

201208013B

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22年度～24年度 総合研究報告書

(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. 総合研究報告書	
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	
川原 信夫 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表97
III. 研究成果の刊行物・別刷101

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

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た。

平成22年度は、現行の薬用植物データベース収載の情報を移行するとともに、成分分析データ情報及び日本薬局方情報について重点的にデータベース構築、データ登録を行い、総合情報データベースの骨格構築が完了した。また、コア生薬5品目（オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン）についてLC-MS情報、TLC写真、内部及び外部形態情報、遺伝子鑑別情報、植物組織培養物情報、植物体栽培情報、生物活性及び副作用情報、官能データ情報漢方処方関連情報並びに資源管理情報の集積を行った。さらに一部のデータについては、総合情報データベース本体に挿入し、公開へ向けた動作確認を行った。

平成23年度は、平成22年度に構築した総合データベースのパイロット版の運用を開始し、その評価並びに拠点研究者間での評価及び拠点研究者が担当する各情報パートのデータ項目の再確認作業について取りまとめを行った。総合データベースの植物・生薬基本情報、日本薬局方情報、成分情報、遺伝子情報各パートのデータ入力システムの設計・

構築並びにパイロット版の評価を行い、来年度中の一部公開を目指し上記コア生薬5種を中心とした各種データ入力を開始した。特に成分分析データについては質量分析データの閲覧・検索システムの開発が完了した。さらに英語版の閲覧・検索にも引き続き対応した。また、種子交換用情報管理システム、モデル試料管理システムを構築が完了し、内部情報管理の運用を開始した。一方、各種データ情報の収集に関して、収集を完了した次候補生薬15種の各種試験用エキスを作成するとともに、25種の候補生薬を選定し、試料の収集を行っている。さらに生物活性では、Calpain酵素活性に対する阻害作用、Amyloid β 誘発神経細胞死に対する阻害作用、NF- κ B活性化抑制試験等を実施している。引き続き、ITS領域を中心とした遺伝子鑑別情報解析、組織培養による増殖法、栽培の機械化、内部形態写真の撮影、色、味等の官能情報及び漢方処方エキスについても検討を行っている。

平成24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、各カテゴリー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。

本データベースは平成24年4月より一般公開を開始した。今後は引き続きデータの集積及び入力を継続し、掲載情報の質と量、両面の充実を図ると共に、新規カテゴリーの構築並びにカテゴリー横断的複合データの解析研究を行う予定である。

研究分担者	センター 室長
飯田 修	刈野 裕之
(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	(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究 センター 室長
柴田 敏郎 (平成22年度)	河野 徳昭
(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究 センター 北海道研究リーダー	(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
菱田 敦之 (平成23-24年度)	赤木 謙一
(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	(独)医薬基盤研究所共用機器実験室 研究員
吉松 嘉代	門田 重利 (平成22年度)
(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究	富山大学和漢医薬学総合研究所 所長

済木 育夫 (平成23-24年度)

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

藤田 愛

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター

蓮沼 タミ

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター

大谷 克城

旭川医科大学 講師

岩本嗣

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

水上 元

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

林 宏明

岩手医科大学薬学部 准教授

伊藤 美千穂

京都大学大学院薬学研究科 准教授

朱 妹

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

手塚 康弘

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

東田 千尋

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授

山本 武

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授

有田 正規

東京大学大学院理学系研究科 准教授

天倉 吉章

松山大学薬学部 教授

吉田 隆志

松山大学薬学部 教授

好村 守生

松山大学薬学部 助教

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
菊地 博之
国立医薬品食品衛生研究所食品部
研究員
石崎 昌洋
三和生薬株式会社
糸 博之
和光純薬株式会社試薬事業部
早川 昌子
和光純薬株式会社試薬事業部
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
玉木 智生
日本粉末薬品株式会社研究開発部
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
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。これらの漢方処方方は約100種の生薬より構成され、その殆どが日本薬局方収載生薬である。しかし原料生薬の約9割は中国等からの輸入に依存しており、特に近年、地球温暖化による生産地の砂漠化に加え、中国国内需要の増加により生薬の国内安定確保が厳しくなっている。本研究では、第一に薬用植物の総合的なデータベース

