確に区別された。

2) 核 DNA の LEAFY 遺伝子

全 12 検体について解析を行ったところ、多くの遺伝子型が見出されたことから、刻み試料である To-2, 3, 4, 5 については、別個体を 1 個体ずつ加え、各検体、2 個体を解析した。この結果、計 8 つの遺伝子型が確認され、この内、genotype 7 は、genotype 1 と 5 の雑種と推定される配列であった。ヘテロ型の配列を示した試料の内、To-4a, 7, 8, 12 については、サブクロニングにより 2 種の配列に分離後、解析を行い、得られた配列を各遺伝子型に帰属した。

(5) サンシシ

1) 核 rDNA ITS2 領域

Gardenia 属植物の配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行った San-1, 3 については、部分配列 183 bp、その他の試料については、全長配列 201 bp の塩基配列を決定した。全 11 検体で 7 つの遺伝子型が見出され、その内の一つ (San-1, 5, 7, 9) がデータベース上の *G. jasminoides* の配列 (Acc. no.: GQ434646, GQ434647) と一致した。また、この配列と 198 番目の塩基のみが異なる配

列が、San-6, 10 で検出され、このものとデータベース上の *G. jasminoides* の配列との雑種と考えられる配列が San-11 に認められた。

2) 葉緑体 DNA *trnL-F* 領域

Gardenia 属植物の配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行った San-3, 4, 7 については、部分配列 311 bp、その他の試料については、全長配列 343 bp の塩基配列を決定した。全 11 検体で、4 つの遺伝子型が見出され、その内の一つ (San-2, 5, 7, 8, 9, 10) がデータベース上の *G. jasminodes* (Acc. no.: FJ493345) の配列と一致した。

(6) オウレン

1) モデル試料の ITS1 領域の塩基配列情報収集

10種のモデル試料より調製したゲノムDNA各2サンプル合計20サンプルおよび、*Coptis* 属植物、培養物各試料のITS1領域の塩基配列を解析した結果、いずれも1~数種類の配列タイプが出現し、データベース登録配列と完全一致となり、基原植物種を確定できると考えられる試料は少数であった。しかしながら、配列タイプの出現頻度を勘案すると、その基原植物種は、*C. chinensis* または *C. deltoidea* と判断されるものがほとんどであった。なお、国内産の試料については、ITS1領域の配列はセリバオウレンまたはキクバオウレンと相同性が高く、*C. japonica* を基原とするものと判断された。

2) モデル試料および *Coptis* 属植物の *rpl16-rpl14* 領域の塩基配列情報収集

10種のモデル試料より調製したゲノムDNA各2サンプル合計20サンプルを鋳型とした *rpl16-rpl14* 領域のPCR増幅の結果をもとに塩基配列解析を行い、各試料についてアラインメント解析を行った結果、変異点の情報が得られた。生薬を試料とした場合、本領域の3'領域が解析不明瞭となる場合が多かった。*Coptis* 属植物由来の同領域の塩基配列は、*C. chinensis* (2タイプ)、*C. deltoidea*、*C. teeta*、*C. omeiensis*、そして *C. japonica* とタイプ分離することが明らかになった。

(7) ケイヒ

1) DNA 抽出方法の検討

新鮮葉からのDNA抽出は、収量に差があったものの、いずれのキットでも可能であった。ただし、*Cinnamomum* 属の葉は粘液質が多く、抽出操作初段階の試料懸濁バッファを多めにする等何らかの工夫が必要であった。ケイヒ生薬試料からのDNA抽出では、Isoplant, Blood & Cell Culture Mini Kit を用いた場合にのみ、DNA抽出が可能であった。

2) 塩基配列の比較

1. *TrnL-intron* 領域

GenBank 等の塩基配列データベース、および各種学術雑誌等から *Cinnamomum* 属の既知ジェノミック配列を検索したところ、*trnL intron* 領域の一塩基多型により、*C. cassia* とそれ以外の種を区別できるという情報があった。これを参考に、*C. cassia* のみでこの領域が増幅されるようプライマーを作成し、新鮮葉DNAを鋳型としてPCRを行ったが、*C. cassia* のほか実験に供した多くの種で増幅産物が検出された。そこで、この増幅産物をクローニングし、1種につき複数のクローンを選んで配列解析に供した。その結果、当該領域に種による変異は観察されなかった。

2. ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *rbcL* 上流の各領域

核 rDNA 上の ITS 領域、葉緑体上の *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rbcL* 上流の各領域についても 1. 同様、新鮮葉DNAを鋳型として行ったPCRの増幅産物をクローニングし、それぞれ複数クローンを選んで配列解析に供した。その結果、*rbcL* 上流の配列中に *C. cassia* とそれ以外の *Cinnamomum* 属植物の配列が異なっている箇所があることが判明した。

3) PCR-RFLP 法の検討

葉緑体DNA, *rbcL* 上流領域の差異がある部位は、制限酵素 Dde I の認識配列 (CTNAG) の一部となっている。そこで、ケイヒの基原植物種の区別や純度確認に Dde I を用いた PCR-RFLP 法が適用できないか、検討を行った。その結果、制限酵素

処理後に生じる2つの断片長がほぼ同じ長さ(約150 bp)となるため、アガロースゲル電気泳動では1本の太めバンドに観察され、処理前の300 bpバンドとほぼ同じ強度で観察できるようになった。そこで、提供されたデータベース構築用生薬サンプルについて上記のPCR-RFLP法を適用したところ、すべてのサンプルについて、その基原植物種は*C. cassia*であるという結果が得られた。

(8) サイコ

全てのサンプルで、ITS領域の一部ないし、全長の塩基配列の決定に成功した。NTB-190では個体間で差異が見られたため、調査した3個体の配列を枝番付きで記した。それぞれのサンプルについて、GenBankに登録されている配列との類似性に基づき基原種の鑑定を試みたところ、調査したサンプルは大きく3系統に分けられ、それぞれミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L., *Bupleurum chinense* DC. および *B. scorzonrifolium* Willd. と鑑定された。

(9) ジオウ

*trnK*領域の全長約2600塩基について比較したところ、*trnK-5'-half*と*matK*領域の間のイントロン部および*matK*コード領域内の各1サイトでアカヤジオウとカイケイジオウの間で塩基置換が存在しており、生薬の基原種鑑別のためのマーカーとして利用できる可能性が認められた。そこで、それぞれをサイト1およびサイト2として、提供を受けた生薬について塩基配列の解読を行うこととした。サイト1は内部プライマーを用いて、サイト2は同じプライマーの組合せでnested PCRを行ったところ、どちらの方法でDNAを調製した場合でも、PCR産物を得ることが出来た。このPCR溶液を用いてExoSap-It処理後にシーケンス反応を行うことにより、サイト1およびサイト2の塩基を同定することに成功した。

(10) シャゼンシ、ビャクジュツ

1) シャゼンシ

6市場品について、シーケンスを行った。この結果、いずれの試料も中国に分布する

オオバコ *P. asiatica* Linneに見られるタイプA2と完全に一致したことから、オオバコを基原種とするものと判定した。

2) ビャクジュツ

4市場品について、シーケンスを行った。この結果、3市場品はオケラ *Atractylodes japonica* Koidzumi et Kitamuraの配列と完全に一致していた。1市場品では、配列はオオバナオケラ *A. ovata* DC. (= *A. macrocephala* Koidzumi)と類似していたが、3つのサイトで塩基置換が生じていた。

【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】

(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)の項目、データ内容及び各データの形式を設定した。また、図表及び文献等の名前付けのルールを設定した。

(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コア生薬基原植物のうち、*Scutellaria baicalensis* (黄芩)、*Glycyrrhiza glabra* (甘草)、*Glycyrrhiza uralensis* (甘草)、*Zingiber Zingiber officinale* (生姜)、*Atractylodes lancea* (蒼朮)、*Panax ginseng* (人參)、及び第2コア生薬基原植物のうち、*Coptis japonica* (黄連)、*Coptis chinensis* (黄連)、*Coptis teeta* (黄連)、*Atractylodes japonica* (白朮)、*Atractylodes ovata* (白朮)、*Cinnamomum cassia* (桂皮)、*Gardenia jasminoides* (山梔子)、*Paeonia lactiflora* (芍薬)、*Plantago asiatica* (車前子)、*Perilla frutescens* (蘇葉)、*Angelica acutiloba* (当帰)、*Achyranthes fauriei* (牛膝)、*Achyranthes bidentata* (牛膝)、*Bupleurum falcatum* (柴胡)、*Rehmania glutiosa* (地黄)、*Cnidium officinale* (川芎)、*Rheum palmatum* (大黄)、*Ephedra intermedia* (麻黄)について、植物組織培養による効率的増殖に関する文献情報を収集した。また、第1優先及び第2優先生薬基原植物のうち、*Dioscorea japonica* (山薬)、*Dioscorea batatas* (山薬)、*Aconitum carmichaeli* (附子)、*Phellodendron amurense*

