

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

生薬の熱水抽出エキスの生成量（g）を使用した生薬量（20 g）に換算した結果をとりまとめた。バクモンドウは非常にエキスの収量が高く、平均 12 g/生薬 20 g(約 60%)程度の収量があった。ビャクジュツも 5-12 g と収量が高かった。逆に昨年に引き続き抽出を行ったブクリョウは 1 g に全て満たずに極端に収量が低かった。

（２）成分データベースフォーマットの構築

今回指摘した不具合または要望は富士通九州システムズ側より以下のような回答を得た。

- (1) 英語版の入力ができない件は来期以降に見直しをすることとなった。
- (2) 新規の植物名として入力した場合、この生薬名と紐付できない件は、生薬名側から基原植物名を呼び出して登録することが可能である旨の説明がなされた。
- (3) 植物名、生薬名の検索画面におけるソート機能が必要な点については今年度中に対応することとなった。
- (4) 化合物検索の化合物表示における MS 情報のカラムに「保持時間」が表示される件は、「管理番号 (LCMS 情報の名称)」に表示を置き換えることとなった。
- (5) 生物活性の結果表示においては視覚的にわかりやすいようにグラフ表示する件については来期以降対応することとなった。
- (6) 味認識装置による測定結果を確認するために毎回ダウンロードをする設定になっている件は、今年度中に画像ファイルとして直感的に結果がわかるように表示することとなった。

（３）各種生薬の LC-MS 等の情報集積

1) ビャクジュツの LC-MS データ

収集されたモデル試料は中国産、北鮮産があるがそのTICにおいては浙江省産のみが異なるパターンを示し、それ以外はまったく同じパターンであった。

保持時間27.9～31.5分に同じ分子質量をもつ成分のピークが、正イオン検出では6本、負イオン検出では5本観測されるが、それら成分の正イオン検出によるマスペクトルでは、アンモニウム付加イオンが検出される。そのイオンからのプロダクトイオンスペクトルでは、全ての成分において類似のプロダクトイオンが確認でき、これら6ピークは、全て異性体の関係にあると考えられた。

23.4～24.4分には、整数分子質量594の成分が3ピーク観測される。これらの正のプロダクトイオンスペクトルにおいても、前述成分においても確認されているm/z 331イオンが観測されているため、これらは共通の骨格をもつ化合物であることが推測された。

2) チンピの LC-MS データ

市場流通品 18 種類（浙江省 7、陝西省 1、吉林省 1、湖北省 1、広東省新会 2、和歌山 4、愛媛 1、日本産地不明 1）が収集された。中国産のもの以外に日本産が 6 種類ある。それらの外観は中国広東省新会産がかなり黒くまた入手年度も古いものとなっている。これら収集したチンピのLCMSからは精油成分が失われておりフラボノイド類が主に検出された。主成分分析を行うと広東省新会産のみが全く異なるグループを形成した。TLCにおいても新会産は他とは違う成分パターンを示した。これらの主要フラボノイド類に関しては、実際に生薬チンピ（500 g）を用いて分離精製を行い、単離して構造を確定した。

検出されたフラボノイド類の含量を比較した場合、一例として浙江省産の中でもかなりの幅があることが判明した。新会産チンピは最も良質とされているが、他産地と比較して Nobiletin 含量が突出して多く、逆に Narirtin が少なかった。

3) シャゼンシの LC-MS データ

中国江西省が 5 種類、広西省が 1 種類、浙江省 1 種類の計 7 種類の市場流通品が有るが、それらの主成分分析では negative mode、

positive mode 両方において信頼性の低いデータとなった。これらの結果から、成分的な産地による差は少ないものと考えられた。

4) ボタンピの LC-MS データ

ボタンピは市場品において皮付きと皮去りがある。産地はほとんどが安徽省であり、浙江省、山東省がそれぞれ1種類ずつである。PCA においては明確なグループ分けはなされなかった。そこで皮付きと皮去りについて OPLS 判別分析を行なった結果、明確に判別することが可能であったが、これは皮の成分が判別することにほかならない。S-plot の検討においてはそれらのマーカーとなる成分が特定されたが positive mode と negative mode では異なる成分が特定された。positive では m/z 603 と比較的大きな分子量の成分がマーカー成分として推定された。

5) マオウの LC-MS データ

マオウは収集された市場品はすべて中国産であり、内9種類は内蒙古産、1種類は甘肅産、1種類が新疆産である。UV クロマトグラムにおいて、NIB-0034 (新疆産) と NIB-0210 (甘肅省産) の2エキ스는保持時間 17.4 分のピークが極端に大きく、その他のエキスと明らかに異なるクロマトグラムを示した。それらの主成分分析においては n=2 において明確なグループが形成されるもののほとんどが内蒙古産のものであることから信頼性はなく、今後他の産地の試料をさらに収集して再度検討を行う必要がある。

6) ブクリョウの LC-MS データ

エキス 9 試料の正負両イオン検出による LC-APCI-MS/MS のデータについて検討した。正イオン検出データにおける TIC クロマトグラムでは、バックグラウンドスペクトルの強度が高く、ピークは余り観測されなかった。正負両イオン検出とも、UV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラムでは、エキス (産地) による大きな違いは見られなかった。正イオン検出データ中、m/z 471 および m/z 469 は、

それぞれ Eburioic acid および Dehydro-eburicoic acid の $[M+H]^+$ に相当する。保持時間 35.34 分に正イオン検出で観測されている m/z 469 イオンは、スペクトル上に 18 Da 大きな m/z 487 イオンが観測されており、負イオンデータのほぼ同じ保持時間に m/z 485 イオンが観測されていることから、m/z 487 イオンの脱水ピークである可能性が高いと推測された。

7) カッコンの LC-MS データ

収集した市場品は25種類と多いが、ほとんどが中国産 (21種類) と韓国産 (4種類) である。Daidzin, Puerarin など質量 416 の化合物については、正イオン検出で m/z 417、負イオン検出で m/z 415 でトレースした抽出イオンクロマトグラム (XIC) において、m/z 417 の XIC で5本、m/z 415 の XIC では6本のピークが観測された。この Daidzin, や Puerarin およびそれらの異性体と考えられる複数の成分について、m/z 417 ($[M+H]^+$) イオンからのプロダクトイオンスペクトルでは二つのパターンがあり、16.23 分と 17.52 分のスペクトルでは、 $[M+H]^+$ からのグルコースの脱離に相当する m/z 255 イオンが顕著に観測されている。他の3成分のプロダクトイオンスペクトルについては、グルコース脱離に相当するイオンは観測されず、16.23 分と 17.52 分に観測されている m/z 417 イオンは、Daidzein の配糖体である Daizin およびその異性体 $[M+H]^+$ と推定される。

正イオン検出で m/z 579、負イオン検出で m/z 577 でトレースした XIC において、それぞれ7本のピークが観測され、Daidzin および Puerarin の $[M+H]^+$ (m/z 417) との質量差が 162 であることから、Daidzin および Puerarin の構造に対してグルコースが一つ付いた構造であると考えられた。

8) ダイオウの LC-MS データ

ダイオウの全イオンクロマトグラム (TIC) より日本薬局方で含量が規定される sennoside A は、保持時間 13.1 分付近に検出された。また、sennoside B は、12.2 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。

9) サイコの LC-MS データ

サイコの TIC より日本薬局方で含量が規定される saikosaponin a 及び saikosaponin d は、それぞれ保持時間21.1分付近及び24.2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) ソヨウの LC-MS データ

ソヨウの TIC よりソヨウの特徴的な成分である perillaldehyde は主ピークとしては検出されなかった。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

オウレンの全てのスペクトル形状は酷似しているが、9.4 ppm から 9.8 ppm の領域を拡大すると、一部のスペクトルが、その他のスペクトルと異なっていた。この2つの試料は共に日本産のオウレンであった。この領域以外にも産地を特徴づけるシグナルを同定するために AMIX ソフトウェアを用いて解析を行った。スコアプロットを確認すると、第1主成分を示す PC1 軸に日本産のスペクトルがクラスタリングされた。しかしながら 9.8 ppm 付近の日本産を特徴づけていると考えられたシグナルが、PC1 に寄与していることが確認できなかった。そこでローディングプロットのアウトライアーを確認すると、シグナルのケミカルシフトの違いによっていることが判明した。

