

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

## 2) 実験方法

### 1. DNA の調製

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

### 2. 直接シーケンスによる鑑別

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

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

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

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

### 4. ジオウの *trnK* 領域の塩基配列の解読

ジオウの DNA 調製液の 1 mL を用いて、*trnK* 領域内の 2 つの鑑別サイトを含むそれぞれ約 150 bp の領域を増幅し、PCR 反応液

を exonuclease と alkali phosphatase 混合液で処理後、シーケンス反応を行った。

## (2 1) シャゼンシ、ビャクジュツ (水上)

### 1) 実験材料

シャゼンシ 7 市場品及びビャクジュツ 4 市場品を試料とした。

### 2) 実験方法

#### 1. DNA の調製

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

#### 2. 直接シーケンスによる鑑別

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

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

## (2 2) ケイヒ (伊藤)

### 1) 実験材料

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

### 2) 実験方法

#### 1. DNA 抽出方法の検討

各試料をはさみで細かく裁断し、さらに粉砕器を用いて粉末状にした。このケイヒ粉末試料と *Cinnamomum* 属植物新鮮葉を材料とし、DNeasy Plant Mini Kit, GMquicker 2, Isoplant, Blood & Cell Culture Mini Kit をそれぞれ用いて DNA を抽出し、アガロースゲル

電気泳動に供し、比較した。また、DNA が抽出できていることが確認できた場合には、その抽出 DNA を鋳型として PCR を行い、生成物についてアガロースゲル電気泳動により比較した。

## 2. 塩基配列の比較

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

## 3. PCR-RFLP 法の検討

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

### (23) 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ー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  $\mu$ L と RNaseA 4  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L とエタノール 450  $\mu$ L を加え転倒混和。
- (8) DNeasy column に 650  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L のうち 10  $\mu$ L を non-digest 対照試料として取り分けておき、残り 20  $\mu$ L を NucleoSpin<sup>®</sup> 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  $\mu$ L、*Hinc* II 2.5 U とし、全量が 11.5  $\mu$ 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。

### (24) サイコ (山路)

#### 1) 実験材料

サイコ 10 市場品を試料とした。

#### 2) 実験方法

##### 1. DNA の抽出

生薬粉末約 500  $\mu$ g から DNeasy<sup>®</sup> Plant

Mini Kit を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は AE Buffer 200  $\mu$ L に溶解した。PCR 増幅がみられなかったサンプルは、抽出した DNA を QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit を用いて精製してから再度 PCR 増幅を試みた。

## 2. PCR

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

## 3. 精製

反応液は E-Gel<sup>®</sup> 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<sup>™</sup> 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<sup>®</sup> 3500xL Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。シーケンスの際には PCR に用いたプライマーを使用し、両端より forward、reverse 両方を読んで配列を決定した。ダイレクトシーケンスのクロマトグラフィーに観察された塩基の重なりは IUPAC (IUB) コードに従って表記した。

### (25) 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  $\mu$ g を切り出して DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit を用いてそのプロトコールに従って DNA を抽出した。抽出した DNA は AE Buffer 200  $\mu$ L に溶解した。なお、DNeasy<sup>®</sup> 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、プロトコールに従って行った。

## 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 C A T C C A G C T C C -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。

### (26) 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、プロトコールに従って行った。

##### 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。

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

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

### (2) 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献調査

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

### (3) オリジナルデータ取得のための、植物組織培養物の育成

データベースオリジナルデータ取得用の

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

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

### 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

供試材料：植物体の分析ではトウキ、ホッカイトウキおよびセンキュウの葉、茎および根を材料とした。生薬の分析ではデータベース研究で収集されたモデル生薬の黄芩（15系統）、甘草（16系統）、地黄（11系統）を材料とした。

試料溶液の調製：植物体の試料は、硬質ガラス管を用い硝酸-過酸化水素水混液により分解、調製した。生薬の試料はテフロン製分解チューブを用い硝酸-塩酸混液による分解、調製した。窒素含量はケルダール法で測定した。