を構築することにより漢方薬の品質、有効性並びに安全性確保と国内における効率的増殖法の確立及びその情報公開による薬用植物栽培振興を通じた行政支援を行う。第二に漢方製剤原料となる貴重な遺伝資源の緊急的確保と維持を目的とした生物資源に関する研究支援、産業振興を行う。

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

センターでは、希少資源を数多く含むこれらの膨大な資産のより積極的な活用並びに高度利用化を進めるため、保有資源に情報を付加し活用する基盤整備の一手法として、第一期5カ年の中期目標のひとつに「薬用植物等の積極的な収集、保存、確実な情報整備及び行政的要請への正確な対応を行う」という目標を掲げ、これを実現するため、「センター保有の重要な薬用植物等100種につき、その特性、成分、生物活性等の情報をデータベース化し公開する」という中期計画を設定した。2005年より重要薬用植物約100種について、テキストデータ、写真データの収集ならびにデータベースシステムの構築を行い、2010年3月31日よりインターネット上で一般公開を開始した。本データベースには、重要な薬用植物及び生薬の基本情報に加え、栽培指針に記載された情報をベースとした栽培

法に関する情報、そして種子から植物の成長・収穫、生薬の調製に至る、のべ約1、300点の豊富な写真データが収載されている。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収載された、初のデータベースであり、公開開始から10カ月でのべ4、000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、におい、色）、3) 内部形態及びさく葉標本情報、4) 資源管理情報、5) 遺伝子の鑑別部位及び基原鑑別に関する情報、6) 植物組織培養物及び効率的増殖法に関する情報、7) 植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報、8) 生物活性及び副作用情報、9) 漢方処方関連情報（エキス情報、食薬区分情報）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）

（1）漢方薬に使用される薬用植物の総合デ

データベースの構築

現行データベースは、植物情報、生薬情報、植物特性、成育に関する特性、文献情報、写真ライブラリーから成る。薬用植物総合データベース（以下、総合データベース）の構築においては、現行のFilemakerで構築されたデータベースの構造を骨格とし、これに以下の大項目を加える。1) 成分分析データ情報

（TLC写真、HPLCチャート及び主要成分NMRデータ等）、2) 官能データ情報（味、におい、色）、3) 内部形態及びさく葉標本情報、4) 資源管理情報、5) 遺伝子の鑑別部位及び基原鑑別に関する情報、6) 植物組織培養物及び効率的増殖法に関する情報、7) 植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報、8) 生物活性及び副作用情報、9) 漢方処方関連情報（エキス情報、食薬区分情報）。

上記各大項目の担当者に必要と考えられるデータ項目の設定を依頼し、これをとりとまとめ、テーブルとテーブルの関連をあらわすER図(Entity Relationship Diagram) を作製し、これに基づいてデータベース構築を行った。

上記大項目のうち、成分分析データについては本データベースにおける最重要データと位置付け、TLCの写真、HPLCのチャート、NMRによる主要成分の構造情報や、質量分析データ(MS)の閲覧・検索システムを構築した。なお、食薬区分情報は薬用植物基本情報に、追加し、また、薬局方情報を生薬基本情報に追加することとした。また、総合データベースでは、既存の薬用植物データベースに含まれる生薬や植物の学術情報に加え、国内流通生薬のモデル試料の成分分析データ、遺伝子情報、官能データ、生物活性および副作用情報等を扱うため、これらを登録可能なシステムの設計を行った。

上記カテゴリのうち、成分分析データ、日本薬局方情報の確認試験法、定量法等の情報の閲覧・検索システムは平成22年度構築が完了した。平成23年度は、総合情報データベースの各種データを、各拠点研究者がインターネット経由でデータベースシステムへ格納または、更新するためのデータ登録システムの構築を行った。

各カテゴリの担当研究者にデータ項目の確認ならびに、英語版における英語表記の確認を要請し、それらを反映した、データ個別入力のためのデータフォーム、または、データ一括入力のためのテンプレートを設計し、データの新規登録システムを構築した。また、登録済みのデータを訂正、追加、更新するシステムを構築した。また、ネットワークブラウザを介して一般への公開を行うための公開システムの開発を行った。

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

平成24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。平成24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。

(2) 重点データ収集生薬の選定及び市場流通モデル生薬の収集

漢方処方へ配合される頻度の高い重要度の高い生薬[漢方製剤生産量(平成16年)の90%以上を占める漢方処方44処方に配合される重要生薬75種]を中心に重要生薬を選定し、国内の生薬取り扱い企業より市場流通品の提供を受け、モデル生薬とした。

