

201208013A

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24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25(2013)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	51
生薬（ゴシツ、ゴシュユ、チンピ）の遺伝子情報について 河野徳昭	83
2. 成分分析データ情報及びさく葉標本に関する研究 browse 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 browse 裕之	109
HPTLCによる国内流通生薬の成分比較 browse 裕之・天倉吉章	281
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 browse 浩之・大根谷章浩	319
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	361
生薬、ハンゲの遺伝子情報について 合田幸広・丸山卓郎	407
生薬、カッコンの遺伝子情報について 合田幸広・丸山卓郎	415
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	429
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-κB活性化試験及びIL-6産生試験 済木育夫・櫻井宏明	435
樹状細胞に対する生薬エキスの効果 済木育夫・山本 武	441
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	447
LS-MS分析による成分プロファイル比較 済木育夫・田中 謙	455

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—	赤木謙一467
6. 成分分析データ情報に関する研究 (TLC 写真情報の集積) —組織培養物および効率的増殖法に関する研究—	木内文之481
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	509
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589
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603
10. 資源管理情報及び植物体栽培に関する研究 —5年間低温貯蔵した種子の発芽率について—	飯田 修619
11. 内部形態写真及び植物体栽培情報に関する研究 オウレンの生薬の性状について	酒井英二 酒井英二・寺林 進・山路誠一627
黄耆と牡丹皮の生薬の性状について	酒井英二・山路誠一・寺林 進639
沢瀉、葛根の生薬の性状について	酒井英二・寺林 進・山路誠一647
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653
川原信夫・安食菜穂子	683
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	695
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	697

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
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、これまでに構築してきたシステムについて、様々な機能拡張を行った。登録システムについては、各カテゴリのデータ互換性や関連性を考慮した機能拡張を行い、データベースコンテンツの維持性能を向上させた。また、公開システムについては、検索機能や、デザイン等を見直し、より操作性の高いシステムとなるよう機能拡張を行った。さらに運用面では各種データの定期バックアップ環境を構築し、一般公開に向けたシステム整備が完了した。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最終評価を行い、公開を目指し、コア生薬20種（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、ゴシツ、サイコ、サンシシ、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、ビャクジュツ、ブクリョウ、マオウ）を中心とした各種データ入力を行った。さらに英語版の閲覧・検索にも引き続き対応した。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25種の各種試験用エキスの作成を行っている。引き続き、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。また、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

渕野 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

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

乾 貴幸

(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

樋口 かな

山梨県工業技術センター 研究員

大谷 克城

旭川医科大学 講師

岩本 嗣

神奈川工科大学大学院工学研究科 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

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 教授
好村 守生
松山大学薬学部 助教
山上 沙織
松山大学薬学部 助手
寺林 進
横浜薬科大学 教授
山路 誠一
日本薬科大学 准教授
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
山田 裕子
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
高谷 和宏
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
西川忠輝
ブルカーバイオスピン株式会社
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掲載されている。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掲載された、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載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）

昨年度までに、データベース本体、データ登録システム、一般公開用薬用植物総合情報データベースシステム（以下、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システムの基盤構築は完了し、本データベースを構成する全データカテゴリについて、データの登録ならびに公開が可能な体制が整っていた。

3か年計画の最終年度となる本年度は、これまでに構築を進めて来たデータベースシステムについて、様々な機能拡張を行った。運用面では、リレーショナルデータベースのバックアップとは別に、写真やPDFファイル、グラフデータ・画像の定期バックアップ環境を構築した。登録システムについては、各カテゴリのデータ互換性や関連性を考慮した機能拡張を行い、データベースコンテンツの維持性能を向上させた。また、公開システムについては、検索機能や、デザイン等を見直し、より操作性の高いシステムとなるよう機能拡張を行った。

なお、本データベースの開発には高度な専門性が要求されるため、これらの開発は株式会社富士通九州システムズ（福岡県福岡市）に委託し、今年度は、開発方針の打ち合わせや、開発成果物の取り扱い説明等、班会議を含め、計6回のミーティングを行った。今年度の具体的な開発日程は下記のとおりである。

2012年4月に公開システム及び登録システムの試用版を導入・公開し、データ入力を担当する拠点研究者に登録システムの操作マニュアルを送付するとともに、ログインID、パスワードを発行し、データ登録を中心とするテスト運用を開始した。