カンゾウに関しては、UV 吸収が大きく、カンゾウの主成分である 823 m/z はグリチルリチン酸であることが推定された。832 m/z のチャートは、グリチルリチン酸に有する水酸基、及びカルボキシル基部の交換性水素核が重水素核に置き換わったことにより、質量数が上昇したと考えられた。Loop-storage 法と SPE 法でほぼ同様のスペクトルを得ることができた。4.2 ppm 付近は移動相由来の ^1H シグナルが大きく出ていたが、SPE 法において

は、トラップカラムを N_2 ガスにおいて 60 min 間乾燥させるので残存 ^1H がなくなり、埋もれていたシグナルが確認された。

(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、アラビアゴム、オウヒ、ガイヨウ、ケイガイ、コウイ、ゴマ、ゴミシ、サンザシ、サンシシ、サンシュユ、ジオウ、ゼンコ、センソ、センブリ、ソヨウ、ソウジュツ、ダイオウ、トウガラシ、トウヒ、ニクズク、ニンドウ、バクガ、ビャクジュツ、ブシ、ボタンピ、ユウタンについて画像データを集積した。

2) TLC プレートが R_f 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 R_f 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 R_f 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 社のプレートで R_f 値が大きい傾向にあった。しかし、ゼンコ (1) のプエラロプトリンやソウジュツのアトラクチロジンの場合は、Wako のプレートの方がやや小さい R_f 値を示した。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 R_f 値に大きな差が見られることが明らかになっているが、今回の検討でもクロロゲン酸を指標成

分とするニンドウの確認試験で差が見られた。

日本薬局方に規定されている TLC を用いた生薬の確認試験では、標準物質を同時に展開しない場合には、指標成分の R_f 値が規定されている。今回検討した生薬のうち、日局に R_f 値が規定されているオウヒ、ケイガイ、バクガ、ビャクジュツについて、日局に規定された R_f 値と実際に得られた値を比較すると、バクガを除き、日局に規定された値は Merck 社製プレートで得られた値とほぼ一致していた。バクガについては、Merck 社製プレートで 0.45 付近にスポットが見られたことから、日局記載の R_f 値 0.4 付近を 0.45 付近に変更する必要がある。

3) 展開距離と R_f 値の再現性に関する検討

既に報告しているものと同様、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かった。また、指標成分スポットの R_f 値を比較しても、展開距離の差による R_f 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間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、サンザシ、サンシュユ、センソ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。

(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 ビジューライザーを用いた。各生薬の結果を以下に記す。

シャクヤク: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。シャクヤクの国内市場品 15 試料に

ついて、紫外線 (254, 366 nm) 照射、次いで 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧後、加熱により検出した結果、すべての試料に標準品 *paconiflorin* の明瞭な紫色のスポットが確認された。

サイコ: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。サイコの国内市場品 10 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射、次いで 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧後、加熱により検出した。標準品として、*saikosaponin a*, *b*₂, *c* を同時に展開した。その結果、すべての試料に *saikosaponin a* の褐色のスポットが認められ、さらにすぐ上に近接した黄赤色のスポットを認めた。試料間の違いを観察すると、中国河北省産の試料は、 R_f 0.5 以上にみられる黄赤色の 2 スポットが他と比べ薄い傾向が認められた。

サンシシ: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。サンシシの国内市場品 11 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射、次いで 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧後、加熱により検出し、すべての試料に標準品 *geniposide* の暗紫色の明瞭なスポットが確認された。

ダイオウ: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。ダイオウの国内市場品 9 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射により検出した。その結果、すべての試料において標準品 *sennoside A* の赤色の蛍光スポットを確認した。各試料を比較すると、3~4 等級の試料のスポットが薄いことが観察された。

ソヨウ: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。局方ではジエチルエーテルで抽出することになっているが、今回メタノール抽出したものについても検討した。ソヨウの国内市場品 5 試料について、紫外線 (254, 366 nm)

照射、次いで4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液噴霧後、加熱処理により検出した。その結果、すべての試料において標準品 *perillaldehyde* の赤紫色のスポットを確認した。

トウキ:局方に TLC による確認試験法が収載されていないため、まず分析条件を検討した。その結果に基づき、トウキの国内市場品 12 試料について HPTLC 分析を行った結果、ヘキササン抽出物を *n*-ヘキササン/アセトン系溶媒で展開し、紫外線 (254, 366 nm) 照射、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。366 nm 照射下のスポットでは、*ligustilide* と一致するスポットが明瞭に観察された。

センキュウ:局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで、同属植物由来のトウキを参考に、検討を行った。国内市場品 9 試料を検討した結果、366 nm 照射下のスポットでは、*ligustilide* と一致するスポットが明瞭に観察された。トウキとの違いを見ると、366 nm 照射で *ligustilide* の下に共通に観察されたスポットがセンキュウでは観察されなかった。

ビャクジュツ:局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで、国内市場品 9 試料について、本研究班既報の方法に従って HPTLC 分析した結果、すべての試料に *atractylon* に相当する赤紫色のスポットが観察された。一方で、ソウジュツに特徴的な *atractylodin* に由来する灰緑色のスポットは観察されなかった。

シャゼンシ:局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで既報に従い、2 種類の溶媒系 (アセトン/酢酸エチル/水/酢酸、酢酸エチル/水/ギ酸) で展開し、*acteoside*, *geniposidic acid* のスポットを観察した。その結果、すべての試料に *acteoside*, *geniposidic acid* に相当するスポットが観察された。

マオウ:局方に TLC による確認試験法が収載

されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。マオウの国内市場品 11 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射、次いでニンヒドリンのエタノール溶液噴霧後、加熱処理により検出した。その結果、局方に記載されている赤紫色のスポットが、すべての試料に観察された。

ゴシツ:局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで既報に従い、国内市場品 7 試料について 2 種類の溶媒系 (酢酸エチル/水/ギ酸、1-プロパノール/酢酸エチル/水) で展開し、薄層クロマトグラフィー用ゴシツ標準品と比較した。その結果、標準品で観察される主スポットは、すべての試料に共通して観察された。

ジオウ:局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで本研究班既報の方法に従い、国内市場品 11 試料について HPTLC 分析した結果、熟ジオウに *fructose* に相当するスポットが認められ、その他の試料は別のスポットが観察された。一方で、主要成分とされる *catalpol* のスポットはほとんど観察されなかった。

ボタンピ:局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。ボタンピの国内市場品 20 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射、希硫酸試液噴霧後、加熱処理により検出し、すべての試料に標準品 *paeonol* の明瞭なスポットが確認された。

チンピ:局方のチンピの項目に TLC による確認試験法は収載されていないが、漢方処方エキスの確認試験にチンピの試験法が記載されている。そこで本方法に準拠して HPTLC 分析を行った。チンピの国内市場品 18 試料の HPTLC 結果は、紫外線 (254, 366 nm) 照射、2,6-ジブロモ-*N*-クロロ-1, 4-ベンゾキノンモノイミン試液噴霧後、アンモニアガス中放置により検出し、すべての試料に標準品 *hesperidine* の青い明瞭なスポットが確認され

た。

トウニン:局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。トウニンの国内市場品 15 試料の HPTLC 結果は、紫外線 (254 nm) 照射、チモール・硫酸・メタノール試液噴霧後、加熱により検出し、すべてに標準品 amygdalin の赤褐色の明瞭なスポットが確認された。

タクシャ:局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで既報に従い、国内市場品 28 試料について HPTLC 分析した。標準品として alisol A および B を用いた。その結果、大半の試料に alisol A, B のスポットが確認されたが、検出しないまたは検出の少ない試料もあり、ばらつきが認められた。

カッコン:局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。カッコンの国内市場品 25 試料の HPTLC 結果は、紫外線 (254, 365 nm) 照射、希硫酸試液噴霧後、加熱により検出し、すべてに標準品 puerarin の明瞭なスポットが確認された。

ゴシュユ:局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで分析条件を検討し、国内市場品 11 試料について HPTLC 分析した。標準品として evodiamine を用いた。結果、すべての試料に明瞭なスポットが認められ、分析可能であったが、一部試料にスポットの薄いものも確認された。