(黄柏)、*Citrus unshiu* (陳皮)、*Magnolia obovata* (厚朴) に関する文献情報を収集した。

(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

現在までにオリジナルデータの内、培養植物体又は培養シュートが得られ、組織培養系が確立し、継代維持が可能となっている植物の例を図1に示した。第1コア及び第2コア生薬基原植物については、外植片から培養植物体に至までのオリジナルデータを収集中であり、各種データが得られている。

【植物体栽培及び効率的生産法に関する研究】

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

植物体に含まれる主要元素である窒素 (N) をケルダール法により定量し、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) および亜鉛 (Zn) は ICP 発光分光高度法により多元素一斉定量を行った。窒素の含量は植物種に関わらず葉が 1.95~3.09%、茎が 0.64~0.84%、根が 1.05~1.26% であった。リンの含量は、トウキおよびホッカイトウキの葉や茎では 0.84~1.27%、センキュウでは 0.33~0.41% であり、根では植物種に関わらず 0.25~0.48% であった。カリウムの含量は、植物種に関わらず葉や茎では 2.80~4.71%、根では 1.27~2.02% であった。

カルシウムの含量は植物種に関わらず、葉や茎が 0.86~2.18%、根が 0.25~0.48% であった。マグネシウムの含量は、植物種および部位に関わらず 0.12~0.24% であった。鉄の含量は、103.6~549.9 ppm であった。マンガンの含量は植物種に関わらず、葉が 41.1~57.4 ppm、茎および根が 9.8~34.6 ppm であった。亜鉛の含量は、トウキおよびホッカイトウキの葉や茎では 35.6~47.9 ppm、センキュウでは 16.2~17.0 ppm であり、根では植物種に関わらず 16.8~27.8 ppm であった。

重金属として分類されるカドミウム (Cd)、

コバルト (Co)、クロム (Cr)、銅 (Cu) ニッケル (Ni) および鉛 (Pb) について、植物体の含量をICP発光分光高度法により多元素一斉定量を行った。植物体の種類、部位に関わらずカドミウムの含量は定量検出限界値以下であり、コバルトおよびクロムは検出されなかった。

2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

1) 機械的切断による種苗の調製

親株を機械的切断法では、30 個の親株から「中心」が 58 個、「外側」が 101 個調製できた。

2) 種苗の形状及び定植方法が萌芽に及ぼす影響

手植えによる定植を行った試験区の萌芽状況を測定した結果、「中心」が 96.7%、「外側」95.6%、「半端」が 98.9%であり、従来法の種苗が 90%と比べ十分高い萌芽率を示し、種苗の機械的裁断法は実用的であることが明らかになった。

3) 種苗の形状および定植方法が収量に与える影響

分散分析法により、種苗の形状と定植方法の各要因が収量に与える影響を解析した結果、定植方法は収量に影響せず、種苗の形状は有意に影響を与えることが明らかになった。

3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性 (ORAC) について

生薬「黄芩」の基原植物であるコガネバナ植物体の各部位および黄芩の生薬エキスの ORAC 値を求めた。コガネバナの葉の乾燥重量当たりの ORAC 値は、葉が 352.30、茎が 187.57、根が 225.63 であった。黄芩の生薬エキス14種類の ORAC 値は、587.9~1719.76 の範囲にあった。また甘草の生薬エキス16種類の ORAC 値は、623.16~1665.21 の範囲にあった。

【薬用植物の資源管理情報に関する研究】

1) 5年間貯蔵した種子の発根率と出葉率

貯蔵した種子の貯蔵開始時の発根率は 91.3%、出葉率は78.7%であった。貯蔵温度 5℃、-1℃および-20℃で5年間貯蔵した種子

の発根率はそれぞれ83.0%、88.7%および88.7%、出葉率はそれぞれ79.0%、71.3%および61.3%であった。発根率は-1°C区および-20°C区で高かったが、出葉率は5°C区が高く、貯蔵温度が低温ほど低下した。

2) 5年間貯蔵した種子の貯蔵期間別発根率と出葉率の推移

5年間の発根率は-1°C区が全体的に高く、次いで5°C区、-20°C区の順であった。発根率の推移は、5°C区では毎年ほぼ同一のS字曲線を描き、毎年同一の経過を示したが、-1°C区および-20°C区では、貯蔵期間により異なる推移を示し、-1°C区に比べ-20°C区の年次間の差異が大きかった。出葉率についても発根率と同様の推移を示し、5°C区では年次間の差異がほとんど見られなかったが、-1°C区および-20°C区では年次間の差異が見られた。

発根率および出葉率ともに、貯蔵期間により若干の上下動が見られたが、毎年少しずつ低下し、低下の程度は発根率に比べ出葉率で大きい傾向が見られた。

【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】

観察した市場品の粉末について、カンゾウでは、特徴となる結晶細胞列が全てで観察された。16局のカンゾウ末の生薬の性状の項では『本品は淡黄褐色又は淡黄色～灰黄色を呈し、弱いにおいがあり、味は甘い。本品を鏡検〈5.01〉するとき、主として結晶細胞列を伴う黄色の厚膜性の繊維束、孔紋、網紋及び階紋の膜孔と単穿孔のある径80～200 μm の道管、でんぷん粒及びシュウ酸カルシウムの単晶を含む柔細胞並びにそれらの破片、コルク組織を認める。皮去りカンゾウの粉末ではコルク組織を認めないか、又は認めてもわずかである。でんぷん粒は単粒で径は2～20 μm 、シュウ酸カルシウムの単晶は径10～30 μm である』と記されているが、多数のでんぷん粒が観察されたのはNIB-037とNIB-176のみであり、サンプル間で異なっていた。

オウゴンについては、仮道管の破片や細長い石細胞が確認できた。寺林の報告では、

横切面の道管の配列の特徴から野生品と栽培品及びその中間がの物が見いだされるとの報告があるが、粉末ではその違いはわからなかった。

その他の生薬についても、サンプル間での大きな差は認められなかった。

カンゾウの特徴として観察を行った結晶細胞列について、オウバク、カッコン、モクツウ、センナ、チョウジについても観察し写真を撮影した。16局にはその他シャクヤク、ボクソクについても結晶細胞列の記載がある。また、オウギ、オウレンでは結晶細胞列を認めないことが鑑別点となっている。でんぷんの記載は、イレイセンに始まりロートコンまでの多くの生薬に見ることができるが、今回はカシュウ、カッコン、コロボン、サンヤク、シャクヤク、ショウキョウなどの写真を撮影し比較することが出来た。カシュウ、カッコン、ハンゲでは複粒も観察された。コロボ、サンヤク、バイモでは大きなでんぷんが、カッコンでは角張った多面体のでんぷんの撮影をした。

【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

各生薬エキス標準品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)処理による効果は、LPS(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激により樹状細胞のCD80、CD86、MHC class IIの各細胞表面分子の発現増加に対し、同様の傾向を示した。オウゴンエキス、ケイヒエキス、ビャクジュツエキスの処理により、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に抑制傾向が示された。一方、ニンジンエキス、ジオウエキス、マオウエキス、ダイオウエキス処理により、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に促進傾向が示された。また、LPS(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激による各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に対しても同様の検討を行い、各生薬エキス標準品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)処理によりLPS(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激時に対する効果と同様の傾向が示された。これら生薬エキスのなかでも、特に、ケイヒエキスに有意な抑制効果が、ダイオウエキスに有意な促進

効果が確認された。また、これら生薬エキス標準品 (100 µg/mL) の 24 時間処置では、7AAD を用いた細胞生存率判定において、細胞生存率は変化せず、全ての生薬エキス標準品で細胞毒性は検出されなかった。

これら結果から、次に細胞表面分子発現した樹状細胞の増加に対し有意な効果を示したケイヒエキス (抑制効果) とダイオウエキス (促進効果) について個々の生薬エキスのロットについて検討を行った。