テスト運用においては、実際に各拠点研究者の分担するパートのデータ登録の試行を依頼し、データ登録、データ表示上の不具合等について意見を集約し、富士通九州担当者に伝えた。なお、テスト運用開始後、全カテゴリのデータ入力用フィールドに不備がないか確認するため、またカテゴリ間でのデータ表示の遷移状況を確認するため、少なくとも1生薬について全カテゴリのデータ入力を試行する必要があると判断し、5月よりオウゴンについて全入力担当者にデータ登録を依頼した。

2012年5月8日、今年度第1回目の開発会議を行い、昨年度に提起した今年度の初期開発項目について確認した。第2回開発会議2012年6月19日において今年度の開発項目の追加事項について確認を行い、2012年6月末をもって、初期試行版の意見集約は締め切り、8月に開催した第3回開発会議において今年度の主開発項目を決定した。また同会議において、公開システムの新規デザイン案について決定した。今年度開発項目に対応したデータ登録システム、公開システムは研究開発期間の最後となる2012年12月6日の筑波研究部での第4回開発会議において富士通九州担当者より概要の説明ののち、公開用サーバに導入された。

その後、2013年1月23日に開催された研究班全体会議において拠点研究者に今年度の開発

済み項目について概要の説明を行い、同月31日まで意見等の集約を行った。そして、2013年2月26日にトップページのデータベース概要の説明文、薬用植物の写真ギャラリー用データ等を掲載した公開予定版の公開用サーバへの導入を完了し、最終的な修正点について説明を受け、今後のシステム改良に向けた打ち合わせを行い、3年間のシステム構築を完了した。今後、体裁等の細部の調整を済ませた上で、本年度末までにweb上で一般に公開を開始する予定である。

なお、データ入力担当者からの不具合の報告、操作上の疑問点等は逐次、富士通九州担当者に連絡し、今年度のシステム開発事項として追加対応することを確認、もしくは対処法をユーザーに連絡する等の対応を行った。

これまでに「薬用植物データベース」として公開していたファイルメーカー版は、本総合情報データベースの公開開始を持ってアドレス (<http://mpdb.nibio.go.jp/>) を新データベースに移譲し、公開を終了する予定である。

【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（浏野、大根谷、蓮沼）

昨年度に引き続き生薬関連業界に協力のもと収集された、現在市場に流通している生薬について、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。

（2）成分データベースフォーマットの構築（浏野）

今年度、登録システムにおいて確認された不具合または使用感の不良点等の要望をとりまとめ、開発元の富士通九州システムズに改善要求として提出した。

（3）LC-MS 情報等の集積（浏野、合田、済木、赤木、西川、鎌倉、高橋、大根谷、樋口、

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。さらにオウレンおよびカンゾウについては NMR 及び LC-MS-SPE/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、山田、佐藤、高谷、川崎、神本、菊地、近藤、杉本、玉木、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 10 cm 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、*R_f* 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 (瀏野、天倉、好村、山上、川原、合田)

1) 試料、試薬および装置

試料とした国内流通品〔シャクヤク (15 試料)、サイコ (10 試料)、サンシシ (11 試料)、ダイオウ (9 試料)、ソヨウ (5 試料)、トウキ (12 試料)、センキュウ (9 試料)、ビャクジュツ (9 試料)、シャゼンシ (7 試料)、マオウ

(11 試料)、ゴシツ (7 試料)、ジオウ (11 試料)、ボタンピ (20 試料)、チンピ (18 試料)、トウニン (15 試料)、タクシャ (28 試料)、カッコン (25 試料)、ゴシュユ (11 試料) オウギ (11 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 サンプルアプリーケーター 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)、希硫酸試液、4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液、4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液、ニンヒドリン・エタノール溶液、2, 6-ジブプロモ-N-クロロ-1, 4-ベンゾキノンモノイミン試液、チモール・硫酸・メタノール試液 (いずれも局方に準拠して調製) のいずれかにより行った。

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) センキュウ (小松、朱)

1) 実験材料

センキュウ 9 市場品につき、各 1 検体を取り、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 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 μ L 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 *trnK* 遺伝子を増幅した。

得られた PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動法で増幅を確認後、PCR 産物を精製し、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) ボタンピ (小松、朱)

1) 実験材料

ボタンピ 20 市場品につき、各 1 検体を取り、試料とした。また、参考とするため富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物資料館所蔵の生薬標本 2 点を加えた。