オウギ:局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。オウギの国内市場品 11 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射、希硫酸試液噴霧後、さらに紫外線 (366 nm) 照射により検出し、標準品 astragaloside IV のスポットを観察した。シンギ以外は、明瞭なスポットが認められた。

【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) センキュウ

9 市場品各 1 検体について、*trnK* 遺伝子の部分領域の塩基配列を解析し、これまでの当研究室の研究結果と比較した。9 市場品には 2 タイプの塩基配列が認められた。1 タイプ (タイプ I) は、当研究室が報告した *C. officinale* の配列と完全に一致した。その他の 1 タイプ (タイプ II) は、タイプ I の配列と 2 か所で塩基配列の違いがあり、ともに T と G の混合塩基 (K) が認められた。924 番目の塩基は Type I と同じ C であった。

9 市場品のうち、4 市場品はタイプ I の配列を示し、5 市場品はタイプ II の配列を示した。前者の原植物は *C. officinale* であると同定できた。

(2) ボタンビ

20 市場品のうち 15 市場品において、ITS 領域の塩基配列を決定できた。*P. suffruticosa* 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 221 bp であった。これまでに GenBank に報告されている塩基配列と比較した結果、全く一致するものはなく、すべての市場品に混合塩基が認められた。一方、民族薬物資料館保有の生薬標本 2 点のうち韓国産の標本は、GenBank 登録の FJ599760 の配列と相同の配列を示し、純系であった。残りの中国安徽省産の標本は今回の市場品と同様に混合塩基が認められた。ホモロジー検索 (BLAST 検索) を行った結果、15 市場品のうち 12 市場品は GenBank に登録された *P. suffruticosa* の ITS 領域の塩基配列と 99% 以上の相同性を示した。残りの 3 市場品は 97% の相同性であった。

(3) タクシャ

Li らの報告によれば、ITS 配列の上流から 37 番目及び 583 番目の塩基の差異により、*A. orientale* と *A. plantago-aquatica* は区別できる。*A. orientale* ではこれら 2 か所が Thymine (T) と Adenine (A) である (タイプ I) が、*A. plantago-aquatica* では Cytosine (C) と T

である（タイプ II）。GenBank に登録されている 2 種の ITS 配列を比較すると、両種ともに種内多型があることがうかがえるが、多数の登録は Li らの報告と一致する。

今回解析したタクシャ 28 市場品のうち 19 市場品について、ITS 領域の全領域または部分領域の塩基配列を解析できた。塩基配列には 2 タイプが認められ、2 市場品はタイプ I の配列、17 市場品はタイプ II の配列を示した。

Li らの報告を含め、GenBank の登録情報によれば、タイプ I の配列を示した江西省産の 2 市場品は *A. orientale* であり、一方タイプ II の配列を示した 17 市場品は *A. plantago-aquatica* であるという結果であった。後者には四川省産タクシャ 14 市場品も含まれる。

（4）ハンゲ

1) *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析

医薬基盤研究所より提供を受けた 21 検体の内、HaKw-9, -13 を除く 19 検体から PCR 産物が得られ、塩基配列解析が可能であった。本領域の全長は、全ての検体で 413 bp だった。内部配列は、HaKw-6, -7, -11 を除いて全て同一の配列を示した。HaKw-1, -6, -7 の配列を Blast search program による相同性検索に供したところ、HaKw-1 の配列は、*P. ternata* 及び *P. yaoluopingensis* の配列と完全に一致した。HaKw-6, -7 の配列も、上記 2 種の配列と最も高い相同性を示したが、その相同性は、98% だった。また、*Arisaema* 属植物各種との比較では、42 番目の塩基の挿入／欠失によって明確に区別された。

2) ITS1 領域の塩基配列解析

実験に用いた 21 検体の内、HaKw-8, -9, -13 を除く 18 検体で PCR 産物が得られ、塩基配列解析が可能だった。ITS1 領域の全長は、HaKw-14, -15 の 2 検体で 272 bp だった他は、全て 270 bp だった。また、その内部配列においても、HaKw-14, -15 が、他の検体とやや異なる配列を示した。この 2

検体は、いずれも北朝鮮産であった。一方、HaKw-3, -7 の配列は、複数の塩基が重なる箇所が、他の配列よりも多く見られ、この塩基の重なりは、HaKw-14, -15 を除く他の配列と HaKw-14, -15 の配列の雑種を想定することで説明がつくパターンを示していた。HaKw-1, -14, -15 の配列を *trnL-trnF* IGS 領域と同様に相同性検索に供したところ、HaKw-1 の配列は、*P. yaoluopingensis* の配列と完全に一致し、*P. ternata* の配列とは、96% の相同性であった。HaKw-14, -15 は、上記の配列と 96% 及び 94% (HaKw-14), 93% (HaKw-15) の相同性を示し、一致する配列は見られなかった。

（5）カッコン

1) ITS2 領域の塩基配列解析

医薬基盤研究所より提供を受けた 25 検体の内、PuKw-17, -18, -20, -21 を除く 21 検体で PCR 産物が得られ、塩基配列解析が可能だった。

ITS2 領域の全長は、全ての検体で 242 bp だった。内部配列中、変異が見られた箇所は、117 番目と 240 番目の 2 箇所のみであり、117 番目の塩基は、cytosine, guanine あるいは両塩基の混ざりだった。240 番目の塩基は、guanine, thymine あるいは両塩基の混ざりだった。国際塩基配列データベースに登録されている *P. lobata* の配列では、117 番目の塩基は、cytosine あるいは thymine であり、guanine のものは無かった。一方、240 番目の塩基については、guanine, thymine 双方の配列が既に INSD に登録されていた。

2) 5S rDNA の IGS 領域のジェノタイプピン

蛍光標識されていないプライマー対で行った PCR の電気泳動結果から、PuKw-20, -21 を除く 23 検体で PCR 産物が得られたことから、これらについて、ジェノタイプピン

解析した 23 検体からは、Sun らが、*P.*

montana 由来の配列として報告している genotype E を除く、全ての遺伝子型が見出され、その他に、未同定の genotype X が 3 検体で認められた。Genotype X については、今後、サブクローニングにより内部配列を決定する必要がある。Genotype A は、PuKw-5, -7, -9, -15 の 4 検体で検出され、そのいずれもが、微量の genotype D のピークを伴っていた。Genotype B は、最も多い 18 検体で検出され、この内、PuKw-2, -3, -10, -11, -14, -25 の 6 検体では、genotype B のみからなるホモ体、PuKw-4, -6, -12, -13, -16, -17, -19, -23 の 8 検体では、genotype B と genotype C からなるヘテロ体であった。Genotype C は、genotype B に次いで多い 11 検体で認められ、この内、PuKw-8, -24 の 2 検体が genotype C のみからなるホモ体であった。Genotype D は、韓国産の PuKw-22 の 1 検体で認められた他、上記の通り、genotype A が検出された 4 検体でマイナーピークとして検出された。

(6) ゴシツ

1) 葉緑体 DNA *rpl16-rpl14* 領域の増幅・解析

本領域は塩基長が503 bpと比較的長いため、DNAの品質の低い検体ではPCR増幅が不可能であったが、増幅されたものについては、すべてダイレクトシーケンシングにより解析が可能であった。その結果、モデル試料間での変異は認められず、AbとAf間で変異点はないこと、Aa(Vitenam)とAb/Af間で5ヶ所の変異点が存在することが明らかになった。モデル生薬はすべて、Ab/Afタイプと1塩基異なる(411A/C)変異を示し、この変異点についてはクローニング&シーケンシングで確認した。

2) 核リボソーマル DNA ITS 領域の増幅・解析

あらかじめ、クローニング&シーケンシングで確認したところ、1 検体から取得される

配列型は1種のみであり、ゴシツ、*Achyranthes* 属植物の遺伝子鑑別にはダイレクトシーケンスの手法が適用可能と判断された。

ITS 領域の全長は、約 700 bp と長いため、DNA の品質の低い検体では増幅できないものがあつた。それらについては ITS1 領域(約 330 bp) の増幅は可能であったため、ITS1 領域の塩基配列情報を解析した。