測定：iCAP-6300 DUO を使用し、植物体は14元素、29元素を一斉分析した。

### 2) 薬用植物の省力化、機械化栽培に関する研究

#### (1) センキュウ種芋定植機の検討

ポット育成野菜苗の定植機（MCT-2型、サークル機工）を用いて、圃場へのセンキュウ種芋の定植を行い、定植された種芋の植え付け方向と深さを調査した。

#### (2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

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

比較し、萌芽率、1年生株の収量調査を行った。

### (3) 茶刈り機を用いたシソ収穫省力化の検討

シソ葉の収穫方法について、茶葉の収穫で使用される茶刈り機を用いる方法と手刈りによる収穫方法を行い、収穫時間、収穫物の異物の混入率を調査した。

### 3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性（ORAC）について

薬用植物、生薬の抗酸化活性を調べるために、寒冷地で栽培できる薬用植物についてカンゾウ、ホソバオケラ等18種の葉、茎および根等の各部位、モデル生薬の黄芩（14系統）、甘草（16系統）、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。

【薬用植物総合情報データベースに使用される薬用植物の資源管理情報に関する研究】（飯田、杉村、渕野、熊谷）

#### 1) 材料および試験方法

トウキ (*Angelica acutiloba*) 種子は富山県薬用植物指導センターで、他の11種類の種子（アカメガシワ、エビスグサ、オオカラスウリ、コガネバナ、シソ、トウガラシ（タカノツメ）、ハトムギ、ハブソウ、ベニバナ、ミシマサイコ、メハジキ）は種子島研究部で平成18年（2006年）にそれぞれ採取した。

トウキ種子はラミジップアルミチャック袋に種子とエージェレス（3g）およびシリカゲル（6g）を入れ、他の11種は種子とエージェレス（3g）又はエージェレス+シリカゲル（6g）を入れ、それぞれ袋内を脱気後封印し、トウキ種子は5℃、-1℃、-20℃で、他の11種は

5°Cで貯蔵した。トウキ種子は2007年1月、他の11種の種子は3月から貯蔵を行い、5年後の発芽試験はトウキが2012年1月に、他の11種は11月から順次行った。

## 2) 発芽条件

### (1) 発芽試験

蓋付きスチロール角形ケース (152×72×25 mm) に置床。3反復。

### (2) 発芽温度

貯蔵開始時の発芽試験において、高い発芽率を示した温度で実施した。

### (3) 照明条件

明暗各12時間

### (4) 発芽チャンバー

トウキ種子はTD-28CCFL-3LDを、他の11種の恒温条件はMTI-201、変温条件はMTI-204を用いた

### (5) 発芽の確認

発根時および子葉の展開時(出葉)の2段階で確認し、発根および出葉が完了するまで調査を行った。

### (6) 種子の水分含量の測定

電子式水分計(MOC-120H)を用いて測定した。

【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)

カンゾウ、ニンジン、ソウジュツ、ショウキョウ、オウゴンの5品目について、市場流通している生薬を入手した。まず、原形生薬について糸鋸を用いて幅1cm程度を切断し、その切断面をデジタルマイクロスコープVHX1000により、観察、撮影を行った。その後、切断した塊を1昼夜蒸留水に浸した後、再び断面の撮影を行った。今回は細

胞内容物の確認を行うことを目的としたので、蒸留水に浸した塊について凍結マイクロームを用いて厚さ約20~30µmの切片とし、脱色、染色を行わずにそのままプレパラートを作成した。また、カンゾウ、オウゴンについては横切と縦切の切片プレパラートを作成した。

さらにカンゾウ、ニンジン、ソウジュツ、ショウキョウ、オウゴンの5品目の市場流通生薬について、鋸、剪定ばさみを用いて小片とし、さらに鉄製の乳鉢を使用して粉末とした。今回、篩い分けは行わず、十分に粉末となったと判断したところで、スライドガラス上にマイクロスパーテル約1/3程度の粉末をとり、グリセリン水を1滴加えた。数分間放置し十分なじんだところで、有柄針を用いて攪拌し、カバーガラスをかけ観察用プレパラートとした。粉末の観察に際しては、今回調査した文献情報に加えて、中華人民共和国薬典中薬材外形組織粉末図解、同中薬粉末顕微鑑定彩色図集を鑑別の指標として観察した。また、日本薬局方の生薬の性状に記載される用語のうち、結晶細胞列、でんぷん粒に着目し、それらが記載されている生薬についても同様の方法で粉末とし、観察用プレパラートを作成した。日本薬局方一般試験法生薬試験法〈5.01〉の鏡検に従って光学顕微鏡にて観察を行い、写真撮影にはデジタルマイクロスコープVHX1000を用いた。