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 μ L 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。ITS1-5.8S-ITS2 の全領域を 2 分割し、ITS1 領域と 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部はプライマーセット ITS-1F と In 18S-25S-3'R を用いて、また 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部と ITS2 領域はプライマーセット In 18S-25S-5'F と 18S-25S-3'R を用いて、全 DNA を鋳型として PCR 法で増幅した。

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) タクシャ (小松、朱)

1) 実験材料

タクシャ 28 市場品につき、各 1 検体を取り、試料とした。また、参考とするため民族薬物資料館所蔵の生薬標本 1 点を加えた。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、約 100 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 2 μ L 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。ITS1-5.8S-ITS2 の全領域を 2 分割し、ITS1 領域と 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部はプライマーセット ITS-1F と In 18S-25S-3'R を用いて、また 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部と ITS2 領域はプライマーセット In 18S-25S-5'F と 18S-25S-3'R を用いて、全 DNA を鋳型として PCR 法で増幅した。

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) ハンゲ (合田、丸山)

1) 実験材料

ハンゲ 21 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料を、MM-300 により粉碎し、試料の粉末、約 10 mg を TE buffer 200 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument により、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA 領域あるいは、葉緑体 DNA の *trnL* 3'-exon 及び *trnF* 領域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 ITS1 領域あるいは、葉緑体 DNA の

trnL-trnF IGS 領域を含む 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スにより塩基配列を決定した。

(5) カッコン (合田、丸山)

1) 実験材料

カッコン 23 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料を MM-300 により粉碎し、試料の粉末、約 10 mg を TE buffer 200 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument により、genomic DNA を抽出、精製した。調製された genomic DNA を鋳型とし、植物の核 rDNA 領域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 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、KOD FX DNA Polymerase を用いた。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スにより塩基配列を決定した。

(6) ゴシツ (河野)

1) 実験材料

生薬オゴシツ 7 市場品をモデル試料とした。さらに、下記の *Achyranthes* 属植物体試料は下記のとおり。

標本園ヒナタイノコズチ、標本園トウゴシツ、*A. aspera* (葉、ベトナム)。

2) 実験方法

1. 生薬ゴシツからのゲノム DNA 調製

モデル試料、生薬試料そして乾燥試料について原形、刻み (荒い刻み) 生薬の 1 片を 1 試料とし 2 試料を解析に供した。DNA 調製キットには DNeasy Plant Mini Kit を標準的に使用した。剪定鋏で削りとした生薬片約 20-50 mg を個別に直径 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、MS-100 にセットし 2,500 rpm で 1 分間破碎し

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、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。

2. 植物体からのゲノム DNA 調製

植物体の葉、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 スクリューキャップチューブに入れ、MS-100 にセットし 3,000 rpm で 1 分間 x 2 回破碎した。破碎液に 2 mL の RNase (キット添付) を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。

3. 各遺伝子領域の増幅・塩基配列解析

KOD-plus を使用し、得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析し、単一バンドの場合は直接、複数バンドの場合はゲル精製を行い、クローニング&シーケンシングまたは、ダイレクトシーケンシングに供した。

ダイレクトシーケンシングは、PCR 増幅産物を ExoSAP-IT で処理したのち、標的領域の増幅に用いたプライマーを用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit でシーケンシングサイクル反応を行った。

クローニング&シーケンシングには多検体を高効率に解析処理するため、コロニーダイレクトシーケンシングの手法をとった。PCR 増幅産物を A-attachment mix で処理し Ligation Kit Ver.2 で T-vector にライゲーションしたのち、*E. coli* DH5a を形質転換し、LB (Amp50, X-gal) プレート上培養し、コロニーを単離した。1 試料あたり、8-16 コロニー (クローン) をレプリカプレートに植菌し、コロニーダイレクト PCR に供した。

(7) ゴシユユ (河野)

1) 実験材料

ゴシユユ 11 市場品を試料とした。さらに、本研究に供した *Tetradium* 属植物体試料は下記のとおり。

種子島研究部ホンゴシユユ-1♀、同ホンゴ

シュユ-6、同コホクゴシュユ-4、同コホクゴシュユ-5、同ゴシュユ-1、同ゴシュユ-2。

2) 実験方法

モデル生薬及び植物試料の基原植物種鑑別に関する遺伝子解析

データベース登録のITS領域の塩基配列を用い、系統樹を作製した。各試料からの遺伝子試料調製法、解析法は、前項ゴシツと同様である。なお、モデル生薬の果実3粒を1検体として、各モデル生薬より2検体を遺伝子解析に供した。