(7) ゴシユユ

データベース登録の ITS 領域の塩基配列を用い、系統樹を作製すると、*Euodia hortensis*、*E. hylandii*、*E. pubifolia* の 3 植物種由来の ITS 領域の塩基配列は、他の *Tetradium* 属植物由来の配列と比較し、変異が大きく系統樹解析では距離が大きく離れた。そこで、これら 3 種の植物種は除いて系統樹解析を行った。

その結果、ITS1 または ITS2 領域で、ゴシユユの基原植物である、*E. ruticarpa*、*E. officinalis*、*E. bodinieri* と、他の *Tetradium* 属植物とをそれらの入るクレードで識別可能であることが示唆された。

生薬ゴシユユの ITS 領域の遺伝子解析にダイレクトシーケンシング法が適用可能か検討するため、NIB423 について PCR 増幅のうち、シーケンシングベクターにクローニングし、クローン毎に塩基配列解析を行った。その結果、1 検体から複数タイプの塩基配列が得られたため、ダイレクトシーケンシングは適用できず、クローニング&シーケンシング法を適用することとした。

各検体について 5-13 クローンの塩基配列を解析したところ、各検体より 1-数タイプの配列が得られた。これらのうち各検体について代表的な 1 または 2 配列を選び ITS1-ITS2 領域、ITS1 領域、そして ITS2 領域についてそれぞれ、データベース登録配列とともに系統樹解析を行った。

その結果、モデル試料由来の ITS1-ITS2 領域、ITS1 領域、そして ITS2 領域の配列はいずれも *Tetradium ruticarpum* のクレードに入

り、他の非基原植物種とは別のクレードに分かれた。すなわち、モデル生薬はいずれも基原植物のバリエーションの範囲に入ることが確認された。

なお、モデル生薬とともに解析に供した種子島研究部で保存されている、ゴシュユ、ホンゴシュユ、コホクゴシュユよりクローニングした同領域の配列もすべてモデル植物と同じクレードに分類された。

(8) チンピ

チンピモデル生薬 ITS 領域の PCR 増幅及び塩基配列解析

1) PCR 増幅

DNeasy を用いて調製したゲノム DNA を鋳型とした場合、NIB253 では検体#1, #2 共に *rpl16-rpl14* 領域の増幅産物が得られなかった。そこで、genomic-tip 20/G を使用し、ゲノム調製を行ったところ、検体によっては PCR 増幅が可能であった。

2) 塩基配列解析

解析可能であった NIB399(#2), NIB665(#2) の ITS 領域の塩基配列は、NIB399(#2)由来の配列は#2-1 type, #2-2 type, #2-5 type の 3 type に分けられた。一方、NIB665(#2)由来の配列は#2-1 type の 1 種であった。

3) 系統樹解析

これらの塩基配列をツムラグループの登録した *Citrus* 属植物 ITS 領域の塩基配列と共に分子系統樹解析を行ったところ、NIB399 (#2-1)は *C. unshiu* 及び *C. kinokuni* が含まれるクレードに入ることが明らかになった。また、NIB399 (#2-3, #2-5)及び NIB665 (#2-1)は *C. hassaku* 及び *C. sinensis* と近縁のクレードに入ることが判明した。

以上の結果から、ITS 領域の塩基配列の多型によりチンピの基原植物鑑別を行うことは困難と結論された。

(9) キョウニン

全てのサンプルで、*rpl16* intron 部分領域の塩基配列の決定に成功した。PCR 増幅で

RPL16R-b を用いたサンプルで再試験した個体も合わせると、1 サンプルにつき調査した個体数は 1~3 個体となり、調査結果が同一の場合は、1 サンプルにつき 1 個体の結果のみを採用した。なお、NIB-0520 では 2 検体から結果が得られたが、互いに異なるジェノタイプが確認され、それぞれ *Prunus armeniaca* type1 と *P. sibirica* と相同のジェノタイプであった。つまり、1 サンプルの中に異なる基原種が混在していることを確認した。それぞれのサンプルについて、先行研究で報告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 2 系統に分けられ、それぞれ *P. armeniaca* と *P. sibirica* と鑑定された。なお、先行研究においては同領域においてホンアズ *Prunus armeniaca* とアズ *Prunus armeniaca* var. *ansu* の区別が出来ないことが報告されており、本研究でも *P. armeniaca* と鑑定されたサンプルの変種レベルの鑑定は出来ないと判断した。

(10) ボウイ

全てのサンプルで、核リボゾーム DNA 中の ITS 全領域またはその一部の塩基配列の決定に成功した。

得られた配列は先行研究で示された 5 つのジェノタイプのいずれかと同一もしくはほぼ同一であり、*M. dauricum* とは 18 サイトで区別された。また、粉防已の近縁種 *Stephania succifera* H. S. Lo & Y. Tsoong との間には、アライメントが不能な程大きな違いが見られた。従って、調査した 30 サンプルは全て *S. acutum* を基原植物とすると鑑定される。

ジェノタイプ J1 は 2 サンプル、J2 は 12 サンプル、C1 は 5 サンプルで見られた。J1 と J2 で差異のあるサイトにおいて 2 種類の塩基を併せ持つジェノタイプ J1+J2 が 10 サンプルで見られたが、同ジェノタイプは本研究で新たに見出されたものである。

先行研究では、日本と中国の *S. acutum* は互いに区別可能であることが示唆されたが、今回日本産からもジェノタイプ C1 が 3 サンプルで見出された。従って、両国の *S. acutum* は同領域では区別できない。

(1.1) バクモンドウ

1) 抽出 DNA の比較検討

新鮮葉および生薬から抽出した DNA をアガロース電気泳動に供し、質や量について比較検討した。その結果、No.8~27 の生薬サンプルについてはかなり抽出効率が低く断片化が進んでいることが明らかとなったが、後に示す通りこれら DNA を鋳型とした PCR は可能であった。

2) *rbcL* 領域を利用した PCR-RFLP 法の検討

PCR により増幅された *rbcL* 部分配列の大きさは、GenBank の配列情報から予測された大きさの 460bp にほぼ相同な大きさであった。制限酵素 *Hinc* II 処理を行った時、ジャノヒゲ属では DNA 断片は 460bp のままであったが、ヤブラン属では 1 カ所が切断されて、2 本の断片が見られた。*rbcL* 部分配列において 266 番目の塩基に変異があり、ジャノヒゲ属では G、ヤブラン属では T となっているため、*Hinc* II 処理によってヤブラン属の配列のみが切断を受け、266bp と 194bp の断片になったものと考えられた。この切断の有無は、新鮮葉と塊根のどちらにおいても観察された。したがって、塊根では葉緑体の存在量が葉に比べて少ないが、葉緑体 DNA の *rbcL* 部分配列を鑑別に利用することは可能であることが示された。

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

ジャノヒゲ属とヤブラン属のそれぞれの試料を粉末にしたものを混合した試料では、ジャノヒゲ属試料中のヤブラン属の割合が 1% の場合、ヤブラン属では切断されて表れる 2 本のバンド (266, 194bp) を検出することは困難であったが、同割合が 30% 以上の

場合は 2 本のバンドを検出することができた。またそれらはヤブラン属の混合割合が多くなるにつれ、よりはっきりと観察された。一方、10% 混合試料は、同じ実験条件下での検出は難しかったが、PCR のサイクル数を 50 回まで増やしたり、PCR の反応液量を 2 倍に増やして精製したりすることにより、バンドの検出が可能となった。このことから、本方法の検出限界は約 10% であるといえる。しかし、ヤブラン属の混合割合が 50% 以下の試料では、同じ混合試料を用いて繰り返し実験を行った場合、バンドが検出されにくい場合が認められた。

【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】

(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 コア生薬基原植物のうち、*Scutellaria baicalensis* (黄芩)、*Glycyrrhiza glabra* (甘草)、*Glycyrrhiza uralensis* (甘草)、*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 優先生薬基原植物のうち、*Alisma orientale* (沢瀉)、*Ophiopogon japonicas* (麦門冬)、*Uncaria rhynchophylla* (釣藤鉤・釣藤鉤)、*Polygala tenuifolia* (遠志)、*Prunus armeniaca*