なお、元名城大学生薬学教室久田陽一先生のご協力により、参考資料として生薬切片の顕微鏡写真を使用させて頂いた。

さらに独) 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  $\mu\text{m}$  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。

また、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）薬物代謝酵素シトクローム P450 3A4 及び 2D6 に対する阻害活性（門田、手塚）

#### 1) 実験材料

本研究に使用した生薬は（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内のオウゴン 16 検体、ソウジュツ 9 検体、カンゾウ 17 検体、ショウキョウ 10 検体、ニンジン 17 検体である。

#### 2) 実験方法

CYP3A4およびCYP2D6活性は、7-benzyl-oxy-trifluoromethylcoumarin (CYP3A4) 及び 3-[2-(*N,N*-diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (CYP2D6) を基質として用い、NADPH産生系存在下で recombinant CYP3A4又はCYP2D6との反応で生成する生成物の蛍光を測定することで求めた。反応系に生薬エキスを加え、各CYPに対する生薬エキスの阻害活性を調べた。活性の強さは、50%阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で示した。なお、CYP3A4阻害に対するポジティブコントロールとしてketokonazole ( $\text{IC}_{50}$  13.6  $\mu\text{M}$ ) を、CYP2D6阻害に対するポジティブコントロールとしてquinidine ( $\text{IC}_{50}$  9.5

$\mu\text{M}$ ) を用いた。

（２）樹状細胞に対する生薬エキスの効果（済木、山本）

#### 1) 実験材料

本研究に使用された 20 種の生薬エキス試料（オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、ジオウ、ケイヒ、オウレン、トウキ、シャクヤク、サイコ、マオウ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、サンシシ、シャゼンシ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ）は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料のなかから提供された。本研究では、これら生薬エキスの各ロットを等量混合した生薬エキス標準品を調製し、この生薬エキス標準品を用いて生物活性を測定し、生物活性が検出された生薬エキスについて、個々の生薬エキスのロットを用い生物活性の測定を行った。

#### 2) 実験方法

雄5-12週令のBALB/cマウスの両足の大腿骨と頸骨より骨髓細胞をクリーンベンチ内で無菌的に採取した。この骨髓細胞を培養し、未成熟樹状細胞を採取した。未成熟樹状細胞を96well plateに播種し、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ もしくは0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

### (3) 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

オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、シャゼンシ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウの20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 µg/ml, 10 µg/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 – 1µM) 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、 $0.5 \times 10^5$  cells / wellになるよう播種した。37°C, 10% CO<sub>2</sub>, 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 Aβ (25-35)及び生薬エキス(1 µg/mL, 10 µg/mL)を同時処置し、2日後にcell viabilityを測定した。Cell viabilityは、Aβ (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 Aβ (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  $\mu$ Lずつ加え、90分間室温で静置し、細胞を固定した。その後、全量100  $\mu$ Lの1次抗体溶液を加え、4°Cで一晩反応させた。1次抗体には、マウス抗リン酸化型NF-Hモノクローナル抗体

(1:500)、ラビット抗MAP2ポリクローナル抗体(1:500)を用いた。翌日、1次抗体溶液を除き、全量100  $\mu$ Lの2次抗体溶液を加え、遮光下の室温で2時間反応させた。反応後、2次抗体溶液を除き、PBSで5分間、2回洗浄し、Aqua Poly Mountで封入した。蛍光顕微鏡を用いて、各薬物処置を施したwellから648  $\mu$ m  $\times$  860  $\mu$ mで10枚の画像をデジタル画像撮影装置DP70を用いて取得した。それらの画像について、画像解析ソフトNeurocyte Image Analyzer ver.1.5を用いて、画面全体のpNF-H陽性、MAP2陽性の神経突起の長さを測定した。また、各画面中のMAP2陽性の神経細胞体の数を測定し、画面全体の軸索あるいは樹状突起の長さを神経細胞体の数で割ることにより、神経細胞当たりの長さを算出した。

#### (4) 3種のヒトがん細胞株の増殖に対する各生薬エキスの効果(門田、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。

検討した生薬は、以下の20種である。オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、

ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、シャゼンシ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ。