(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

1) Calpain酵素阻害活性

本アッセイでは、40%以上の阻害活性を示すエキスを「Calpain阻害活性が認められる」と判断することとした。生物活性評価においては、由来のことなる個々の生薬エキスを均等量混ぜたmixtureを用意し、まずその活性を測定する。有効性が認められた場合は個々の生薬エキスについても検討する、という手順を踏襲している。本年度検討した20種の生薬エキスのうち、Calpain活性を有意に変動させたものはなかった。

2) Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制作用

Aβ (25-35)の2日間処置により、大脳皮質神経細胞の約40%が死滅した。本年度検討した17種の生薬エキスのうち、オウレンに細胞毒性が強くAmyloid β 誘発神経細胞死によって減少した細胞数をさらに減少させた。一方、サンシシは細胞死阻害活性を有意に示した。その他の生薬エキスは無効だった。

3) Amyloid β 誘発の神経突起萎縮に対する抑制作用

Aβ (25-35)の3日間後にエキスを処置し、さらにその3日後に、大脳皮質神経細胞の樹状突起の長さ、軸索の長さを細胞当たりの長さとして算出した。Aβ (25-35)のみ処置すると、樹状突起、軸索ともにその長さが有意に減少した。生薬エキスを後処置することにより、樹状突起を有意に伸展させたのは、カンゾウ、ソウジュツ、ニンジン、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、マオウ、シャクヤク、トウキであった。また軸索を有意に伸展させたの

は、カンゾウ、ニンジン、ゴシツであった。

(3) がん細胞増殖試験、NF-κB活性化試験およびIL-6産生試験

1) がん細胞増殖試験

HeLa細胞に各標準ロットの生薬エキスを24時間培養後の細胞数をWST-1アッセイで検討した。陽性コントロールとして添加したdoxorubicinは細胞死を強く誘導し、ほぼ完全に阻害することを確認した。17種類の生薬エキスを検討した結果、100 µg/mLではあまり顕著に阻害するものは認められなかった。

2) NF-κB 活性化試験

オウゴンとダイオウがTNF-α単独よりも強くルシフェラーゼ発現を誘導した。一方、オウレンは弱いながらも阻害作用を示したことから、今後これら生薬について各ロットの試験を実施することにした。

3) IL-6 産生試験

細胞をTNF-αで刺激することにより、IL-6の発現が著しく上昇することを確認した。この上昇に対して各標準ロットの効果を調べた。その結果、強く阻害する生薬は認められなかったが、ケイヒ、ダイオウ、マオウが活性を示したため、今後各ロットの試験を実施することにした。

(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

11種類の生薬 (ショウキョウ、オウゴン、ソウジュツ、オウレン、カンゾウ、ニンジン、ゴシツ、サイコ、トウキ、ソヨウ、ダイオウ) から調製された熱水抽出エキスについてNO産生抑制活性を検討した結果、ショウキョウ、オウゴン、カンゾウ、ダイオウの熱水抽出エキスはNO産生抑制活性のロット差が大きいことが認められた。オウレンは強いNO産生抑制活性を示したが、強い細胞毒性も認められた。ソウジュツ、ニンジン、ゴシツ、サイコ、トウキ、ソヨウにNO産生抑制活性はほとんど認められなかった。ロット間でNO産生抑制活性の差異があることが認められたショウキョウについて、多変量解析を行なった。NO産生抑制活性の強さにより2群に分け判別解析を行なった結果、2群はきれいに判別された。さらにS plotより2群間の判別に大

大きく寄与している成分 (t_R : 25.8 min., m/z : 293, 191, 176) が見いだされた。本成分は標品との比較から、ショウキョウの辛味成分である [6]-gingerol と同定された。

【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

分析した各生薬は粉末色にも特徴が見られた。ブクリョウは色が白いため、 L^* 値が100付近となり、また測定した生薬の中では唯一 a^* 値がマイナスとなった。その他、葉類生薬のソヨウ、種子類のシャゼンシ、黄色みが強いオウレン、赤みが強いサンシシなども離れた場所に位置した。エタノール抽出液の透過光では、葉緑素を含むソヨウとマオウで L^* 値が小さくなり、 L^* 値と a^* 値の座標上で他と区別された。また、黄色みが強いオウレン、ダイオウ、サンシシの b^* 値が95以上となり、明確に区別された。熱水抽出液の透過光でもオウレン、ダイオウ、サンシシの b^* 値が80以上となり同様の結果が得られた。熱水抽出液に水酸化ナトリウム試液添加後の透過光では、オウレン、ソヨウ、ダイオウ、サンシシがそれぞれ L^* 値と b^* 値で特徴的な値を示し、他と区別された。熱水抽出液に塩化第二鉄試液添加後の透過光では、とくにダイオウとソヨウの L^* 値が小さくなった。熱水抽出液にヨウ素試液添加後の透過光では、今回測定した生薬の中には特徴的な値を示すものはなかった。

(2) 味認識装置を用いた生薬エキスの味覚評価

今回度検討した5種の生薬のうち、もっとも特徴的な味のパターンを示したのはオウレンであった。オウレンは、塩基性苦味後味と塩酸塩苦味後味が非常に大きな値を示し、それら以外の味要素はほとんど得られなかった。官能試験においても、センサで測定した濃度0.1 mg/mLでも極めて苦く、苦味以外の味は全く感じられなかった。その他4種類の生薬については、センサによる測定において、どの生薬も塩基性苦味後味が一番強く検

出されたが、官能試験において特に苦味を強く感じたものは無く、これらの生薬で塩基性苦味後味を評価対象とするのは適当でないと考えられた。塩基性苦味後味を除き、その他の味要素と官能試験での表現を合わせると、ジオウ、シャクヤク及びトウキについては、味センサのデータとある程度対応していた。しかしながら、これらの生薬の測定液は全体的に味が弱く、各生薬の明確な特徴を捉えにくかった。ケイヒについては、センサの応答性に合わせて、試料濃度5 mg/mL及び1 mg/mLの2種類で測定を行った。官能試験での表現では、甘味と辛味が主に表現された。

【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】

厚生労働省医薬食品局からの医薬品・医療機器等安全性情報では、11報に22処方の漢方製剤に関する間質性肺炎、肝機能障害の副作用情報が症例とともに掲載されていた。また、医療用漢方製剤の添付文書で「使用上の注意」の改訂がなされた処方については、メーカーからの報告によるもので副作用のないようにについての記載がなかったため、データベースには採用しなかった。

医中誌では551報の学術論文を得た。このうち、西洋薬の副作用に対する漢方薬の軽減効果や、単に漢方薬の効能についての論文で「副作用はなかった」という論文を除き、実際に漢方薬が引き起こした副作用に関する論文をピックアップしていき、165報を得た。同様に、PubMedでは149報を得て、同様の選抜方法により、21報を得た。以上の186報について内容を精査し、重複を除いて177報を抽出し、これらを整理して、情報をExcelのデータ形式にした。

この文献検索では、年代を制限せずにすべてのデータから抽出したが、漢方薬が引き起こした副作用報告で最も古いものは、1991年に小柴胡湯による間質性肺炎疑いの症例報告であった。

報告されている処方としては、多い順から、小柴胡湯23報、芍薬甘草湯22報、柴苓湯13報、防風通聖散11報、柴胡桂枝乾姜湯8報、

柴朴湯7報、乙字湯5報、葛根湯5報、牛車腎氣丸5報、紫雲膏5報、清心蓮子飲5報、抑肝散5報であった。

また、副作用の内容としては、間質性肺炎69報、偽アルドステロン症47報、薬物性肝障害35報、薬疹13報、膀胱炎11報、接触性皮膚炎5報であった。

しかし、漢方薬の添付文書において間質性肺炎と薬物性肝障害への注意が喚起されている処方すべてがこの検索できたわけではなかったため、医中誌においては検索対象を学会発表まで広げた。その結果、さらに628件の文献情報がヒットし、このうち、漢方薬が引き起こし副作用に関する論文をピックアップして、405報を得た。

報告されている処方としては、小柴胡湯45報、芍薬甘草湯19報、柴苓湯16報、柴朴湯8報、防風通聖散8報、柴胡桂枝乾姜湯8報、黄連解毒湯(温清飲を含む)7報、乙字湯6報、清心蓮子飲6報であったが、処方名がなく甘草含有とだけ記載のある報告が22報、中国由来の薬物による副作用の方国43報、漢方薬とだけ記載があるが詳細は不明な報告が116報もあった。