(杏仁)、*Pueraria lobata* (葛根)、*Dioscorea japonica* (山薬)、*Dioscorea batatas* (山薬)、*Aconitum carmichaeli* (附子)、*Phellodendron amurense* (黄柏)、*Citrus unshiu* (陳皮)、*Magnolia obovata* (厚朴)、*Akebia quinata* (木通) 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。

さらに、第2優先生薬基原植物のうち、*Quercus acutissima* (樸櫨)、*Cannabis sativa* (麻子仁)、*Aralia cordata* (独活)、*Zizyphus jujuba* Miller var. *spinosa* Hu ex H.F.Chou (酸棗仁)、*Mentha arvensis* (薄荷)、*Gentiana scabra* (竜胆)、*Gentiana triflora* (竜胆)、*Gastrodia elata* (天麻)、*Saussurea lappa* (木香)、*Forsythia suspense* (連翹)、*Chrysanthemum morifolium* (菊花)、*Chrysanthemum indicum* (菊花) 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。

(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

第1コア生薬基原植物については、少なくとも1種について培養植物体までのオリジナルデータ取得が完了した。

第2コア生薬基原植物については、高等植物由来生薬14種のうち、10種の生薬の基原植物について、少なくとも1植物種の培養植物体までのオリジナルデータ取得が完了し、引き続き残りの植物及び第1優先、第2優先生薬基原植物についてのデータ取得を継続中である。

【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

試料の分解は、硝酸—塩酸を用いる分解法を用い、1次分解は120℃で30分間、2次分解は155℃で30分間とした。29元素を測定するための波長条件を決定した。黄芩、甘草および地黄の無機成分量を比較した結果、甘草においてホウ素の含量が多い傾向が認められた。

(2) 茶刈り機を用いたシソ収穫省力化の検討

手刈りによるシソの収穫と茶刈り機による収穫を比較すると、手刈りの0.04 m/秒に対して茶刈り機を用いる収穫の作業速度は0.22 m/秒であり、収穫の速度は5.5倍であった。茎葉重については両者で顕著な差が認められなかった。なお収穫物における異物(茎)の混入割合は45%であった。

(3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性(ORAC)について

今年度は、モデル生薬エキスでは生姜(ショウキョウ)、蒼朮(ソウジュツ)、人参(ニンジン)、植物体ではショウガについてORAC分析を行った。エキスについては、エキスを調製する際に供した生薬の重量および調製後のエキスの凍結乾燥品の重量を入手したので、生薬重量あたりと乾燥エキス重量あたりのORAC値を求めた。前年報告のオウゴン、カンゾウについても同様に各ORAC値求めた。乾燥エキス重量あたりのORAC値について降順にソートした。また、生薬重量あたりと乾燥エキス重量あたりのORAC値についてグラフに示した。薬用植物の各部位と対応する生薬エキスのORAC値を示し、また、薬用植物の各部位についてはグラフを作成し、薬用部を明記した。

【薬用植物の資源管理情報に関する研究】

1) 貯蔵開始時の発芽率

発根・出葉率が50%以上の植物は、エビスグサ、オオカラスウリ、シソ、トウガラシ、ハトムギ、ベニバナであった。5年間貯蔵した種子の発芽試験温度は、開始時の結果を基に、最も発芽率が良好であった温度を基本的に用いた。

2) 貯蔵5年後種子の発芽率

アカメガシワでは処理A、Bともにカビが多く発生し、ほとんど発芽しなかった。エビスグサでは貯蔵開始時よりやや低下したが、処

理A、Bともに高い発芽率を示し、さらに処理AがBよりやや高い傾向を示した。また、処理Bの出葉は処理Aより緩慢であったが、最終的な出葉率には差はみられなかった。オオカラスウリでは変温条件下で、開始時よりやや低下したが、処理A、Bともに高い発芽率を示した。コガネバナでは処理Bが開始時より高い発芽率を示したが、処理Aでは全く発芽しなかった。シソも同様に、処理Bが高い発芽率を示し、発芽温度20℃、15℃では開始時より高い発芽率を示した。一方、処理Aでは全く発芽しなかった。トウガラシでは処理A、Bともに発根率は高かったが、発根後カビが多く発生し、出葉率は低く、特に処理Bではほとんど出葉まで至らなかった。ハトムギでは処理A、Bともに発芽率は開始時より低下したが、処理Bが発芽温度25℃で高い発芽率を示した。ハブソウの発芽率は処理A、Bともに低かったが、処理Bでは開始時より高い値を示した。ベニバナでは処理A、Bともに開始時と同程度の発芽率を示した。ミシマサイコでは処理Bが開始時と同程度の発芽率を示したが、処理Aはほとんど発芽しなかった。メハジキでは処理Bが開始時と同程度の発芽率を示したが、処理Aは低率であった。

【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】

（1）オウギ

外観 NIBのサンプルでは輪切り、刻みがほとんどで、原体のものは黄耆1検体であった。HYCPのものはすべて原体のものである。原体のものについては、ほぼ円柱形で、長さ5～30cm、径0.5～2cmで、外面の色は淡灰黄褐色～淡黄褐色である。横切面のルーペ視では、最外層の周皮、淡黄白色の皮部、淡黄色の木部が観察され、形成層付近はやや褐色を帯びる。皮部の厚さは木部の径の約 $1/3 \sim 1/2$ となっている。横切面は、木部から皮部にわたって白色の放射状の模様（放射組織）

又は裂け目が認められる。

内部形態 横切片を鏡検すると、外側からコルク層、皮層、師部、木部が認められる。コルク層は5～20層で、直下にはやや厚壁化した細胞が見られる。師部には師部繊維束があり、放射方向に配列する。

師部と木部は形成層で区切られている。木部は、柔組織、道管、木部繊維からなる。道管は、ほとんどが階紋道管と網紋道管であるが、ごくまれにらせん紋道管も見られる。木部の中心部は、柔組織でほぼ満たされる場合と、道管と木部繊維が結集したものが中心まで分布しているものがある。柔細胞には単粒と複粒のでんぷん粒が含まれる。複粒は単粒の約2倍の大きさがあり、2～7粒でいろいろな形のものが認められる。

におい、味 黄耆特有の弱いにおいがあり味はあまい。

（2）ボタンビ

外観 牡丹皮は管状～半管状の皮片で、厚さ約0.5cm、長さ2～10cm、径0.8～1.5cmである。今回の観察対象にしなかったが、NIBのサンプルのなかにまれに刻み品がふくまれていた。

外面は暗褐色～帯紫褐色、皮去り品では淡灰褐色～類白色、横に長い小楕円形の側根の跡と縦じわがあり、内面は淡灰褐色～帯紫褐色を呈し、平らである。折面はきめが粗い。内面及び折面にはときに白色の結晶を付着する。

内部形態 牡丹皮の横切片を鏡検すると、外側からコルク層、皮層、師部が認められる。コルク層は7～30層であるが、サンプルによってはコルク層が除去されているものもある。柔細胞には単粒と複粒のでんぷん粒が含まれる。複粒は2～4粒のことが多い。またシュウ酸カルシウムの集晶も多く認められる。

芯（木部）の除去されていないサンプルでは、木部組織が木化しているのが観察される。におい、味 牡丹皮特異なにおいがあり、味

はわずかに辛くてにがい。

(3) タクシャ

外観 沢瀉は収穫の段階で外皮が剥がされており、未処理標本ではこの部分が褐変していたことから採集時にすでに壊死状態に近いと考えられる。また、葉跡および根跡が認められる。

内部形態 横切片を鏡検すると、最外層は外皮内側の皮層部柔細胞で占められている。未処理標本では、この皮層部に通気組織の構造が確認できる。皮層柔組織の再内側には内皮が1～2層あり、葉跡および根跡が認められる。内側の内皮から通気組織が発達するが、標本によっては発達しないものが認められた。維管束は不正中心柱を形成し、主として外木包围維管束が認められる。髄内維管束も多数認められ、しばしば横走する。内皮の内側の基本組織中には分泌道が発達し、横走することがある。でんぷんは単粒がほとんどであり、2～5粒からなる複粒がごく希に認められる。