総合データベースシステムに収載するデータを取得するため、これらのモデル生薬の各社からの提供情報、各研究拠点への払い出

し情報、モデル生薬より調製したエキスに関する在庫情報等の管理には、総合データベース構築に先駆けて、管理専用のシステムが必要であったため、平成22年度より管理システムの構築を開始した。平成23年度は引き続き構築を進め、構築を完了した。

(3) 薬用植物資源管理システムの構築

総合データベースの大項目「資源管理情報」については、①センターの保有する種子、植物体等の薬用植物資源全般の資源管理、②種子交換業務の管理、③総合データベースで使用する生薬モデル試料の管理、を行うための、センター内部での使用を主としたデータベース・在庫管理システムとして、薬用植物資源管理システム(以下、資源管理システム)の構築を行った。

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

本資源管理システムについては、総合データベースで使用する各社より提供を受けたモデル試料の効率的な管理のため、総合データベースシステムに先駆けて運用を開始する必要があったため、別途、開発を開始し、Access (Microsoft)で構築を行った。

(4) データベースシステム・セキュリティ

現行の薬用植物データベースに含まれる内容に加え、新たに成分分析データ、遺伝子情報、生物活性、官能データ等、幅広い情報を網羅した、高度なデータベースシステムに拡張していくこと、さらには、データ間の関連性保持や定期的なデータメンテナンスに

耐えうる持久性等を考慮し、MySQLリレーショナルデータベースでデータを管理する方針とした。

本データベースの構築は高度な専門性が要求されるため、開発は株式会社富士通九州システムズ(福岡県福岡市)に委託した。

平成22年度より運用を開始したデータベースシステムのシステム及びデータの保全のため、平成23年度よりデータベースのバックアップを開始した。

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

(1) 生薬の収集とエキスの作成(瀏野、菊地、大根谷、藤田、蓮沼)

生薬の関連業界の協力の元、現在日本の市場に流通している生薬を収集した。初年度はコア5品目として、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウゴンの5種類の市場品を収集した。また次年度以降に備え、それ以外の品目も可能な限り収集を行った。それらは基本的には産地が明確になっているものであり、企業側が今後さらに供給が可能であるものに限った。

収集した生薬のコア5品目に関しては成分分析用として一部を抽出しエキスを作成した。今回の目的は成分分析のみならず、その成分分析結果と薬効の関わりも検討する予定であることから、本来漢方薬の服用の基本である煎じ液に倣い、熱水抽出を行い、最終的には凍結乾燥を行って完全に水分を除去しエキスを作成することとした。

平成23年度は、45品目729種類の生薬が収集され、平成22年度のコア5生薬(ニンジン、オウゴン、ソウジュツ、ショウキョウ、カンゾウ)に引きつづき、15生薬152種類

(オウレン、ジオウ、シャクヤク、ケイヒ、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ) について、昨年度と同様に粉碎後に熱水抽出を2時間行い、凍結乾燥1週間により、最終的に熱水抽出エキス(いずれもアモルファス状)を得た。また関係拠点には、それぞれ担当の生薬、あるいは熱水抽出エキスの送付を行なった。

(2) 成分データベースフォーマットの構築(浏野)

データベースフレーム構築に関して、成分情報表示の概要を検討し、最もユーザーが利用したい成分情報にアクセスしやすいフォーマットを検討した。

平成23年度は、データベースの入力フォーマットについて検討した。平成22年度、その表示フォーマットのフレームは決定しているが、それらの入力作業の過程でいくつもの問題点が浮かび上がってきた。それらの対応について検討を行った。

平成24年度は、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、門田、済木、赤木、西川、鎌倉、高橋、大根谷、田中)

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

(4) 近赤外スペクトル情報の集積(門田、手塚)

オウゴン、ソウジュツ、カンゾウ、ショウキョウ、ニンジンについて4000-10000 cm^{-1} 領域での近赤外スペクトルを分解能8 cm^{-1} で測定した。測定は拡散反射モードで行い、密封されたバイアル瓶をそのまま装置にセットし、底面に光を当てて反射された光を検出した。各検体につき、16スキャンで5回繰返し測定を行い、5回の平均スペクトルを検体の代表スペクトルとした。