(8) チンピ (河野)

1) 実験材料

チンピ 18 市場品を試料とした。さらに、本研究に供した、*Citrus* 属植物体試料は下記のとおり。

- ・ ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marcowicz) : 筑波研究部圃場。
- ・ ヒラミレモン (シークワーサー) *Citrus depressa* (*Citrus* × *depressa*, formerly *C. pectinifera*) : 沖縄県名護市。
- ・ ユズ (*Citrus ichangensis* × *C. reticulata*, formerly *C. junos* Siebold ex. Tanaka; : 茨城県久慈郡大子町。

2) 実験方法

1. チンピからのゲノム DNA の調製

他の生薬試料と同様に DNeasy Plant Mini Kit を使用し、ゲノム DNA 調製を試みたが、得られた DNA を鋳型とした場合、ITS 領域や *rpl16-rpl14* 領域の増幅が困難なケースが多かった。そこで、Genomic-tip 20/G を使用し、ゲノム DNA の調製を行った。

2. チンピの ITS 領域の PCR 増幅および塩基配列解析

常法に従い、ITS 領域(ITS1- ITS2)の増幅を行った。PCR 増幅産物はゲル精製ののち、末端 A 付加を行い、T-vector にクローニングし、各検体について8クローンの塩基配列の解析を行った。

3. ウンシュウミカン新鮮葉より調製したゲ

ノム DNA を鋳型とした CHS 遺伝子の増幅および塩基配列解析

ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marcowicz) : 筑波研究部圃場の新鮮葉より DNeasy Plant Mini Kit を使用しゲノム DNA を調製し、これを鋳型として、CHS ゲノム領域の増幅を行った。なお、アニール温度 58°C では非特異的増幅産物が多かったため、アニール温度を 62°C に変更し PCR を行った。

(9) キョウニン (山路)

1) 実験材料

ジオウ 27 市場品を試料とした。

2) 実験方法

1. DNA の抽出

各サンプルより1粒を選び、約 200 µg を切り出して DNeasy[®] Plant Mini Kit を用いてそのプロトコルに従って DNA を抽出した。抽出した DNA は AE Buffer 200 µL に溶解した。なお、DNeasy[®] Plant Mini Kit を用いての DNA 抽出は核酸抽出精製装置 QIAcube を使用し、プロトコルに従って行った。

2. PCR

rpl16 intron 領域の増幅に用いるプライマーは Nishizawa and Watano (2000) で発表された *rpl16/F* (5'-GTT TCT TCT CAT CCA GCT CC-3') および *rpl16/R* (5'-GAA AGA GTC AAT ATT CGC CC-3') を用いた。対象領域をサーマルサイクラ GeneAmp[®] PCR System 9700 もしくは Tprofessional Thermocycler にて PCR 増幅した。

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

精製産物の塩基配列は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.1.1 と Applied Biosystems[®] 3500xL Genetic Analyzer を用いて決定した。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 の両方を比較して配列を決定した。

(10) ボウイ (山路)

1) 実験材料

ボウイ 30 市場品を試料とした。

2) 実験方法

1. DNA の抽出

収集された 30 サンプルそれぞれから、約 200 μg を採取し、DNeasy[®] Plant Mini Kit を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は AE Buffer 200 μL に溶解した。なお、DNeasy[®] Plant Mini Kit を用いての DNA 抽出は核酸抽出精製装置 QIAcube を使用し、プロトコルに従って行った。

2. PCR

ITS1 と ITS2 を別々に増幅した。使用機器はサーマルサイクラ GeneAmp[®] PCR System 9700 もしくは Tprofessional Thermocycler 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 の両方を読んで配列を決定した。

(11) バクモンドウ (伊藤)

1) 実験材料

本研究に使用した試料中、試料 No. 1 と No. 7 は中国にて採集された乾燥葉サンプル、No. 2 から No. 6 は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、あるいは日本各地から採集した各新鮮葉サンプルであり、試料 No. 8 から No. 27 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一部を譲渡されたものである。

2) 実験方法

1. DNA 抽出方法の検討

試料を剪定ばさみにより細切した後 DNeasy Plant Mini Kit により以下のように DNA を抽出した。葉、生薬とも 100 mg を用い、キットに付属のプロトコルを以下のように改変して利用した。