副作用の種類としては、間質性肺炎が103報、薬物性肝障害が75報、偽アルドステロン症が42報、アリストロキア酸腎症が27報、薬疹が21報、間質性腎炎が12報、薬物性膀胱炎が12報、接触性皮膚炎が8報であった。

学会発表で報告された漢方薬の副作用情報については、処方名の記載がないもの、誤った基原の生薬を使用したために発症し本来の漢方薬の副作用とは言えないアリストロキア酸腎症に関する症例報告、また、学术论文で報告されたものと重複しているもの等が多いことから、今回のデータベースには登録しない方針とした。

【漢方処方構成生薬の水煎出エキス収量に関する研究】

1) 局方生薬のエキス収量

局方生薬として流通する黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、それぞれの20gに相当するエキス収量を測定し、生薬重量あた

りのエキス収率を示した。また、5社の平均値を100とした場合の相対値も示した。それぞれの生薬について会社間の変動係数(Cv)を算出したところ、いずれの生薬も10%以下に収まり、特に、地黄、芍薬及び当帰については、それぞれ5.6%、4.1%及び4.6%と小さなばらつきであった。一方、会社内変動係数は数パーセントであることが多く、同じ会社の生薬に関する測定間のばらつきは小さいことが分かった。ただし、例外的に桂皮及び当帰については会社内のばらつきが大きい場合もあった。

2) 甘草生薬原料のエキス収量

医薬基盤研究所薬用植物資源センターが収集した甘草生薬原料は、原形のものと同刻みのものがあつたため、抽出効率を揃える目的で、全サンプルについて粉末化した後に煎出した。それぞれの粉末20gに相当するエキス収量を測定し、生薬原料重量あたりのエキス収率を示した。16種類の生薬原料におけるエキス収率の変動係数は、18.1%であった。また、一方、同じサンプルを3回測定する中での変動係数はいずれも数パーセントであり、同じ生薬原料に関する測定間のばらつきは小さいことが分かった。

D. 考察

【薬用植物総合情報データベース構築に関する研究】

総合データベース構築プロジェクトは、総合データベース本体、データ登録システム、公開システム、モデル試料管理システム、そして、資源管理システムの各データベースからなる総合データベースを構築するものである。

本年度は、医薬基盤研究所外部の拠点研究者からのインターネットを介したデータ登録システム及び、一般への公開システムの構築が完了し、データベースシステムの骨格構築についてはほぼ完了したと考えられる。

今後、試験運用を行い、実際にデータの登録または閲覧を行い、登録システム及び公開システムの問題点を点検し、さらに来年度のシステム改良、構築へ反映させる予定である。

また、本データベースシステムは、汎用データベース言語である MySQL で構築されているため、昨年度より医薬基盤研究所内のメディカルバイオリソース研究事業の計画として行なっているデータベースの統合事業においても、各種データベースの横断検索から、ダイレクトな検索結果の表示が可能であり、収集されたデータのよりいっそうの広範な活用ならびに、薬用植物及び生薬の情報の普及につながるものと期待される。

【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】

生薬の熱水抽出において、ブクリヨ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が、その理由は粉末が極端に疎水性の性質を呈しているため、水に懸濁ができないためである。そこでブクリヨウは粉末にはせず、刻み状態で抽出を行い、最終的には吸引濾過にて残渣を除いたところ、エキスを得ることが可能となった。

データベース上での成分情報のフレーム構築に関しては、入力上の問題点について、システム開発元である富士通九州システムズ株式会社へ伝えられた。NMR 情報化合物情報新規入力の際の「」による入力不可については、開発元でも同様の現象は確認しており、バグの修正により、本現象は解消された。モデル試料管理システムからの写真の転送については、モデル試料の生薬写真を保存している Windows マシンから Linux (web) サーバにファイルを転送する設定を再度開発者側にて行い、写真表示が可能となった。

LC-MS 分析については、オウレンは熱水抽出エキスの LC-MS において 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。NIB-113 と 185 は日本産のオウレンであり、これらは明らかに中国産とは成分的に異なっていることがこの結果からも明らかとなった。

m/z 336 および 352 の XIC で観測されている 2 ピークのプロダクトイオンスペクトルは、それぞれほぼ同一のパターンを示し

ていることから、これらはそれぞれ異性体の関係にあると考えられた。

トウキにおいては、全体的に検出されるピークは少なかった。トウキには *ligustilide* などの精油成分を多く含んでいるため、イオン源を APCI に変えるなどの対策が必要と考えられた。

サンシシに関しては、配糖体と思われるピークが多く検出されたが、多変量解析の結果、長手のものと丸手のものを分けるマーカ化合物として m/z 331 に見られたが、MS のフラグメンテーションと文献記載の化合物の *epijasminoside A* と推定されたものの、MS のみからでは構造を確定できないため現在 LC-NMR-MS による特定を行なっているが、場合によっては単離が必要であり、今後エキスの精製分離も行い構造を確定させる予定である。

ジオウに関しては、熱水抽出エキス中には多くのオリゴ糖を思われる成分が LC-MS により検出されており、乾ジオウと熟ジオウの間で明確に成分差が見られた。多変量解析の結果と合わせ、マーカとなるオリゴ糖があることが分かったが、それらの構造はまだ未決定である。

ゴシツに関してはグルクロン酸を糖部とし、オレアノール酸を非糖部とするトリテルペンサポニン類が多く含まれていることが知られている。特に糖部にさらに不安定な酸が結合したものを *acyranthoside* 類としていくつかが報告されている。以前の当センターの研究において *acyranthoside* 類は熱に特に不安定であり、熱水抽出では存在していないと考えられる。また *chikusetsusaponin* 類も 70°C 以上の乾燥温度条件では末端部から糖が開裂していくことを明らかにしているため、同様に熱水抽出では十分な開裂が起きているものと考えられた。LC-MS データから *chikusetsusaponin* 類と考えられるピークがいくつかが認められるため、今後はこれらピークの詳しい同定をしていく予定である。

ケイヒに関しては、主ピーク 1~3 は、プロダクトイオンの脱水ピークが主であることや推定組成式などから、ケイヒに特徴的な

ジテルペノイドと推定した。ピーク 4 は m/z 147 $[M+H]^+$ を主とするスペクトルであり、推定組成式等からクマリンと推定された。ピーク 5 は m/z 133 $[M+H]^+$ を主とし、推定組成式等からケイアルデヒドと推定された。ピーク 6 は m/z 163 $[M+H]^+$ を主とし、推定組成式等からサフロールと推定された。これらのスペクトル解析の結果から、本分析条件によって測定されたデータには、ケイヒに含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、特徴的なデータの集積が可能となった。

シャクヤクに関しては、ポジティブモードでのピーク 1 は m/z 481 $[M+H]^+$ を主とし、 m/z 961 $[2M+H]^+$ 等のピークが観測された。ポジティブモードでのピーク 2 は m/z 179 のグルコース、水及びベンゾイル基が解離したピークを主とし、 m/z 463 の脱水ピークや m/z 498 のアンモニウムイオン付加ピークが観測された。これらの結果から、ピーク 1 はアルビフロリン、ピーク 2 はペオニフロリンと推定された。これらのスペクトル解析の結果から、本分析条件によって測定されたデータには、シャクヤクに含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、特徴的なデータの集積が可能となった。

サンシシに関する LC-MS-SPE/NMR 測定において、判別に寄与していると考えられる分子量 330 の化合物は、3~4ppm 付近に糖由来と考えられるシグナルが観測されたことから、epijasminoside A と推察された。また、軽水分析が可能になるオンライン SPE (Solid Phase Extraction) 装置の利用を実行したことにより、LC-MS 解析の結果との整合性がとれ、より確実な化合物同定が可能になった。

生薬の確認試験では、スポットの色も重要な情報となることから、画像データの公開に当たっては、色の再現性を確保する必要があるが、データの集積の段階では、色見本を添えて画像データを取得することにより、相対的に色の再現性を確保することとし、公開の段階でその方法に応じた補正を考えたこととした。

一般に薄層クロマトグラフィー法は、Rf

値の再現性に乏しいとされているが、日本薬局方の一般試験法<2.03>薄層クロマトグラフィーの規定を厳密に守ってデータを集めたところ、Rf 値については、かなり良い室間再現性が得られた。これは、今回の研究に参加しているのが、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であることも大きな要因であると考えられるが、局方の規定によって、Rf 値の再現性がかなり担保されていることが確認された。