におい、味 わずかににおいがあり、味はやや苦い。

(4) カッコン

外観 検討した葛根はすべて5～10 mm 角からなる六面体の片で、一部周皮を残すものが認められた。全ての生薬片で、爪で搔くとでんぷん粒が飛ぶ様が認められた。道管はとても大きく、肉眼でも識別可能で、ルーペ視ではさらに明瞭であった。

内部形態 葛根の横切片を鏡検すると、最外層はコルク層で、サンプルによってはコルク層が脱落している。道管径はとても大きく、最大500 μmに達する。結晶細胞列は局方に記される師部だけでなく、木部にも明瞭に認められる。繊維は師部繊維、木部線維とも束をなし著しく発達する。柔組織には多数のでんぷん粒が認められる。多面体のでんぷん粒のほか、いわゆる球形のでんぷん粒も認められる。複粒は2～3粒のもののほか、4～6粒のものも確認できた。少なからず認められ

た。

におい、味 においがなく、味はわずかに甘く、後にやや苦い。

(5) オウレン

外観 NIB のサンプルでは、ほとんど原形で刻みは1検体であった。原体のものについては、不整の円柱で、節があり湾曲していることがある。長さ2～8 cm、径0.2～6 cmで、それよりも太くて長いものも確認できる。折面は木部が黄色で、髄は黄褐色。日本産以外はやや赤みを帯びている。粉末にして色の比較をすると、明らかに日本産が区別できることが明らかとなった。

内部形態 横切片を鏡検すると、外側からコルク層、皮層、師部、木部が認められる。コルク細胞は薄壁で、コルク層に近い皮部中には石細胞群があり、師部には黄色の師部繊維が確認できる。放射組織は明らかで、大きな髄が認められる。

七飯町産のオウレン（キクバオウレン）では、皮部中には石細胞や師部繊維などの機械組織は確認できなかった。比較のため金沢市産のキクバオウレンの切片を観察したところ、こちらには、NIB のサンプル同様に機械組織が観察された。

におい、味 弱いにおいがあり、味はきわめて苦い。唾液を黄色く染める。

【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

未成熟 CD11c 陽性樹状細胞は LPS (0.1 μg/mL) 刺激により成熟化が誘導され、抗原提示に必要な共刺激分子である CD80, CD86 (共刺激分子) および MHC class II (主要組織適合遺伝子複合体 class II) を発現させた。LPS (0.5 μg/mL) 刺激によっても同様に成熟化が誘導され、抗原提示に必要な共刺激分子である CD80, CD86 分子および MHC class II を発現させた。そこで、これら細胞表面分子

の発現を指標として生薬エキスの効果の検討を行った。樹状細胞の成熟化は、0.1 $\mu\text{g/mL}$ および 0.5 $\mu\text{g/mL}$ LPS の濃度で行い、LPS 刺激により細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に対する割合として各生薬エキスの効果を解析した。

各生薬エキス標準品 (100 $\mu\text{g/mL}$) 処理により、LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激による樹状細胞の CD80, CD86, MHC class II の各細胞表面分子の発現増加は、生薬未処理群と同様の増加を示した。また、その増加率は、処理群と未処理群で差は確認されなかった。また、LPS (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 刺激による樹状細胞の各細胞表面分子の発現誘導に対しても、同様の検討を行った。その結果、各生薬エキス標準品 (100 $\mu\text{g/mL}$) 処理により LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激時に対する効果と同様に、明らかな効果は確認されず、各細胞表面分子の発現が誘導された。

さらに、これら生薬エキス標準品 (100 $\mu\text{g/mL}$) 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。

(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、30%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3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

A β (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。本アッセイでは、

30%以上の阻害活性を示すエキスを「Amyloid β 誘発神経細胞死を抑制する活性が認められる」と判断することとした。本年度検討した3種の生薬混合エキスのうち、Amyloid β 誘発神経細胞死を抑制したものはなかった。また、昨年度報告したように、サンシシは細胞死阻害活性を有意に示した。そこでサンシシの個別サンプルについて、活性を検討した。どのサンシシサンプルも細胞死抑制活性を示したが、特にNIB-081は活性が高く、NIB-192、NIB-193は比較的活性が弱かった。

3) Amyloid β 誘発の神経突起萎縮に対する抑制作用

A β (25-35)の3日間後に生薬混合エキスを処置し、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。A β (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。本アッセイでは、樹状突起および軸索の伸展活性がともに30%以上のものを「活性あり」と判断することとした。本年度の3種の生薬エキスのうち、樹状突起を30%以上伸展させたのはなかった。一方、軸索を30%以上伸展させたのは、センキュウ (1 $\mu\text{g/mL}$)、ソヨウ (10 $\mu\text{g/mL}$)、ブクリョウ (10 $\mu\text{g/mL}$) だった。

(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

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。3種類の生薬エキスを検討した結果、100 $\mu\text{g/mL}$ ではあまり顕著に阻害するものは認められなかったことから、各ロットの試験は実施しないこととした。

2) NF- κ B 活性化試験

HeLa- κ B6細胞をTNF- α で刺激することにより、発現するルシフェラーゼ活性が約2.5倍上昇した。この発現誘導に対する各標準ロットの効果を調べた。ソヨウは阻害効果を示さな

かった。一方、センキュウとブクリョウがTNF- α 刺激によるシフェラーゼ発現を50 % 弱抑制したことから、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を検討することにした。

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、3つの生薬エキスとも活性は認められなかったもので、各ロットの試験は実施しないこととした。

(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

18品目の国内市場品（サンシシ、マオウ、ケイヒ、シャゼンシ、センキュウ、ビャクジュツ、ブクリョウ、オウギ、チンピ、ボタンピ、カッコン、サイコ、ゴシツ、トウニン、ジオウ、ボウイ、サイシン、トウニン）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。その結果、ケイヒが最も強い活性を示し、ブクリョウ、カッコン、マオウにも強い活性が認められた。一方、シャゼンシ、ビャクジュツは活性が弱く、ジオウはほとんど活性を示さなかった。その他の生薬エキスは10%~20%程度の活性が認められた。また、NO産生抑制活性のロット差が大きい生薬としてマオウ、ケイヒ、センキュウ、オウギ、チンピ、ボタンピ、カッコン、サイコ、ゴシツ、ボウイ、トウニンが見出された。今回、トウニン及び平成23年度にNO産生抑制活性のロット差が大きかったオウゴン、ニンジンについて多変量解析を行ない、ロット差の要因になっている成分について探索した。

最初に、オウゴンについてSIMCAによる主成分分析（PCA）を行なった。PCAでは、最もロット数の多い河北省産オウゴンはグループ化せず、バラつきが大きいことが分かった。続いて、オウゴンの各ロットをNO産生抑制活

性の強いグループと弱いグループの2群に分け、判別分析（OPLS-DA）を試みた。t[1]軸を中心として活性の強いグループと弱いグループに分別され、Sプロットからは、オウゴノシド、オウゴニンと推定される成分が見出された。

次に、ニンジンのPCAを行なった。一部グループ化しているものの、最もロット数の多い吉林省産においてバラつきが大きいロットが存在することが判明した。つづいて、各ロットを湯通しと生干しグループの2群に分けてOPLS-DAを行なった。ニンジンは平均NO産生抑制活性が弱いものの、湯通しと生干しの間で、明確な活性の差が認められた。そのため、活性に基づいたOPLSを行なったところ、t[1]軸を中心に分けられた。Sプロットからは、2成分が見出され、湯通ししたロットに多く含まれる成分が、NO産生抑制活性にも関与していることが考えられた。これら成分について同定するため、湯通しされたロットから、マーカー成分の単離を試みた。本化合物は紅参からの単離報告があり、湯通しして熱を加えられることで生成され、さらに、NO産生抑制活性にも関与しているものと考えられた。

トウニンであるが、PCAの結果、産地別にグループすることはなかった。次に、NO産生抑制活性の強いロットと弱いロットによるOPLS-DAを行なった。グループは明確に分類された。Sプロットから、2群間の判別に大きく寄与する成分が見出された。入手年の新しいグループ（2010, 2011年入手）と古いグループ（2000, 2003年入手）によるOPLS-DAを試みたところ、両群は明確に分類され、Sプロットから両群の判別に大きく寄与している成分が見出された。マーカー成分について高分解能MSによる解析を行なったところ、マーカー成分はアミグダリンのアンモニウムイオン付加体 $[M+NH_4]^+$ であることが判明した。