- (1) 液体窒素下でサンプルを粉砕する。
- (2) 粉砕したサンプル 100 mg を 1.5 mL チューブに移し、AP1 400 μL と RNaseA 4 μL を加えよく攪拌する。
- (3) 65°C で 10 分加温。加温中 2~3 度取り出して攪拌する。
- (4) 15,000 rpm で 5 分遠心。
- (5) 上清をとり、AP2 130 μL を加え、氷上で 5 分間保持。
- (6) 15,000 rpm で 5 分遠心し、上清を shredder column に入れ、15,000 rpm で 2 分遠心。
- (7) 1.5 mL チューブに溶出画分を移し、AP3 225 μL とエタノール 450 μL を加え転倒混合。
- (8) DNeasy column に 650 μL の 7. を入れ、8,000 rpm で 1 分遠心し、溶出液を捨てる。
- (9) 残りの 7. を同じ DNeasy column に入れ、8. を繰り返す。
- (10) 2 mL チューブにカラムを移し、エタノールで希釈した AW 500 μL を入れ、8,000 rpm で 30 秒遠心し、溶出液を捨てる。
- (11) 同じカラムにもう一度エタノールで希釈した AW 500 μL を入れ、8,000 rpm で 30 秒遠心する。
- (12) 溶出液を捨て、15,000 rpm で 5 分程度遠心、膜を乾燥させる。
- (13) カラムを 1.5 mL チューブにつけかえ、50°C に温めた AE 100 μL 注を膜上に滴下。5 分間保持した後、8,000 rpm で 1 分遠心。
- (14) 13. を繰り返し、溶出画分を DNA サン

プルとする。

2. PCRによる rbcL 領域の増幅と制限酵素処理

抽出した DNA サンプルを用い、ITS 領域、および rbcL 領域を PCR により増幅した。

得られた PCR 増幅産物 30 μ L のうち 10 μ L を non-digest 対照試料として取り分けておき、残り 20 μ L を NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up を用いて精製し、これを制限酵素 *Hinc* II を用いて消化した。反応液の組成は PCR 産物 10 μ L, *Hinc* II 2.5 U とし、全量が 11.5 μ L となるように調製した。

3. ジャノヒゲ属試料とヤブラン属試料の混合試料を用いた検出限界の検討

ジャノヒゲ属、ヤブラン属の塊茎をそれぞれ -4°C で 5 時間凍結し、-23°C で 24 時間凍結乾燥させたのち、乳鉢と乳棒ですりつぶして粉末とした。試料全体に対するヤブラン属植物試料の混合比率を 1, 10, 30, 50, 90, 99% とした混合試料を作成した。総量 80 mg の混合試料から DNA を抽出し、rbcL 部分配列を利用 PCR-RFLP 法を用いて、ジャノヒゲ属にヤブラン属が混入している場合の検出限界を検討した。

【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、河野、乾、岩本、松本）

（1）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、第 2 コア、第 1 優先及び第 2 優先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。

（2）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

収集された市場品、黄芩（15 系統）、甘草（16 系統）、地黄（11 系統）を試料とした。

試料溶液の調製は、80°C で乾燥した試料 250 mg を精秤し、60 mL 容テフロン製分解チューブに入れ、4 mL の濃硝酸を加えて試料に浸透するまで放置した。次に 1 mL 濃塩酸を加えた後、120°C に設定したカーボン製ブロックヒーターで 30 分間加熱した。次に分解チューブの蓋を閉め、ブロックヒーターの設定温度を 155°C に上昇して 30 分間加熱した。分解して得られた溶液は、0.1 N 希硝酸を用いて 50 mL に定容し、PTFE 製ろ過フィルターを用いてろ過して濾液を測定溶液とした。

試料の測定は、iCAP-6300 を用い、検量線の作成は、汎用混合標準溶液を用いた。

測定元素と測定波長は、標準試料を用いた予備試験から、Ag (測定波長: 328.0), Al (396.1), B (249.6), Ba (493.4), Cd (226.5), Co (237.8), Cr (284.3), Cu (324.7), Fe (239.5), Ga (417.2), Ge (265.1), Li (670.7), Mn (257.6), Mo (281.6), Na (588.9), Ni (231.6), Pb (220.3), Sb (217.5), Se (203.9), Si (251.6), Sn (189.9), Sr (346.4), Ti (336.1), V (311.0), W (239.7), Zn (202.5), Zr (343.8), Ca (317.9), K (766.4), Mg (279.5), P (178.2) とした。