次に、測定した反射スペクトルの比較を行った。比較に際して、ピークの特徴を強調するために2次微分処理を反射スペクトルに適用し、さらに、粒子径の違いによる反射率への影響を抑制するために、SNV正規化処理を適用した。処理を施したスペクトルをもとに、生薬の種類による違いのあるスペクトル領域を確認した。また、違いのある領域に対して主成分分析を行い、主成分空間上での生薬の種類による違いを確認した。

(5) TLC 写真情報の集積(木内、川原、合田、石崎、糸、早川、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プレートを扱い、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、現在10 cmと規定されているTLCの展開距離について、これを7 cmに変更した試験も

並行して行い、Rf値並びに分離パターンに差があるかを検討した。また、クロマトグラムの色の再現性を確保するために、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同一画面に入れて画像データを取り込んだ。

(6) HPTLC による国内流通生薬の成分比較 (澁野、天倉、好村、吉田、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〔ソウジュツ (8 試料)、カンゾウ (16 試料)、ショウキョウ (10 試料)、ニンジン (16 試料)、オウレン (10 試料)、ケイヒ (17 試料)、オウゴン (15 試料)、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 ビジュアライザーを使用した。

検出は紫外線 (UV) 照射 (254, 366 nm)、塩化鉄 (III)・メタノール試液噴霧、希硫酸試液後加熱、バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後加熱、2,4-ジニトロフェニルヒドラ

ジン試液噴霧、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧のいずれかにより行った。

標準品の baicalin は局方生薬試験用、baicalein は生薬試験用を使用した。その他の試薬は全て特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

TLC の試料溶液注入には、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 ビジュアライザーを使用した。

HPLC は Shimadzu Prominence システムを使用した。

2) TLC 条件

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

(7) 各種測定データの掲載方法の検討 (門田、有田)

情報基盤としてウィキを用いたデータベースを設計した。更に初期情報として、26 種の生薬の①市場流通品と現状、②生産加工状況、③理化学的品質評価、④内部形態・鏡検の情報および約 1600 枚のデジタル写真を生薬関連会社より提供して頂き、それらの掲載方法を検討した。同時に、富山大学で計測した LS-MS クロマトグラムのデータ化及び掲載方法を検討した。

【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) ニンジン (小松、朱)

1) 実験材料

ニンジン 16 市場品を試料とした。全形生薬については 1 検体、刻み生薬については 2 検体を解析した。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、約 90 mg を steel beads (数粒) と共に 2 mL チューブに入れ、 -80°C で 2 時間冷凍した。TissueLyser (Qiagen) 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 (Qiagen, Germany) を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 3 μL を取り、1 %アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、PCR 法で核 DNA の 18S rRNA 遺伝子の部分領域及び葉緑体 DNA の *trnK* 遺伝子のイントロン部分領域を増幅した。*trnK* イントロン領域においては、一度に増幅することが困難のため、3 分割して増幅した。

(2) シャクヤク (小松、朱)

1) 実験材料

シャクヤク 15 市場品を試料とした。さらに、中国内蒙古自治区またはモンゴル国で採集した野生の *Paeonia lactiflora* 3 検体、日本富山県で栽培される *P. lactiflora* の薬用品種「梵天」1 検体及び中国四川省で採集した *P. veitchii* 1 検体を基原種同定用の比較材料として用いた。

2) 実験方法

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

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

(3) ダイオウ (小松、朱)

1) 実験材料

ダイオウ 9 市場品を試料とした。

2) 実験方法

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

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

(4) マオウ (小松、朱)

1) 実験材料

マオウ 11 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、約 90 mg を steel beads (数粒) と共に 2 mL チューブに入れ、 -80°C で 2 時間冷凍した。TissueLyser で

30/sec, 2 分間振動させ、試料を粉末にした。Steel beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 3 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 *trnK* 遺伝子のイントロン領域の 5'側の前半部分を増幅した。

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

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) ショウキョウ (合田、丸山)