##### 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- $\kappa$ B結合配列を4つタンデムに持つレポータープラスミドを安定発現するHeLa- $\kappa$ B6細胞を用い、親株のHeLa細胞と同様の方法で培養した。

###### 2. がん細胞増殖試験

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

###### 3. NF- $\kappa$ B 活性化試験

HeLa- $\kappa$ B6細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に最終濃度100 mg/mLで生薬エキスを添加した。その30分後にTNF- $\alpha$ 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- $\kappa$ B6細胞を96ウェルプレートに播種し、翌日に最終濃度100 mg/mLで生薬エキスを添加した。その30分後にTNF- $\alpha$ 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。

#### (5) 一酸化窒素(NO)産生抑制活性に対

## する生薬エキスの効果(瀧野、大根谷、高橋、藤田、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 mg/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*<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine acetate (100 mM) 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、CM-3500dを用い、標準光をD65とし、測定値を $L^*a^*b^*$  (エルスター、エースター、ビースター) 表色系で表現した。なお、 $L^*$ は明度を表し、0-100の数値で表現される。彩度の $a^*$ は+側が赤味、-側が緑味を、 $b^*$ は+側が青味、-側が黄味をそれぞれ表し、それぞれ絶対値が大きいほど色が濃いことを示す。生薬はミキサーで粉砕し、すべてを150  $\mu$ mの篩を通した。粉末色は専用セルに入れて反射光を測定した。次いで、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の透明ガラスセルに入れて測定した。次いで、100倍量の熱水で抽出して同様に透過光を測定し、さら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、10倍希釈ヨウ素試液などを加えた後の透過光の色を測定した。

### (2) 味認識装置を用いた生薬エキスの味覚評価 (川原、安食)

#### 1) 実験材料

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。平成 22 年度は、コア 5 品目として収集された生薬のうち、オウゴン (15 検体)、カンゾウ (16 検体)、ショウキョウ (10 検体)、ソウジュツ (8 検体)、ニンジン (16 検体) について検討した。平成 23 年度は、オウレン (10 検体)、ケイヒ (17 検体)、ジオウ (11 検体)、シャクヤク (15 検体)、トウキ (12 検体) の 5 品目について検討した。さらに平成 24 年度は、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) の 5 品目について検討した。

## 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

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

## 4) 測定方法

味認識装置を用いて味の測定を行った。塩化カリウム (10 mM) と酒石酸 (0.1 mM) を溶解した水溶液を出力値コントロールとした。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。なお、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)

薬用植物、生薬、漢方薬に関する生物活性ならびに副作用情報については、数多くの文献が出版されているが、すべての情報を網羅するにはあまりにも膨大になるため、実際に医療現場で利用・応用できるものを取捨選択する必要があると考えられる。

そこで、「臨床に応用出来る生物活性」では、ヒトを利用した臨床試験については、症例数が 9 例以下のものは採用せず、10 例以上のもののみを採用した。また、ランダム化比較試験による二重盲検と、プラセボを用いていないものとを区別して記述した。動物実験においては、動物に経口的にそれらを投与したことによって得られた活性のみをまとめた。

「禁忌」、「副作用」、「好ましくない薬物相互作用」については、安全性の観点から科学的なエビデンスとは言えない古典に記載されている事項、理論的に予想される事項についても引用文献で示せる限りは採用した。

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

【漢方処方構成生薬の水煎出エキス収量に

関する研究】（合田、袴塚）

### 1) 実験材料

局方生薬のエキス収量測定においては、黄芩、甘草、生姜、蒼朮、人参、黄連、桂皮、地黄、芍薬、当帰、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、黄芩、甘草及び生姜に関して、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用いた。煎出用の水は、超純水を用いた。

### 2) 機器

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

### 3) 局方生薬煎出エキスの調製と収量測定

黄芩、甘草、生姜、蒼朮あるいは人参について、刻み生薬 20 gをポットに取り、400 mLの水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を3000 rpmで5分間遠心し、上澄液をナス型フラスコに入れ、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

黄芩の生薬原料サンプルについて、原形のものハサミで5~10mmに切り刻んだ。刻んだサンプルをVibrating Sample Millで粉碎した。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3000 rpmで5分間遠心し、上澄液をナス型フラスコに入れ、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）重点データ収集生薬の選定