（2）茶刈り機を用いたシソ収穫省力化の検討

チリメンシソ (*Perilla frutescens* (L.) Britton var. *crispa* (Thunb.) Decne.) を試料とした。

苗の作成は、2012 年 5 月 1 日にプラグエースが充填された 200 穴セルトレイへ各穴 5 粒播種した後、無覆土で鎮圧して温室内で育苗した。また、苗は 2012 年 6 月 5 日に圃場へ定植し、栽植密度は、株間 40 cm、畝幅 90 cm

とした。

茶刈り機による収穫方法の検討は、茶刈り機及び手刈りにより収穫する試験区を2反復設け、3 mの収穫に要した時間を計測した。調査は2012年8月22日に実施し、高さ50 cmより上部を収穫部位とした。また、収穫した茎葉の生重量を測定した。さらに、機械収穫した茎葉を天日乾燥し、無作為に3グループ各100 gを採取し、葉と茎の重量を計測して異物（茎）の混入割合を算出した。

（3）生薬、薬用植物の抗酸化活性（ORAC）について

植物体および生薬の生理活性を調べる目的で、生薬生姜（6点）、蒼朮（8点）および人参（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生姜の基原植であるショウガの植物体（葉、茎および根茎の各部位）の抗酸化能を評価した。抗酸化評価法は、ORAC値（親水性画分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）

今年度は脱酸素剤（エージレス）および乾燥剤（シリカゲル）を用い、貯蔵温度5°Cで5年間貯蔵した11種類の薬用植物種子の発芽率を調査した。

【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、山路）

独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター（NIB）および横浜薬科大学（HYCP）が収集した市場流通品のオウギ、ボタンピ、タクシャ、カッコンおよびオウレンと、金沢市および七飯町（北海道）で採取したオウレンについて、外観、内部形態、におい、味を調べた。外観は肉眼で、内部形態は、サンプルを凍結マイクロトームで約20 μmの厚さにスライスし切片を顕微鏡下で観察した。におい、

味は五感によった。

今回は植物研究雑誌を中心に生薬学雑誌、薬学雑誌に掲載されている生薬粉末の記載について調査した。

【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（済木、山本）

1）実験材料

本研究では、3種の生薬エキス試料（センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ）を使用した。これら試料は、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96 well plateに播種し、0.1 μg/mLもしくは0.5 μg/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 μg/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

センキュウ、ソヨウ、ブクリョウの3種について活性を検討した。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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 μM)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 μm 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、 0.5×10^5 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 μM A β (25-35) 及び生薬エキス(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 μL / 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 μM 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% paraform- aldehyde-PBS溶液を各wellに約150 μL 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 μL 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 μL 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 μm \times 860 μm 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-κB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。

本年度は、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウの3種の生薬について検討を行った。

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-κB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-κB6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 μg/mLで試験を実施した。

3. NF-κB 活性化試験

HeLa-κB6細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に最終濃度100 μg/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-κB6細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に最終濃度100 μg/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 (湊野、大根谷、高橋、蓮沼)

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150 μm の篩を通した。ま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10 mm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、各分析値間の色の変化を調査し、考察を加えた。なお、熱水抽出液を優先したため、アルコール抽出液を試験できなかった資料がある。

(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

前年度に引き続き、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、ゴシツ (7 検体)、サイコ (10 検体)、サンシシ (11 検体)、シャゼンシ (7 検体)、ダイオウ (9 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、前年度と同様に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、ゴシツ: 5 mg/mL、サイコ: 5 mg/mL、サンシシ: 5 mg/mL、シャゼンシ: 5 mg/mL 及びダイオウ: 2 mg/mL である。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、牛膝、大黄、白朮、麻黄及び茯苓に関して、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、生姜に関して、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

牛膝、大黄、白朮、麻黄及び茯苓について、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3,000 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

生姜の生薬原料サンプルについて、原形のもののはさみで5～10 mmに切り刻んだ。刻んだサンプルをVibrating Sample Millで粉碎した。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3,000 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）データベースシステムの改修

今年度は、以下の改修を行った。

- ① 内部形態及びさく葉標本情報 について、内部形態情報とさく葉標本情報をそれぞれ独立なカテゴリとしてデータベース化
- ② 植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報 のデータ登録項目追加
- ③ 成分分析データ情報(LCMS) のデータ登録項目追加
- ④ 生物活性情報 のデータ登録項目追加