本研究に於いて検討した総ての確認試験について現行の 10 cm の展開と 7 cm 展開を比較したが、ほとんどの場合 Rf 値並びにクロマトグラムパターンに違いは見られなかったことから、現行では 10 cm となっている生薬の TLC による確認試験の展開距離を 7 cm に変更することが可能であるものと思われる。しかし、ボクソクやエンゴサクでは、7 cm の展開ではスポットの分離が不十分であったことから、一律に展開距離を短縮できるものではないことも明らかとなった。

6 生薬の国内市場品における HPTLC 分析を行い、各標準品のスポットを中心に、分離良好な画像データを得ることが出来た。標準品以外のスポットにおいては、各生薬間で分布に違いもあり、今後それらスポットの化合物を特定することで、品質への影響を考察するためのデータになり得るかどうか、さらに検討を進める予定である。

【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

これまでの研究結果では、中国内蒙古自治区産の *P. lactiflora* 及び赤芍はすべて赤芍系であり、一方、安徽省、浙江省及び四川省産の白芍はすべて白芍系であった。また、日本産芍薬の基原である薬用品種「梵天」や「北宰相」は白芍系であった。今回のシャクヤク市場品の結果はこれまでの知見と多くが一致したが、日本産シャクヤクの基原に関しては異なっていた。日本市場には薬用品種以外の園芸品種が流通していることが示唆された。

(2) ダイオウ

RPI 系統の遺伝子型 Rp4 は、青海省東部～四川省北西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、同地域産出の錦紋大黄の系統であり、円筒状の根茎が発達し、箱黄、包黄の名称で流通する。RPII 系統の遺伝子型 Rp5 は、四川省北西部～甘肅省南西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、現地ではタングート大黄の名称を持ち、根の発達が良い。RPIII 系統の遺伝子型 Rp13 の大黄は、四川省中西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、雅黄の系統である。

9 市場品のうち 6 市場品が RPI 系統の遺伝子型 Rp4 であったことから、日本では品質の良いダイオウが流通していることがわかった。また、雅黄の名称を持つ 2 市場品については、1 市場品が RPIII 系統の遺伝子型 Rp13、1 市場品が RPII 系統の遺伝子型 Rp5 であったことから、前者は本来の雅黄の産地である四川省中部産であり、後者は四川省北西部産であることが推測された。

(3) マオウ

内蒙古自治区産の市場品は *E. sinica*、甘肅省産の市場品は *E. intermedia* であり、これまでの我々が得ている結果と一致した。*E. equisetina* は、野生資源の著しい減少により、近年市場品にほとんど見られないが、今回、新疆ウイグル自治区産の市場品に確認された。少なくとも *E. sinica* 由来の 2 市場品は栽培品であり、野生品との同等性が担保されるのであれば、栽培品への移行が望まれる。

(4) トウキ

ITS 領域の配列解析結果から、今回解析を行った試料は全て、日本薬局方が定める通り、*A. acutiloba* あるいは *A. acutiloba* var. *sugiyamae* であると推定された。また、今回の結果から、国内に流通する当帰の ITS 配列は、種内及び個体内変異も極わずかであることが明らかになった。ITS 領域は、多コピー遺伝子であるため、PCR 増幅が容易であることから、中国及び韓国当帰との区別には本領域の塩基配列解析が有用であると思われる。

一方、LEAFY 領域の遺伝子解析では、7

つの遺伝子型が見出された。この内、genotype 7 は、雑種型であるため、ハプロタイプとしては 6 つの遺伝子型が認められた。6 つのハプロタイプの内、genotype 4 及び genotype 6 は、明らかに他のハプロタイプと比べて変異が多く、異質である。これらはいずれも国内本土産であるが、その来歴について興味もたれる。

(5) サンシシ

今回解析した 2 つの領域において、全ての試料がデータベース上の *G. jasminodes* の配列と一致するかあるいは良く似た配列を示した。データベース上の配列と一致しなかった試料についても、San-3 の *trnL-F* IGS 配列を除いては、その違いはわずかであることから、*G. jasminoides* の種内変異の範囲であると想像される。ただし、今回の結果のみから、本研究で使用された試料の基原種を *G. jasminoides* と特定するには問題がある。この点については、*G. jasminoides* の標準植物試料を多数、収集し、その種内変異の範囲について情報を得る必要がある。

(6) オウレン

ITS1 領域、*rpl16-rpl14* 領域は、それぞれ生薬オウレンの基原植物鑑別に有用と考えられるが、同領域の情報をを用い、総合的に判断することにより、より確度の高い基原植物種鑑別が可能になると考えられる。

Rpl16-rpl14 領域については、比較対象とした *Coptis* 属植物または培養物と、モデル試料より得られた配列で完全一致したものは 1 検体のみであった。本領域を使用したモデル試料の基原植物種の鑑別の確度を向上させるためには、より多種の基準となる *Coptis* 属植物について塩基配列情報の収集を行う必要がある。

(7) ケイヒ

Cinnamomum 属植物は世界でひろく薬用・食用に多用されているにも関わらず、GenBank データや学術論文として報告されている塩基配列情報は驚くほど少ない。これは、特に熱帯性の *Cinnamomum* 属植物については、新鮮葉を材料とした時でも、生薬を材料とした時でも、植物中に粘性物質が非常に

多く、核酸抽出が困難であるからであろうと考えられる。

葉緑体 DNA の各領域の配列は、いずれも種間で相同性が高く、細かな 1 塩基変異がところどころに観察された。RbcL 上流の配列については *C. cassia* とそれ以外の種で異なっており、さらにその配列が制限酵素認識部位に含まれていたため、PCR-RFLP 法を考案することができた。PCR-RFLP 法は、サンプルごとのシーケンス解析よりも簡便で低コスト、短時間で結果が得られる等の利点があると考えられ、さらに、わずかな違いで結果が大きく変わってしまう PCR に制限酵素処理を組み合わせることで、PCR だけを使った弁別方法よりも信頼性が高まると考えられる。

(8) サイコ

国内に流通する生薬サイコには、大きく分けて 3 系統あり、それぞれミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L.、*B. chinense* DC. および *B. scorzonerifolium* Willd. と鑑定された。

大井 (1965) によると、*Bupleurum chinense* DC. および *B. scorzonerifolium* Willd. は *B. falcatum* L. のシノニムとされており、*B. falcatum* の種内変異の範疇と考えられる。第十六改正日本薬局方にはサイコ基原植物としてミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L. のみが記載されているが、本試験で調査したサンプルは全て日局基原適合品である。

(9) ジオウ

試験を行った生薬のうち 8 市場品では、サイト 1、サイト 2 で mixed nucleotide の配列タイプを示した。また、3 市場品ではサイト 1 およびサイト 2 がともに G の配列タイプを示し、これまでに供試したアカヤジオウ、カイケイジオウのシーケンスタイプと一致しなかった。今後、さらにサンプル数を増して検討することが必要であるが、この領域は基原種鑑別に適さない可能性が考えられた。

(10) シャゼンシ、ビャクジュツ

シャゼンシに関しては、6 市場品についていずれの試料も、中国に分布するオオバコ *P. asiatica* Linne に見られるタイプ A 2 と完全に一致したことから、オオバコを基原種と

するものと判定された。

ビャクジュツに関しては、4 市場品のうち、3 市場品はオケラ *Atractylodes japonica* Koidzumi et Kitamura の配列と完全に一致していた。1 市場品では、配列はオオバナオケラ *A. ovata* DC. (= *A. macrocephala* Koidzumi) と類似していたが、3 つのサイトで塩基置換が生じており、さらなる検討が必要と考えられた。

【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】

組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のため、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を行い、収集した文献情報のデータシートへの入力を行った。漢方薬原料生薬の基原植物に関する情報は、英語以外の言語、中国語や韓国語で書かれたものが数多く存在し、日本語あるいは英語への翻訳が困難である。また、文献検索により要約が得られても、入手が困難なものが多い。文献情報については、日本語又は英語への翻訳方法及び文献の入手方法について検討が必要であろう。