漢方処方へ配合される頻度の高い重要度の高い生薬を中心に、計75品目を重要生薬として選定した。このうち平成22年度は、とくに重要度が高いと考えられる重点品目として、最優先データ収集品目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）、優先データ収集品目15品目（オウレン、ゴシツ、ビャクジュツ、ブクリョウ、マオウ、ダイオウ、シャクヤク、トウキ、センキュウ、サイコ、ケイヒ、サンシシ、ジオウ、ソヨウ）の合計20品目を選定した。

上記の重点品目について、国内製薬企業より市場流通品の提供を受け、モデル生薬として資源管理システムのモデル試料管理システムに順次登録を行った。

### （2）総合データベースの設計及び構築

現行の薬用植物データベースよりデータを移行する、薬用植物基本情報、形態的特徴、生態的特徴、成育特性、生薬基本情報、写真ライブラリー、文献情報の各大項目については、現行データベースより移植が完了した。

新規に追加する、1) 成分分析データ情報、2) 官能データ情報、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) 漢方処方関連情報の各大項目については、各

項目の担当者によりデータ項目の設定がほぼ完了した。

また、モデル試料の実測データを登録する項目についても設計が完了した。

平成23年度はとくに、成分分析データ情報について重点的にシステム構築を行い、TLC写真、HPLC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・検索システム構築が完了した。また、重要生薬20種について、日本薬局方情報の確認試験法、定量法に関する情報の登録が完了した。

平成23年度は、研究分担者が各拠点からインターネット経由でデータ登録を行うための登録システムを開発した。システムは一般ユーザー用と管理者用の機能を区別し、管理者はユーザー管理やデータの公開権限の変更等が行えるようにした。また、公開システムとは異なり、カテゴリごとにデータを入力する分担研究者が異なるため、できる限り、カテゴリごとに表示を区別するようなシステム画面構成にした。また、本データベースシステムでは、登録されるデータは、各拠点研究者の未公開データも含まれる。そこで、全てのデータについて個別に「公開」、「医薬基盤研内公開」、「非公開」の設定が行えるシステムとなっている。「医薬基盤研内公開」または、「非公開」と設定したデータについては、公開システムでは表示されない。

### (3) 資源管理システムの構築

資源管理システムについては、Accessベースのシステム構築がほぼ完了し、現行の資源導入管理(種子交換業務)システム及びモデル試料管理システムからのデータの移行を開始した。バーコードによる資源管理に向けた設備の整備についてもあわせて進めた。

### (4) 薬用植物データベースシステム(公開

### システム)の機能拡張

平成24年度末に計画しているインターネット上での一般公開のために、トップページから日本語版、英語版の切り替えが行えるようにした。また、今後、増加していくデータの中から、ユーザーが目的のデータに効率よく辿りつけるよう、検索機能を強化した。とくに、化合物の構造式検索においては、構造式描画ソフトChemDrawで作成した構造式をCopy & Pasteで貼り付け、検索できるように改善した。

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

### (5) 資源管理システム及びモデル試料管理システムの構築

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

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

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

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

### (6) データベースシステムの運用

本システムで採用しているリレーショナ

ルデータベース(MySQL)のバックアップを開始した。これは、FireWallの中に配置されているデータベースサーバに外付けディスクを取り付け、定期的にデータベースのバックアップを行うものである。

#### (7) データベースシステムの改修

平成24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(LCMC) 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

#### (8) 登録システムの機能拡張

平成23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、平成24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。

#### (9) 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、「特性分類表一画像(PDF)ファイル」「栽培暦一画像(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ベースフォーマットの構築に関する研究】

#### (1) 生薬の収集とエキスの作成

生薬に関しては、日本漢方製剤協会、日本生薬連合、東京生薬協会の協力が得られ、系12社の生薬関連メーカーより市場流通品の提供を受けた。収集した生薬は今年度重点的に行うことを班会議で決定したコア5品目(オウゴン、カンゾウ、ニンジン、ショウキョウ、ソウジュツ)については、オウゴン15種類、カンゾウ16種類、ニンジン16種類、ショウキョウ10種類、ソウジュツ8種類であった。これらコア生薬を中心にLC-MSの検討を行った。