（2）登録システムの機能拡張

昨年度、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が、今年度は以下のような機能拡張を行った。

新規：

- ① データ削除機能
- ② 登録ボタン二度押し防止機能
- ③ 生薬学術情報とモデル試料のTLC画像比較表示機能

改良：

- ① 一覧リスト表示項目の見直し
- ② エクセル一括登録機能
- ③ 個別登録・編集機能

各カテゴリー毎の編集機能について、項目追加等の改良を行った。

・LCMS情報登録画面で、UV関連データ(JCAMPファイル、JCAMP画像ファイル、測定波長(nm)、測定情報)を登録・編集できるようにした。

・MS情報の「JCAMP画像ファイル名」情報を登録・編集できるようにした。

・LC情報の「3Dデータファイル名」「3Dデータ画像ファイル名」情報を登録・編集できるようにした。

- ・MS情報登録の化合物情報登録必須制約を外した。
- ・遺伝子情報登録で、複数のアクセッション番号を入力し、その数に応じた遺伝子情報を新規登録する機能を作成した。
- ・遺伝子情報登録で、「領域名」を自由入力できるようにした。
- ・遺伝子情報を表示する箇所の表記を「生薬名(領域名、Accession No.、管理番号/学術名)」の形式に変更した。
- ・活性試験結果の「生理活性情報ファイル」情報を登録・編集できるようにした。
- ・効率的増殖法において、データベースのテーブルを二つに分割するため、登録処理についても対応した。
- ・さく葉標本情報の新規登録・編集が行えるようにした。
- ・植物体栽培登録で、「特性分類表－画像(PDF)ファイル」「栽培暦－画像(PDF)ファイル」情報を登録・編集できるようにした。
- ・植物体栽培登録で、「種子発芽情報」(種子100粒重、発芽温度、発芽試験方法、発芽条件、貯蔵条件、発芽率、5年生存率、採取条件、採取地、種子写真ファイル、導入番号、備考)を登録・編集できるようにした。
- ・任意個の複数データ登録を行う際に、ボタン押下によって入力フォームが自動追加される画面で、追加されたフォームが常に上部に表示されるように、並び順を降順にした。

(3) 公開システムの機能拡張

操作性を考慮したスタイルに刷新したほか、機能面についても様々な拡張を行った。

新規：

- ① 総合検索機能
- ② モデル試料検索機能
- ③ データ一覧機能
- ④ 生薬学術情報とモデル試料のTLC画像比較表示機能

改良：

- ① 各種一覧画面の表示項目の見直し

- ・全ての一覧画面から、内部コード表記を削除した。
- ・生薬一覧画面の遺伝子名の表示を件数のみに変更し、遺伝子情報一覧画面へのリンクを付与した。
- ② 各種詳細画面の表示項目の見直し
 - ・全ての詳細画面から、内部コード表記を削除した。
 - ・生薬詳細画面の遺伝子情報の表示を件数のみに変更し、遺伝子情報一覧画面へのリンクを付与した。
 - ・生薬詳細画面のNMR情報の表示を件数のみに変更し、NMR情報一覧画面へのリンクを付与した。
 - ・LCMS情報詳細に、「UV関連データ」(JCAMPファイル、JCAMP画像ファイル、測定波長(nm)、測定情報)、「MSのJCAMP画像」「3Dデータ(PDA)」データの表示を追加した。
 - ・生物活性情報詳細に、活性試験結果の「生理活性情報ファイル」情報の表示を追加した。
 - ・植物体栽培詳細に、「特性分類表－画像(PDF)ファイル」「栽培暦－画像(PDF)ファイル」「種子発芽情報」(種子100粒重、発芽温度、発芽試験方法、発芽条件、貯蔵条件、発芽率、5年生存率、採取条件、採取地、種子写真ファイル、導入番号、備考)の表示を追加した。
 - ・化合物情報詳細の「MS情報」ラベルを「LC(GCの場合はGC)MS情報」に変更した。
 - ・遺伝子情報を表示する箇所の表記を「生薬名(領域名、Accession、管理番号/学術名)」の形式に変更した。
 - ・モデル試料詳細の外形写真サムネイル横に、高解像度画像へのリンク(ファイルのサイズを明記)を追加した。
 - ・さく葉標本情報を表示する画面を追加した。
 - ・官能(色)データ表示画面において、 L^*a^*b 値をRGB変換した色を表示する機能を作成した。

【生薬の成分分析データの集積と成分データ