1) 実験材料

ショウキョウ 16 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、その 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて粉碎した。このものに、SNET buffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 200 μ g/mL Proteinase K) 400 μ L を加え、55°C, 18 時間インキュベーションし、genomic DNA を抽出した。インキュベーション終了後、95°C, 10 分加温し、Proteinase K を失活させた後、20000 x G, 1 分間遠心し、上清 100 μ L を分取し、DNA 試料液とした。このものを鋳型とし、植物の核 ribosomal DNA (核 rDNA) 遺伝子あるいは葉緑体 DNA *trnL-F* 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 internal transcribed spacer (ITS) 領域あるいは、葉緑体 DNA *trnL-F* 領域を含む DNA 断片を増幅した。

(9) トウキ (合田、丸山)

1) 実験材料

トウキ 12 市場品を試料とした。

2) 実験方法

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

(10) サンシシ (合田、丸山)

1) 実験材料

サンシシ 12 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料をナイフで削り、果皮部 5 mg を液体窒素下、MM-300 を用いて粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit を用いて genomic DNA を抽出、精製した。試料は、刻み生薬であった San-4, 7 を除き、単一個体を用いた。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA あるいは葉緑体 DNA の *trnL-F* 遺伝子に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする核 rDNA ITS2 領域あるいは *trnL-F* IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、Nova Taq DNA polymerase-Ampdirect plus の

系を用い、どちらの領域も nested PCR 法を使用した。得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

(1 1) 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。

(1 2) 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。

(1 3) オウゴン (河野)

1) 実験材料

本研究に使用された試料は、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一部である。

上記試料に加え、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部で維持・保存されているコガネバナの圃場栽培植物体及び無菌培養物を新鮮葉からのゲノム DNA 調製試料とした。

2) 実験方法

1. コガネバナ新鮮葉からのゲノム DNA 調製

コガネバナ新鮮葉からのゲノム DNA の調製には DNeasy Plant Mini Kit を使用した。新鮮葉約 100 mg を、2 mL 容アシストチューブに径 4.8 mm ステンレスボール 2 個及びキットの AP1 バッファー 500 μ L を入れ、破砕機 MS-100 で 4,500 rpm、1 分間、2 回粉碎を行い、以後キットのプロトコールに従い調製を行った。

2. 生薬オウゴンからのゲノム DNA 調製

市場流通品モデル試料については、‘刻み’または‘小刻’のものは刻み生薬片、2 片約 50 mg を 1 つの試料とし、これを 2 つ個別に調製し試料 #1, #2 とした。‘原形’のものは 2 片を選び、それぞれに #1, #2 とナンバリングし、それぞれから約 50 mg を清拭した剪定鋏で採取

し、試料#1, #2とした。

生薬試料は個別に直径4.8 mmのステンレスボールと共に2 mLスクリュウ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(TOMY)にセットし3,000 rpmで1分間破碎した。破碎粉末に1 mLのDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 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。最終的にゲノムDNAは50 mLのAEバッファーで溶出し、その1 mLをPCRに使用した。

3. 核rDNA ITS領域の解析

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部において圃場栽培されている系統または無菌培養物として維持されている系統について、核rDNA ITS領域の解析を行った。

得られたPCR産物は、アガロース電気泳動で増幅産物を確認したのち、予想サイズである約0.74 kbpの増幅産物をクローニング&シーケンシングに供した。塩基配列解析は各試料8クローンについて行った。

4. 塩基配列解析 (クローニング&シーケンシング)

PCR反応液をエタノール沈殿し、全量をアガロースゲル電気泳動に供し、切り出した目的のバンドを含むゲルよりPCR産物をSuprec-02を用い精製した。シーケンシングベクターにはEcoRV消化したpT7Blueベクターを用い、精製PCR産物をFast Link DNA Ligation Kitでライゲーションを行い、DH5α z-competent cellsに導入した。コロニーとして単離したクローンを液体培養し、Illustra Plasmid Prep Kitを用いプラスミドDNAを調製した。調製したプラスミドDNAについて制限酵素処理により目的PCR産物の挿入を

確認した後、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, BigDye Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kitを用いて塩基配列を解析した。

5. 葉緑体*rpl16-rpl14*領域の解析 (クローニング&シーケンシング)

葉緑体*rpl16-rpl14*領域についてオウゴンモデル試料について塩基配列情報の取得を行った。はじめに、本領域が基原植物種の同定に適しているか判断するため、試料番号NIB-073及び174の2試料について、クローニング&シーケンシングの手法で塩基配列情報の収集を行った。