オリジナルデータ取得時には、材料の植物系統、外植片とした部位、種子のロット等の違いにより、同じ生薬の基原植物であっても、あるいは同じ植物種であっても、殺菌が困難で初代培養物を得るのが非常に困難である例も生じている。また、文献中の植物ホルモン条件では期待した反応が認められない結果も生じている。そのため、オリジナルデータについては、殺菌条件も含め、詳細なデータを収集中である。

【植物体栽培及び効率的生産法に関する研究】

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植物体に含まれる無機成分量を測定した結果、主要元素である窒素、リンおよびカルシウムは葉および根に多く含まれ、カリウムは、

葉および茎に多く含まれていた、マグネシウムは部位間の差は認められなかった。マンガン、亜鉛は概ね根、茎、葉の順で含量が増加する傾向が認められた。鉄の含量はその測定値の標準偏差が大きく、種間および部位における傾向は認められなかった。この原因として、本試験では試料の粉碎にはウィレー式粉碎機を利用しており、粉碎機の性能上、粉碎機由来の鉄等の混入が考えられる。従って、次年度以降は、重金属分析に対応した粉碎機の利用を検討する必要があると思われる。

2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

機械的裁断法により調製された種苗の重量は、従来法に比べ種苗の重量が大きい傾向にあった。機械的裁断法は、従来法に比べ作業が容易であり、ホソバオケラの種苗作製が未経験の作業員でも容易にできると作業員から評価された。機械的裁断法により調製された種苗は、「中心」、「外側」および「半端」の何れにおいてもよく萌芽し、機械的裁断法が種苗調製法として有効であることが示された。

3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性 (ORAC) について

コガネバナの部位別の ORAC 値は、利用部位である根よりも葉が高かった。これは、ダイオウを除く、根を利用部位とする複数の薬用植物の葉、茎、根の ORAC 値の比較でも同様に、葉の ORAC 値が高かった。生薬エキスに関しては、ORAC 値と各項目の相関は見られないが、同一品目において 2~3 倍の抗酸化力の差が見られた。

【薬用植物の資源管理情報に関する研究】

異なる温度条件下で 5 年間貯蔵した種子の発根率は 83%以上、出葉率は 61.3%以上の高い値を示した。高発芽率の要因は、良質な種子であったこと、即ち、貯蔵開始時の発芽率が高く、5 年間の発芽試験期間中、カビの発生が軽微であったこと、さらに種子の乾燥状態が良く保たれていたためと考えられた。トウキ種子の貯蔵に当たり、良質な種子を乾燥良好な状態で保存することが必要不可欠である。

【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】

薬局方に記載されている用語について、実際の写真データが有効であることを再認識したが、同一生薬内でもバラツキがあり、個体差まで含めると、どれを標準にしてよいか迷うところである。その点で、文献に見られる線画はバラツキを加味しそれぞれの特徴をとらえた標準的なものであり、併記する必要があると感じた。でんぷん粒については、生薬により大きさも形状も様々であり、複粒などを含めて特徴を理解できれば生薬の鑑別に大いに役立つと思われた。ただし、径の大きさについては同じ生薬であっても、生育段階によって異なることが想像できるため、生と基原植物の両方のデータを収集する必要があると考えられた。結晶細胞列も生薬により特色があり、鑑別に利用できる要素であると確認できた。ただし、サンプル間でのバラツキについては、把握しておく必要があると感じた。

【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

本研究は、免疫制御機構に重要な役割を担う樹状細胞の成熟化に伴う細胞表面分子の増加を指標として生薬エキスの生理活性を測定し、ケイヒとダイオウの生薬エキスのロット差を検出したことから、この系がこの生薬エキスの標準化に有用であることが示唆された。

ケイヒエキスは、ロット間で樹状細胞の成熟化に対する生物活性に差が大きいことが確認され、抑制効果を示すロットと促進効果を示すロットが確認された。また、ベトナムの Yen Bai 産の 2 つの生薬エキスロットが特に強い抑制効果を示したことから、含有成分の違いによる効果の違いが示唆され、産地の異なった生薬エキスの検定に有用であると考えられた。

ダイオウエキスは、ほぼ全てのロットで樹状細胞の成熟化に対する亢進効果が確認された。また、産地による相関もみられず、ロ

ロット間による生物活性の強さの影響については詳細な検討が必要であるが、生物活性に差が検出できることから生薬エキスの検定に有用であると考えられた。

(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

抗アルツハイマー病活性を予測可能な in vitro アッセイ系として、本年度3種の実験を実施した。3種のアッセイ系のうち特に初代培養大脳皮質神経細胞を用いたアッセイでは、そこで有効性を示す薬物がアルツハイマー病モデル動物においても記憶障害改善作用を良く示すことを、我々のこれまでの研究で示唆してきた。これらは簡便に結果を得られるアッセイではないが、実施する意義は大きいと考え、今後も他の生薬について実施していく予定である。

(3) がん細胞増殖試験、NF-κB 活性化試験および IL-6 産生試験

がん細胞増殖試験において、昨年度実施したパイロット試験では、試験濃度を 500 μg/mL としていたためオウゴンに活性が認められた。しかし、一般的に培養系で生薬エキスの生物活性試験を実施する場合、100 μg/mL 以下が望ましいとされていることもあり、今年度から標準ロットの試験は 100 μg/mL 以下で実施することにした。その結果、オウゴンのがん細胞増殖抑制効果は認められなくなった。このような試験条件下で、3つのアッセイで弱いながらも活性を示す生薬が見出されたことから、各生薬の標準ロットを作製し生物活性の有無を確認する方法は、効率的な手法として有効であると思われる。

(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

生薬市場品について NO 産生抑制活性を検討した結果、NO 産生抑制活性についてロット差の大きい生薬があることが示された。ロット差が大きかった生薬は、LC-MS や TLC においても差異が認められており、大変興味深い。しかしながら、活性と産地や栽培品・野生品の違いなどとの相関は認められなかった。今回、用いた試料は熱水抽出エキス

であり、主に高極性成分であるため、すべての成分を網羅していない可能性が考えられた。

多変量解析により、ロット差の大きかった生薬について、その要因となる成分の検出を試みた。ショウキョウについて多変量解析を行い、[6]-gingerol を見出した。本検討から、市場品のロット差やその要因となるマーカー成分を明らかにすることが可能となった。

【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

生薬の色を市販の色彩計を利用して客観的に数値で表現することにより、生薬の種類、等級、新旧、特徴的な含有化学成分の多寡などに関する情報が得られると考察した。また、表色系には種々あるが、生薬分析には今回利用した色差などを表現することができる $L^*a^*b^*$ 表色系が優れていると判断した。

粉末色に加え、とくに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を添加した際の色の変化を数値として知ることには生薬の化学的な品質評価にもつながると期待される。塩化第二鉄試液を加えた際の色の変化はフェノール性水酸基の量を反映しており、生薬の化学的品質の評価も可能であることを示唆している。水酸化ナトリウム試液はオキシアントラキノン類の存在で赤く変色し、ダイオウの品質評価に有効であると考えられ、今後、定量値との比較を行なうことにより、明らかになると考察する。

(2) 味認識装置を用いた生薬エキスの味覚評価

各品目の生薬はすべて、それぞれの味の要素について一定の範囲の数値を示し、突出して異なる数値を示したサンプルは無かったことから、各品目の生薬それぞれの平均的な味のパターンを表していると考えられる。

オウレンに関しては、ヒトの感覚と味センサの結果が非常に良く合っており、今回実施した測定条件で評価可能と考えられる。その他4種類の生薬については、センサによる測

定において、どの生薬も塩基性苦味後味が一番強く検出されたが、官能試験において特に苦味を強く感じたものは無く、これらの生薬で塩基性苦味後味を評価対象とするのは適当でないと考えられた。今回、試料エキス量が十分でなかったこともあり、ジオウ、シャクヤク及びトウキはすべて濃度5 mg/mLで測定を行ったが、味の評価には更に高濃度での測定が適していた可能性が考えられる。

【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】

漢方薬が引き起こす副作用のうち、最も多いものは各種処方誘導する間質性肺炎であり、3番目に多かったのが薬物性肝障害であった。間質性肺炎については、現在までに28処方において、薬物性肝障害については41処方において、医療用漢方製剤の添付文書上で「使用上の注意」がなされているが、学術論文だけを検索した調査ではすべての処方にはヒットせず、論文化されていない副作用が多く存在することが示唆された。このように、学術論文になっていない症例報告の学会発表レベルでもデータベースに取り上げる必要があると考え、医中誌を学会発表まで広げてより詳細に検索し、405報の文献情報が得られたが、不正確な情報が多く、学会発表における症例報告では信頼に足るものが少ない印象が得られ、情報の精査が課題となった。