コア5品目の熱水抽出を行った結果、ショウキョウ、ニンジンに関しては、遠心分離を行ってろ液を分離した。ショウキョウは特に収量が悪かった。明らかに生薬に水を強く取り込んでおり、そのため、ショウキョウについては粉碎をして粉末にするよりは粗粉碎により収量を増加させることが可能であると考えられた。ろ過後あるいは遠心分離後のろ液については凍結乾燥を行ったが、約1週間で完全に乾燥した。

平成 23 年度は、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）であり、これらの生薬を中心に LC-MS の検討を行った。

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

平成 24 年度は、生薬の熱水抽出エキスの生成量 (g) を使用した生薬量 (20g) 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大きく、平均 12g/生薬 20g(約 60%)程度の収量があった。ビャクジュツも 5-12g 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 1g 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

本データベースにおいては成分情報の部分が重要な内容となってくるため、いかに利用者の至便を考慮したフレームにするかが肝要である。そのために化合物の検索機能のほか、NMR や MS スペクトルでの検索も可能なようにスペクトル検索機能を持たせる

ことが必要である。MS 情報に関しては既存のデータベース構築システムである MassBank を利用することとし、MassBank には含まれない部分である LC-MS での LC 情報を新たに構築することとした。LC-MS 情報では LC チャート上でのピークに番号を付し、そのピークの帰属を記載し、その化合物名またはピーク番号から MS チャートにリンクするような相関図を作成した。また、本データベースにおいては最も重点的な内容となる基原、産地別のバラエティ比較を表示するため、TLC、HPLC などのデータを産地や基原からリンクできるように設定した。さらに日本薬局方情報として、確認試験法、定量法などのデータを各業界団体より収集し、本データベースに収めることとした。

平成 23 年度から化合物データの入力作業を開始したが、その入力フォーマット上でいくつか問題が生じた。

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

平成24年度では、運用により見出された不具合または要望に対し、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平成 24 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、平成 24 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) オウゴンの LC-MS データ

オウゴン試料 (管理番号 NIB-001、中国河北省産、栽培品) 254 nm の波長でモニターした UV クロマトグラム、Total Ion Current (TIC) クロマトグラム及び観測された各種成分の抽出イオンクロマトグラム、マススペクトル、プロダクトイオンスペクトルを取得した。殆どの成分において、正負両イオン極性で、対応するマススペクトルが観測された。

強度の大きな成分だけで 19 確認され、ピーク No. 5, 7, 17 は、標準品とクロマトグラムの保持時間を比較することによって、それぞれ Baicalin, Baicalein, Wogonin と同定することができた。各マススペクトルにおいて、正イオン検出では相当する化合物のプロトン化分子 ( $[M+H]^+$ ) が観測され、負イオン

検出では脱プロトン化分子 ( $[M-H]^-$ ) が観測された。

#### 2) オウゴンの多変量解析

オウゴンの熱水抽出エキスの LC-MS 分析結果を用いて Marker View を用いた多変量解析を行った。その結果、産地別には分類が困難であった。

#### 3) ソウジュツの LC-MS データ

保持時間 3 分以降の成分では負イオン検出で 21 成分、正イオン検出で 7 成分が観測された。正負で対応するマススペクトルが得られた成分は見られなかった。ソウジュツ含有成分に関する資料に掲載されている化合物について、プロトン付加及びプロトン脱離に相当する  $m/z$  値で抽出イオンクロマトグラムを作成し、その有無を確認した。

正イオン検出データにおいて、18 分に溶出している成分は、プロトン付加で  $m/z$  235 にイオンが観察されていると考えられる。これは質量として、11-Hydroxy-4(15), 7-eudesmadien-9-one に相当する。また、19.79 分と 20.59 分には、 $m/z$  237 にプロトン付加分子に相当すると考えられる成分が観察されている。これらは質量として、11-Abeo-1-patchoulene-4, 7-diol および 4(15), 7-Eudesmadiene-9, 11-diol に相当する。負イオン検出データにおいて、ボイドボリュームにオリゴ糖由来と推定されるマススペクトルが観察された。8 分には、3, 4, 10, 11, 14-Guaiane pentol の  $[M-H]^-$  に相当する  $m/z$  447 のピークが観察された。

#### 4) ショウキョウの LC-MS データ

検討用試料として NIB-60 (中国雲南省産) を用いた。保持時間 3 分以降で顕著な強度で TIC 上にピークが観察された成分に No. を付し、マススペクトル、抽出イオンクロマトグ