これらの結果から、NO産生抑制のロット間

の差異に大きく寄与しているマーカー成分としてアミグダリンが同定された。また、アミグダリンは入手年の新しいロットに多く含まれることが示唆された。

【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、とくに b^* が特徴的であった。すなわちチンピは色が黄色いため、 b^* 値が概ね 25 以上となり、タクシャも 20 以上を示した。検討した資料の中では、バクモンドウが最も明るく、 L^* は概ね 80 以上であった。外見上白色に近いハンゲでは 80 以下の資料も認められた。

エタノール抽出液の透過光では、ゴシュユの L^* が 80 以下となり、他と明確に区別された。またチンピおよびゴシュユの b^* 値が概ね 60 以上であった。また、ハンゲおよびバクモンドウにおいて、 a^*b^* 値ともに 0 に近い数値を示した。

熱水抽出液の透過光においては、チンピおよびゴシュユの a^*b^* 値が他の生薬と違った数値を示した。

熱水抽出液に水酸化ナトリウム試薬添加後の透過光の色については、今回検討した生薬の中には顕著に変化するものは認められなかった。

熱水抽出液に塩化第二鉄試液試薬添加後の透過光の色については、ボタンピとゴシュユで大きな変化が認められ、一方、タクシャ、ハンゲ、オウギ、バクモンドウではほとんど変化が認められなかった。

熱水抽出液にヨウ素試薬添加後の透過光測定では、タクシャおよびハンゲで L^* 値が大きく変化し、澱粉含量が高いことが示された。一方、澱粉を含有するカッコンにおける L^* 値の変化は少なかった。また、オウギにおいて幅広い変化が認められ、澱粉含量に大きな

変異があることが明らかになった。

個々の生薬に関して、タクシャについては、粉末反射光および熱水抽出液透過光の色において、新しいもののほど a^* 値が小さく、 L^* 値が高くなる傾向が認められ、新旧の判断が可能であった。なお、エタノール抽出液ではこの傾向は認められなかった。

ハンゲについては、粉末反射光において、古いもののほど a^* および b^* の値が大きくなる傾向が認められた。ハンゲは陳旧品ほど良質とされるので、両数値によって、陳旧の判断が可能であることが明らかになった。さらに、 $L^*a^*b^*$ 全てにおいて、北朝鮮産が他の産地とは異なる数値を示し、区別可能であった。また、熱水抽出液の透過光においても同様の傾向が認められた。

（２）味認識装置を用いた生薬エキスの味覚評価

今回検討した5種類の生薬について、味センサでの測定においてサイコ及びシャゼンシは塩基性苦味後味において突出した値を示した。また、サンシシでは、サイコ及びシャゼンシのように他の味要素と比較して塩基性苦味後味の値が突出してはいなかったものの、塩基性苦味後味が強く検出された。

一方、センサでの測定においてゴシツでは塩基性苦味後味の他に酸性苦味、渋味及び塩味が強く検出され、特に、各味要素の中で塩味が強く検出されたのが特徴的であった。また、ダイオウについては酸性苦味と渋味が強く検出された他、試験溶液濃度を他の4生薬より低く設定したにもかかわらず各味要素で大きな値が検出された。

【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、2012年2月、No. 288で、大建中湯に因果関係が否定できない重大な副作用として間質性肺炎の報告がなされた。

医中誌では258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、33報を得た。同様に、PubMedでは13報を得て、同様の選抜方法により、3報を得た。以上の36報について内容を精査し、重複や総説論文を除いて18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。

2012年に副作用が報告された処方としては、多い順から、抑肝散3報、辛夷清肺湯3報、防風通聖散2報、芍薬甘草湯2報、辛夷清肺湯3報、加味逍遙散2報、大建中湯2報であった。過去の報告と合わせると、芍薬甘草湯が24報、小柴胡湯23報、柴苓湯13報、防風通聖散13報という順となった。

また、2012年に報告された副作用の内容としては、間質性肺炎7報、偽アルドステロン症3報、薬物性肝障害3報、特発性腸間膜静脈硬化症3報であった。

2012年に新たに報告された漢方薬の副作用は、山梔子含有処方による特発性腸間膜静脈硬化症25症例(Hiramatsu K, et al. Mesenteric phlebosclerosis associated with long-term oral intake of geniposide, an ingredient of herbal medicine. Aliment Pharmacol Ther 36:575-586, 2012) である。この論文では、これまで報告された症例を集めた総説となっており、2012年に報告された2例を含んだものとなっている。内容によると、25症例中、加味逍遙散12例の平均服用期間が13年、辛夷清肺湯5例13年、黄連解毒湯4例14年、茵陳蒿湯1例20年、加味帰脾湯1例19年、清上防風湯1例10年、五淋散1例服用不明と、どの処方もかなり長い。また、これら処方に共通している生薬はただ1つ山梔子があったことだけを根拠にして、特発性腸間膜静脈硬化症は山梔子の副作用であると断定し、さらに「山梔子はヨーロッパ

ではgeniposideと呼ばれている」というおかしな表現で、geniposideが原因成分だと断定しており、原因の考察については科学的な報告とはいいがたい。しかし、そのまま2012年8月2日のMedical Tribuneなどの医療系マスコミでセンセーショナルに公開され、漢方薬における新たな副作用として話題となってしまった。さらに2012年には、このレビューに含まれない症例が1例新たに報告された(処方是不明)。

【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牛膝、大黃、白朮、麻黄及び茯苓に関して、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表1に示した。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(相対標準偏差)を算出したところ、牛膝、大黃、白朮及び麻黄は10%前後に収まった。しかし、茯苓については変動係数が27.96を示し、大きなばらつきが観察された。

(2) 生姜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生姜生薬原料は、原形のものと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。9種類の生薬原料におけるエキス収率の変動係数は、34.4であつた。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10以下であり、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つた。

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】

本研究で構築する総合情報データベースは、多数の研究者が構築に関わる大規模データベースであるが、関係研究者各位の協力により、意見調整やとりまとめは比較的スムーズに行うことができ、とくに問題は生じなかった。システム開発技術面においても、実務を担当する富士通九州担当者の高度な技術力により大きな問題はなかった。

今年度のシステム運用上の主なトラブルは下記の2件であった。

データ登録システムの今年度開発項目をアップデートする作業の際に、公開用webサーバのハードディスクの破損が発見され、対応するためにデータ入力が行えない期間が生じた。登録済みデータ等についてはバックアップから復旧でき、データ消失等の問題は生じなかった。

また、LCのJCAMPデータの入力を集中して進めた結果、公開・登録用サーバのHDD容量が不足し、データ収納先を変更する作業のため、データ登録作業ができない期間が生じた。これはデータサイズの予測を誤ったためであり、公開用サーバの新設の際にはよりHDD容量の大きなサーバの設置が必要である。

【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】

今回作成した姉水抽出エキスについて、収量をグラフにした。その結果、ブクリョウはほとんど収量がなかったが、最初の抽出検討では粉末が水に混和しなかったためおそらくは疎水性成分が主であるためと考えられた。バクモンドウはすべてのロットにおいて収量が高かったが、これは糖質が多いためと考えられた。

今回富士通九州システムズに上げた要望はほとんどが反映されたか、今後の検討事項となった。かなり使い勝手の良い作りとなってきたことを実感する。

LC-MS分析については、ビャクジュツの特徴的成分でもある精油成分は熱水抽出エキスではAPCIにおいてもほとんど検出されなかったが、漢方薬の煎じ方法である熱水抽出でAtractysucroseがメインで検出されるという事実は今後のこれらの生物活性にからめ大変興味深い結果である。

チンピはいわゆる古いものほど良質とされる「六陳」のひとつに数えられており、一般にはこの新会産のチンピは良いものとして知られている。しかしながらチンピの特徴的な成分でもある精油成分は古くなると消失してしまう。新会産チンピは最も良質とされているが、他産地と比較してNobiletin含量が突出して多く、逆にNaritinが少なかった。遺伝子鑑定の結果を待たねばならないが、新会産は*Citrus leticulata*と考えられた。