【漢方処方構成生薬の水煎出エキス収量に関する研究】

漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベースに実測データを付加する目的で、平成22年度に行った黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人參に加えて、黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、5つの主要生薬メーカーの局方規格製品についてエキス収量を比較した。今年度測定した5つの生薬についてはメーカー間のばらつきが小さく、平成22年度測定が生薬において生姜及び人參の会社間変動係数が26.5%及び26.7を示したことと対照的であった。桂皮はややその中で

会社間変動係数が大きいもの(10.0%)であったが、エキス自体の収率が小さく(5社平均6.16%)、しかも揮発性成分が多いため、わずかなばらつきが大きな数字に反映されたものと考えられた。

また、規格化されていない甘草の生薬原料について、16種類のサンプルのエキス収量を測定したところ、16検体の平均収率は24.3%であり、これは平成22年度に測定した局方生薬5メーカーの平均値(23.4%)と極めて近い値を示し、そのエキス収率が甘草の特有な値であることが示された。一方、サンプル間の変動係数は18.1%であり、5社の局方規格甘草における10.0%と比較して大きく、産地などの環境要因の影響を受けやすい生薬と思われたが、産地(内蒙古、甘肅省、吉林省及び寧夏省)による特徴を見出すことはできなかった。

E. 結論

昨年度より構築を開始した、総合データベースは、データベース本体、データ登録システム、公開システム、モデル試料管理システム、そして、資源管理システムの各データベースの構築を完了し、データベースを構成する全データカテゴリについて、データの登録並びに公開が可能な体制が整った。

今回市場流通品の熱水抽出エキスを作成し、LC-MSの検討を行った。その結果を多変量解析にかけ、産地、基原、調製法などによる各郡の成分差異を検討したが、オウレンは国内産と中国産の間に明瞭な成分差異が認められ、一部のアルカロイド類が国内産には欠けている、あるいは国内産にしかみられないことが分かった。またサンシシに関しては山梔子と水梔子の間において同様に成分の明瞭な差異がみられた。クチナシに関してはそのマーカ化合物の特定を急いでいるが、六単糖の配糖体であることがMSから予想された。分子量からepijasminoside Aと推定された。ジオウに関してはその調製法における乾ジオウ、熟ジオウにおいて、オリゴ糖の部分において顕著な違いがみられた。今回の結果から生薬の調製法並びに基原の違い

において成分差異があることが分かり、将来的には成分面から逆に基原、調製法などを推定することが可能となると思われた。

データベースに関してはユーザー側の「見易さ」「検索のしやすさ」「情報量の充実」が当然のように大事ではあるが、それらデータの入力のための入力システムの良し悪しが研究者の負担や労力を大きく左右する。そのため入力システムの構築には注意を払わねばならない。今年度入力をする際に起きた問題点を一部だけ報告したが、このような入力作業側の問題点の指摘と開発者間の緻密なやり取りが今後のデータベースの質に大きく影響することを念頭に置かなければならない。

日本薬局方に規定されている薄層クロマトグラフィーによる生薬の確認試験について、代表的なクロマトグラムを画像データとして集積し、一般に公開するために、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、データ収集に際してクロマトグラムの再現性等に関する検討を行った。クロマトグラムの色の再現性については、色見本を添えてデータを収集することにより、相対的に色の再現性を確保することとした。また、現行の確認試験で採用されている 10 cm の展開とこれを 7 cm に変更した場合とを比較した結果、検討したほとんどの確認試験において、展開距離を 7 cm に変更しても確認試験自体には何の影響もなく、必要とする時間を大幅に短縮できることを明らかにした。

6 生薬の国内市場品における HPTLC 分析を行い、各標準品のスポットを中心に、分離良好な HPTLC 画像データを得ることが出来た。これらは視覚判断可能な一斉分析データとして、有用な資料になると考えられる。今回のような広範囲な国内市場品生薬の同等性を化学的に評価した例は少なく、本結果はデータベース構築のための科学データとして期待される。

11 種類の繁用生薬の遺伝子鑑別に関する情報を整備することを目的にして、現在の日本市場に流通している生薬市場品の遺伝子

解析を行い、各生薬の基原種の同定に有用な遺伝子領域を次のように明らかにした；シャクヤク：ITS 領域、ダイオウ：*matK* 遺伝子、マオウ：*trnK* 遺伝子、トウキ：ITS 領域、サンシシ：ITS2 領域及び *trnL-F* 領域、オウレン：*rpl16-rpl14* 領域及び ITS 領域、ケイヒ：*rbcL* 遺伝子の上流領域、サイコ：ITS 領域、ジオウ：*trnK* 遺伝子、シャゼンシ：ITS 領域、ビャクジュツ：ITS 領域。また、当該領域の解析結果から、11 生薬の市場品の基原を明らかにした。

組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のため、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を行い、収集した第 1 コア及び第 2 コア生薬基原植物に関する文献情報のデータシートへの入力を行った。また、オリジナルデータ取得のための材料が入手できた植物については、組織培養系の誘導と効率的増殖法及び植物体再生条件について検討した。

植物体栽培および効率的生産法に関する情報整備のため ICP 発光分光光度計を用いた植物体の無機成分含量の測定法を検討した結果、植物体の主要元素 4 元素、同微量元素 3 元素、さらに重金属元素 6 元素（合計 13 元素）の含有量を ppm-%オーダーで一斉分析できることが示された。ホソバオケラの種苗調製法と定植方法を検討した結果、機械的に格子状に裁断する方が作業者の負担を少なくし、かつ同方法で調整された種苗が実用上問題なく使用できることが示された。

資源管理情報として、特に種子の発芽と貯蔵条件について検討を行った。貯蔵温度 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試験を行った結果、貯蔵期間 5 年種子の発根率、出葉率共に高い値を保持していた。貯蔵温度 5°C 区および -1°C 区の発根後の根は、褐変がほとんど見られず良好であった。また、発根率および出葉率における貯蔵期間別の推移は、5°C 区が貯蔵年数に関わらず安定していた。従って、トウキ種子の貯蔵は、良質な種子を用い、種子の吸湿を防ぎ、発根後の根の損傷が少ない 5°C で貯蔵

するのが最も良好と思われた。

生薬の形態情報データベースの公開を目指して、文献情報を収集した。さらに、対応する組織についてモデル生薬の粉末を作成し観察を行った。また、日本薬局方の生薬の性状に記載されている用語をわかりやすく説明するために、対応する組織についての観察を行い、写真データを蓄積した。

各種生物活性試験において、ケイヒエキスとダイオウエキスは、樹状細胞の成熟化に伴う細胞表面分子発現量の増加を指標とした生物活性測定試験により、ロット間の差を検定可能である。ケイヒエキスは、ロットの違いによりその効果が大きく異なり、ダイオウエキスは、ロットの違いにより生物活性の強さが異なった。また、他の生薬エキスについては別の試験による検定が必要である。また、 $A\beta(25-35)$ 誘発神経細胞死抑制作用では、サンシシが活性を示し、 $A\beta(25-35)$ 誘発神経突起萎縮作用では、カンゾウが樹状突起・軸索をともに伸展させた。ショウキョウ、オウゴン、カンゾウ、ダイオウの熱水抽出エキスがNO産生抑制活性のロット差が大きいことが示され、ショウキョウのNO産生抑制活性のロット差に寄与している成分として[6]-gingerolを見出した。

市販の色彩計を利用し、生薬の粉末色、エタノール抽出液、熱水抽出液および熱水抽出液に各種呈色試液を加えた時の色の変化を、 $L^*a^*b^*$ 表色系にて数値で表現することにより、生薬の鑑別や個々の生薬の品質評価が可能であると判断した。即ち、生薬の基源鑑別、新旧の把握、含有成分の多寡などの情報が得られることが明らかになった。

各品目の生薬エキスサンプルはすべて、それぞれの味の要素について一定の範囲の数値を示し、突出して異なる数値を示したサンプルは無く、平均値を用いて各品目の生薬それぞれの味のパターンを示すことが可能であった。品目毎の特徴としては、今年度検討した5品目の生薬のうち、オウレンが非常に特徴的な味のパターンを示した。一方、ジオウ、シャクヤク、トウキの3品目は似た味のパターンを示した。これらはヒトによる官能