ラムを作成した。負イオン検出で 20 成分、正イオン検出で 13 成分が観測された。正負で対応するマススペクトルが得られた成分は数成分であった。

日本漢方生薬製剤協会のホームページに記載されていた含有成分の有無を確認し、以下は整数質量のレベルで一致した。

1. 負イオン検出データにおいて、[6]-Gingerol の[M-H]<sup>-</sup>に相当する  $m/z$  293 イオンが、25.6 分に観測された。

2. 負イオン検出データにおいて、[8]-Gingerol の[M-H]<sup>-</sup>に相当する  $m/z$  321 イオンが、30.5 分に観測された。

3. 負イオン検出データにおいて、Hexahydrocurcumin の[M-H]<sup>-</sup>に相当する  $m/z$  373 イオンが、19.6 分に観測された。

4. 正イオン検出データにおいて、[6]-Shogaol の[M+H]<sup>+</sup>に相当する  $m/z$  277 イオンが、25.6 分に観測された。

その他、負イオン検出データにおいて、質量的には[6]-Gingerol の還元体の[M-H]<sup>-</sup>に相当する  $m/z$  295 イオンが、23.8 分および 24.7 分に観測された。

#### 5) カンゾウの LC-MS データ

ESI ポジティブモードでの全イオンクロマトグラム、ESI ネガティブモードでの TIC 及び PDA による全波長クロマトグラムを取得した。カンゾウの指標成分のひとつであるグリチルリチンのピークは保持時間 21.0 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は 130 余に達した。

#### 6) ニンジンの LC-MS データ

ESI ポジティブモードでの全イオンクロマトグラム、ESI ネガティブモードでの TIC 及び PDA による全波長クロマトグラムを取得

した。ニンジンの指標成分のひとつであるギンセノシド Rg1 は保持時間 12.8 分付近に検出された。また、ギンセノシド Rb1 は、18.1 分付近に検出された。

#### 7) オウレンの LC-MS データ

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

#### 8) オウレンの多変量解析

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

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

#### 9) トウキの LC-MS データ

正負両イオン極性で 12 種類のトウキエキス試料を測定し、それらの LCMS を測定

したところ、それぞれ若干異なるパターンやピーク強度を示しており、中でも正負両イオン極性において最もピーク数の多い TIC を示したトウキ-162 について、各成分のマスペクトルを抽出した。両極性で検出されている成分が非常に少なかった。正イオンデータにおける  $m/z$  247、負イオンデータにおける  $m/z$  355 など、一つの  $m/z$  値でトレースした抽出イオンクロマトグラムにおいて複数のピークが確認された。

#### 1 0) サンシシの LC-MS データ

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

#### 1 1) サンシシの多変量解析

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

#### 1 2) ジオウの LC-MS データ

抽出イオンクロマトグラムの強度より、各エキスにおける主成分は三糖あるいは四糖であり、それらの強度比はエキスによって差が見られた。負イオン検出データの保持時間 11.4 分のマスペクトルにおいて  $m/z$  341 イオンと共に検出されている  $m/z$  455 イオンは、341 との質量差が 114 Da であること

から、系内に微量にコンタミしている TFA 付加によるイオンであると推測される。

#### 1 3) ジオウの多変量解析

ジオウには乾ジオウと熟ジオウがあるが、今回の検討試料の中で乾、熟と記載があるもののみで判別解析を行なった結果、良好な信頼度で判別が可能であった。市場流通品ジオウの熱水抽出エキスの LC-MS から主に試料間で差がみられたが、確認試験法の結果と合わせると、mannitriose のみが一致する。局方確認試験法では抽出条件は水+メタノールでの室温抽出のため 2 時間熱水抽出条件ではオリゴ糖の一部開裂などの変化が起きていると予想される。

#### 1 4) ゴシツの LC-MS データ

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

#### 1 5) ケイヒの LC-MS データ

ケイヒの全イオンクロマトグラム (TIC)

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

#### 1 6) シャクヤクの LC-MS データ

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

#### 1 7) 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。

#### 1 8) 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。

#### 1 9) 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。

#### 2 0) 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 mode では  $m/z$  603 と比較的大きな分子量の成分が