6. *Rpl16-rpl14*領域塩基配列情報のモデル生薬からの取得

生薬オウゴンモデル試料由来のゲノムDNAを鋳型とし*rpl16-rpl14*の増幅を行った。得られた増幅産物をアガロース電気泳動で解析し、単一バンドであることを確認し、ダイレクトシーケンシングに供した。

7. ダイレクトシーケンシング

PCR産物よりNucleoSpin IIを用いプライマーを除去し、最終的に溶出バッファー15 mLまたは50 mLで溶出し、その5 mLをシーケンシング反応に供した。シーケンシング反応は、プライマーにPCR増幅に使用したA及びB-primerを用い、BigDye Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kitで両鎖について行った。塩基配列解析にはABI PRISM 3100-Avant DNA sequencer、80 cm キャピラリー、POP-4 ポリマーを用い、データ解析はDNASIS-Mac v3. 7 Finch TVで行った。

(14) オウレン (河野)

1) 実験材料

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

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

2) 実験方法

1. 生薬オウレンからのゲノム DNA 調製

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

2. 植物体または培養物からのゲノムDNA調製

植物体の葉または、不定胚培養物の約100 mgを試料とし、500 mLのDNeasy Plant Mini Kit AP1バッファーおよび直径4.8 mmのステンレスボール2個と共に2 mLスクリュウキャップチューブに入れ、破碎した。破碎液に2 mLのRNaseを加え、以後、キットのプロトコールに準拠しゲノムDNA調製を行った。

3. ITS1領域の塩基配列情報の取得

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

した。

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

4. ダイレクトシーケンシング

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

(15) 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。剪定鋏で削りとった生薬片約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スクリュウ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、キットのプロトコールに準拠しゲノム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スクリュウ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、キットのプロトコールに準拠しゲノム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* DH5 α 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。

(16) 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

シユユ-6、同コホクゴシユユ-4、同コホクゴシユユ-5、同ゴシユユ-1、同ゴシユユ-2。

2) 実験方法

1. 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。

(17) 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。

(18) カンゾウ (林)

1) 実験材料

カンゾウ 16 市場品を試料とした。このうち、10 市場品が原形、6 市場品が刻み生薬であった。

2) 実験方法

原形生薬の一部または刻み生薬 1 個体を乳鉢と乳棒により粉末化した。刻み生薬からなる市場品のうち、特に刻みが小さかったものについては、刻み 1 個体を粉末化したものと、刻み 10 個体を混合して粉末化したものの 2 つの試料を準備した。

DNA の抽出 : DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA の抽出を行った。

核 rDNA ITS 領域の PCR 法による増幅 : 以下の 2 種類のプライマーを用いて PCR を行い、ITS 領域の部分配列を増幅した。

5'-GCA ATG CTC ACG GGA AGC CAA CA-3'

5'-GCC ACG CAC TGT GTT CTC TCC T-3'

PCR 反応には、Anti-Taq High と Taq DNA polymerase を用いて行った。増幅した PCR 産物は ExoSAP It によりプライマーの除去

を行った。

遺伝子配列の決定 : ExoSAP It 処理した PCR 産物を鋳型として、BigDye terminator v3.1 Kit と 3130xl Genetic Analyzers を用いて塩基配列を決定した。なお、配列決定には PCR に用いたプライマーを使用した。

(19) ソウジュツ (水上)

1) 実験材料

ソウジュツ 8 市場品を試料とした。

2) 実験方法

朮類生薬に関しては、核ゲノム中に存在する ribosomal DNA 遺伝子の ITS 領域を鑑別指標とする基原種同定法がすでに確立されている。本研究ではこの方法を用いて同定した。

DNA の調製 : ソウジュツからの DNA の調製には SNET buffer を用いた。

1. PCR-RFLP 法による鑑別

ソウジュツの粉末約 20 mg から SNET buffer 400 ml を用いて調製した DNA 溶液のうち 1 ml を用いて、ITS 領域の内部に存在する約 140 bp の DNA 断片を増幅した。増幅産物を含む PCR 反応液に制限酵素 *Fau* I または *Msp* I を加えて、それぞれ 55°C 及び 37°C で 2 時間インキュベートして、反応産物を 4% アガロースゲルによる電気泳動によって分析した。

2. 直接シーケンスによる鑑別

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

(20) ジオウ (水上)

1) 実験材料

ジオウ 11 市場品を試料とした。また、カ