試験においても特徴的な味の表現はされないが、液の色やにおいから識別することは可能であり、生薬の識別には五感それぞれから得られる情報で総合的に判断することが重要であることが改めて示されたものと考えられる。

漢方処方の副作用に関する情報として、「医薬品・医療機器等安全性情報」11報に22処方と、一般学術論文405報を得て、その内容をデータベースに登録するための形式に整理した。

平成23年度の重点検討生薬（コア生薬）に指定された黄黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、5つの主要生薬メーカー局方規格製品についてエキス収量を測定した。いずれも会社間のばらつきは小さかったが、桂皮のようにエキス収率自体が小さく、また揮発性成分を多く含む生薬は、やや他に比べて若干のばらつきが観察された。甘草については、様々な産地に由来する生薬原料についてエキス収量を測定し、産地などの環境の影響を受けやすい生薬であることが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fuchino, H., Hishida, A., Akagi, K., Kiuchi, F., Kawahara, N.: Quality evaluation of Crude Drugs Using LC-NMR/MS (1) in the Cultivation and Processing of *Achyranthes* Roots, *The Japanese Journal of Pharmacognosy*, **66** (1), 1-16 (2012).
- 2) Kawano, N., Kiuchi, F., Kawahara, N., Yoshimatsu, K.: Genetic and Phenotypic Analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition, *Pharmaceuticals*, **5**, 133-154 (2012).
- 3) Kojoma, M., Hayashi, S., Shibata, T., Yamamoto Y., Sekizaki, H.: Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza*

- uralensis*) plants cultivated under the same conditions, *Biol. Pharm. Bull.*, **34** (8), 1334-1337 (2011).
- 4) Inui, T., Kawano, N., Shitan, N., Yazaki, K., Kiuchi, F., Kawahara, N., Sato, F., Yoshimatsu, K.: Improvement of benzylisoquinoline alkaloid productivity by overexpression of 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase in transgenic *Coptis japonica* plants, *Biol., Pharm., Bull.* in press (2012).
 - 5) Yoshimatsu, K.: Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities, *Journal of Traditional Medicines*, **28**, Supplement, 44, The 28th Annual Meeting of Medicinal and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, August 27-28, Toyama, p.44, S2-3(2011).
 - 6) Yoshimatsu, K., Kawano, N., Inui, T.: Efficient glycyrrhizin production by hydroponic cultivation of Chinese licorice, *BIOINDUSTRY*, **28**(12), 13-20 (2011).
 - 7) 吉松嘉代：医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部育種生理研究室の紹介，和漢薬，**702** (11), 3-4 (2011).
 - 8) Yoshimatsu, K.: Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities, *Journal of Traditional Medicines*, **29**, 30-34 (2012).
 - 9) 川原信夫：生薬・薬用植物の資源確保、生産流通及び品質規格の動向—（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの取り組みについて—。ファルマシア，**47** (5), 419-423 (2011).
 - 10) 川原信夫：研究交流、情報交換の場としての生薬・薬用植物研究者コンソーシアムの設立について。和漢薬，**701** (10), 5-6 (2011).
 - 11) 川原信夫：漢方薬に使用される生薬・薬用植物の現状。社団法人東京生薬協会会報，**452** (1), 4-8 (2012).
 - 12) 河野徳昭：薬用植物資源の高度利用化に向けて—ポストモデル植物時代の生薬ゲノミクス—，和漢薬，**703** (12), 5-6 (2011).
 - 13) Kawahara, N.: Project of Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, Japan, Tokyo Forum for International Standardization of Natural Medicines, 153-164 (2012).
 - 14) 瀧野裕之：独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部栽培研究室—薬用植物成分研究と生薬の品質評価法の研究、種子の保存—，和漢薬，**704** (1), 7-9 (2012).
 - 15) 熊谷健夫：医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部栽培研究室—薬用植物の栽培研究と種子交換—，和漢薬，**705** (2), 4-6 (2012).
 - 16) 菱田敦之：日本における薬用植物栽培の普及とその課題。和漢薬，**706** (3), 4-7 (2012).
 - 17) Arita M., Yoshimoto M., Suwa K., Hirai A., Kanaya S., Shibahara N., Tanaka K.: Database for crude drugs and kampo medicine. *Genome Inform.* **25**, 1-11 (2011).
2. 学会発表
 - 1) 大根谷章浩、安藤成紀、北中進、瀧野裕之、川原信夫：食品としても用いられる薬用植物の一酸化窒素産生抑制活性について。日本食品化学学会第17回総会・学術大会（2011. 5. 19-20, 東京）
 - 2) 川原信夫：生薬・薬用植物に関する最近の動向と薬用植物資源研究センターの取り組み—薬用植物資源の収集、栽培、育種及び品質評価等を中心に—。日本生薬学会北海道支部第35回例会（2011. 5. 21, 札幌）
 - 3) 吉松嘉代：栽培技術の革新：閉鎖系栽培施設における薬用植物の養液栽培。第28回和漢医薬学会学術大会（2011.8.27, 富山）
 - 4) 堂井美里、御影雅幸：生姜の修治に関する研究（2），加熱による色彩の変化と含有成分の相関。第28回和漢医薬学会学術大会（2011.8.27, 富山）
 - 5) 川原信夫：生薬・薬用植物情報の集積と発信。日本生薬学会第58回年会（2011. 9. 25, 東京）
 - 6) 河野徳昭、吉松嘉代、川原信夫、丸山卓

- 郎、合田幸広、小松かつ子：市場流通生薬の遺伝子情報による安全性・品質確保に関する研究-黄芩-について。日本生薬学会第58回年会（2011. 9. 24-25, 東京）
- 7) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、千田浩隆、柴田敏郎、川原信夫：閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産に関する研究(2)ウラルカンゾウ優良株の作出と増殖。日本生薬学会第58回（2011年）年会（2011.9.24-25, 東京）
- 8) 大根谷章浩、瀧野裕之、川原信夫、高橋豊：国内流通生薬のNO産生抑制活性とLC/MSメタボローム解析。日本生薬学会第58回年会（2011. 9. 24-25, 東京）
- 9) 天倉吉章、武田理沙、好村守生、吉田隆志、瀧野裕之、川原信夫、合田幸広：薬用植物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-ソウジュツについて-。日本生薬学会第58回年会（2011. 9. 24-25, 東京）
- 10) 松本敏一、吉松嘉代、川原信夫、山本伸一、新野孝男：薬用植物の組織培養による増殖及びプレート法による超低温保存-1 シャゼンシ及びソヨウ。農業生産技術管理学会平成23年度大会（2011. 10. 21-22, 平塚）
- 11) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、川原信夫、松本敏一、岩本嗣：漢方薬に使用される薬用植物の組織培養及び効率的増殖法に関する情報整備 (1)。日本薬学会第132年会（2012. 3. 28-31, 札幌）
- 12) 河野徳昭、丸山卓郎、合田幸広、小松かつ子、吉松嘉代、川原信夫：漢方薬に使用される薬用植物の遺伝子鑑別に関する研究 -黄連について-。日本薬学会第132年会（2012. 3. 28-31, 札幌）
- 13) 瀧野裕之、大根谷章浩、川原信夫、赤木謙一、寺林進、合田幸広、高橋豊：薬用植物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-オウゴン、サンシシ、オウレン市場流通品の成分比較について-。日本薬学会第132年会（2012. 3. 28-31, 札幌）
- 14) 大根谷章浩、瀧野裕之、高橋豊、川原信夫：国内流通生薬のNO産生抑制活性とLC/MSメタボローム解析（その2）。日本薬学会第132年会（2012. 3. 28-31, 札幌）
- 15) 天倉吉章、瀧野裕之、山上沙織、好村守生、吉田隆志、合田幸広、川原信夫：HPTLCによる国内流通生薬の成分比較。日本薬学会第132年会（2012. 3. 28-31, 札幌）
- 16) 菱田敦之、林茂樹、川原信夫、柴田敏郎、菊池原、武田修己：ケイガイの栽培に関する研究 施肥量が花穂収量に及ぼす影響。日本薬学会第132年会（2012. 3. 28-31, 札幌）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 出願番号；特願2011-245757、発明者；吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、千田浩隆、特許出願人，識別番号；鹿島建設株式会社（000001373）代理人；丹羽俊輔（100129300）、発明の名称；カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法、提出日；平成23年11月9日。