シャゼンシはPCA解析の結果、産地によるグループ分けは困難であったが、このことは産地における成分的な差はあまりないものと理解される。

ボタンピは産地によるグループ分けはできなかったが、皮つきと皮去りについて明確な判別ができています。皮成分と思われるマーカーは確定できなかったが、今後LCMSMSにより決定する予定である。

ブクリョウエキスからは、多くのピークは検出されなかった。ブクリョウは抽出時に生薬を粉末にした場合完全に水と分離してしまい抽出ができなかったため、刻み状態で抽出した。従って、成分的にはほとんどが疎水性成分であると予想された。APCIによる測定でも検出される成分は極端にく、さらなる条件検討が必要と考えられた。

カッコンはDaidzin, Puerarinなどの異性体と考えられる同質量数の化合物が多く検出された。そのプロダクトイオンなどを詳細に検討した結果、それらの配糖体などと考えられた。

ダイオウに関しては、ピーク1は、 m/z 289

[M-H]⁻ を主とし、MS/MS は、 m/z 245 の脱炭酸ピークを主とするスペクトルが得られた。ピーク 1 は catechin と推定された。ピーク 2 は、 m/z 289 を主とした、ピーク 1 と類似したスペクトルを示し、さらに m/z 635 [M-H]⁻ が観測された。ピーク 2 は 1、2、6-trigalloylglucose と推定された。ピーク 3 は、 m/z 385 [M-H+CH₃CO₂H]⁻ を主とし、MS/MS は、ベースピークとして m/z 325 [M-H]⁻ のピークが観測されたほか、 m/z 163 の coumaric acid と推定されるピークが観測された。ピーク 3 は coumaroyl glucose と推定された。ピーク 4 は、 m/z 449 [M-H+CH₃CO₂H]⁻ を主とし、[M-H]⁻ m/z 389 のピーク等が観測された。 m/z 449 をプリカーサーイオンとした MS/MS は、CH₃CO₂H と C₆H₁₀O₅ (Glc) とが解離した m/z 227 のピークが観測された。ピーク 4 は resveratrol 4'-O- Glucoside と推定された。ピーク 5 は m/z 445 [M-H]⁻ を主とするスペクトルであった。MS/MS は C₆H₁₀O₅ (Glc) が脱離した m/z 283 のフラグメントピークが観測された。ピーク 5 は rhein-8-O- Glucoside と推定された。ピーク 6 は m/z 441 [M-H]⁻ を主とし、MS/MS は m/z 289 の C₇H₄O₄ の galloyl 基が脱離したと推定される catechin または epicatechin のピークを主とし、ピーク 6 は epicatechin gallate と推定された。ピーク 7 は m/z 477 [M-H]⁻ を主とし、MS/MS は galloylglucose の脱水ピーク m/z 313 を主とし、また、 m/z 169 の gallic acid のピークが観測された。ピーク 7 は lindleyin と推定された。ピーク 8 は m/z 541 [M-H]⁻ を主とし、MS/MS はピーク 7 と同様に galloylglucose の脱水ピーク m/z 313 を主とし、また、 m/z 169 の gallic acid のピークが観測された。ピーク 8 は resveratrol galloylglucose と推定された。ピーク 9 は [M-H]⁻ として m/z 407 が観測され、MS/MS は C₆H₁₀O₅ (Glc) が脱離した m/z 245 のフラグメントピークが観測された。ピーク 9 は trachrysone-8-O-glucoside と推定された。ピーク

10 は m/z 283 [M-H]⁻ を主とし、 m/z 567 の [2M-H]⁻ のピークも観測された。ピーク 10 は rhein 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、ダイオウ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。

サイコに関しては、ピーク 5 のポジティブモードでは、 m/z 1107 [M+H]⁺ を主とし、MS/MS は C₆H₁₂O₆ が脱離した m/z 927 および C₆H₁₀O₄ が脱離した m/z 781 等のピークが観測された。また、ネガティブモードでのピーク 5 は、 m/z 612 [M+2CH₃COO]²⁻ を主とし、 m/z 1165 [M+CH₃COO]⁻ が観測された。ピーク 5 は、saikosaponin V と推定された。ピーク 9 のポジティブモードでは、 m/z 927 [M+H]⁺ を主とし、MS/MS は C₁₈H₃₂O₁₅ 及び H₂O が脱離した m/z 421 等のピークが観測された。ネガティブモードでは、 m/z 985 [M+CH₃CO₂]⁻ を主としたものであった。ピーク 9 は、saikosaponin c または saikosaponin f と推定された。また、ピーク 10 は、ピーク 9 と同様のマススペクトルを示し、同様に推定された。その他、ピーク 6、ピーク 11、ピーク 12、及びピーク 14 は、ポジティブモードで m/z 781 [M+H]⁺ が、ネガティブモードで m/z 839 [M+CH₃COO]⁻ が観測され、saikosaponin a や saikosaponin d 等の化合物と考えられた。標品との比較から、ピーク 11 が saikosaponin a、ピーク 14 が saikosaponin d とそれぞれ同定された。ピーク 7 は、ネガティブモードでピーク 6 等の m/z 839 より [H₂O] 分大きい値の m/z 857 [M+CH₃COO]⁻ が観測され、saikosaponin a や saikosaponin d 等の化合物の hydroxyl 体、ピーク 13 は [CH₂CO] 分大きい値の m/z 881 [M+CH₃COO]⁻ が観測され、saikosaponin a や saikosaponin d 等の化合物の acetyl 体と推定された。また、ピーク 8 は、ポジティブモードで m/z 348 [M+NH₄]⁺ が、ネガティブモードで m/z 329 [M-H]⁻ が観測され、直鎖のトリオキ

シ脂肪酸と推定された。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、サイコ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。

ソヨウに関しては、ピーク 1 のポジティブモードでは、 m/z 639 $[M+H]^+$ を主とし、MS/MS は $C_6H_8O_6$ (GlcUA) が 2 つ脱離した m/z 287 の luteolin と推定されるフラグメントピークを主に $C_6H_8O_6$ (GlcUA) が 1 つ脱離した m/z 463 が観測され、ピーク 1 は luteolin の diglucuronide と推定された。ピーク 2 のポジティブモードでは、 m/z 623 $[M+H]^+$ を主とし、MS/MS は $C_6H_8O_6$ (GlcUA) が 2 つ脱離した m/z 271 の apigenin と推定されるフラグメントピークを主に $C_6H_8O_6$ (GlcUA) が 1 つ脱離した m/z 447 が観測され、ピーク 2 は apigenin の diglucuronide と推定された。ピーク 3 のポジティブモードでは、 m/z 463 $[M+H]^+$ を主とし、MS/MS は $C_6H_8O_6$ (GlcUA) が脱離した m/z 287 の luteolin と推定されるフラグメントピークが観測され、ピーク 3 は luteolin の glucuronide と推定された。ピーク 4 のポジティブモードでは、 $[M+H]^+$ m/z 361 や $[2M+H]^+$ m/z 721 が観察され、 m/z 361 をプレカーサーイオンとした MS/MS は m/z 163 の caffeic acid と推定されるフラグメントピークが観測され、ピーク 4 は rosmarinic acid 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、ソヨウ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。

オウレンの NMR シグナルから産地特定について試みた結果、日本産と中国産について、クラスタリングできることが判明した。9.8 ppm 付近のスペクトル変化が認識されやすい領域が産地を特徴づけているのではなく、中国産、日本産共にシグナルを生じているが、ケミカルシフトのすこしのずれが大きく寄与

していることが判明した。

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ることとした。

一般に薄層クロマトグラフィー法は、 R_f 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、 R_f 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、 R_f 値の再現性がかなり担保されていることが確認された。

これまでの本研究班での検討の結果、生薬の確認試験でしばしば用いられる 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液については、展開距離を 10 cm から 7 cm に変更しても、分離パターン並びに R_f 値に変化はなく、展開時間を半分近くまで短縮できることが明らかになっており、²⁾ この溶媒系については、生薬各条の規定が展開距離 7 cm に変更された。更に、今回検討した確認試験についても、現行が 10 cm 展開のものについては 7 cm 展開と比較したが、ほとんどの場合 R_f 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。従って、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と思われる。しかし、サンザシ、サンシュユ、センソでは、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。

今回、19 生薬の国内市場品における HPTLC