

マーカー成分として推定された。

2 1) 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 種類は内モンゴル産、1 種類は甘粛産、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 (甘粛省産) の 2 エキスは保持時間 17.4 分のピークが極端に大きく、その他のエキスを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モンゴル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。

2 2) 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 Dehydroeburicoic 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。

2 3) 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。

2 4) 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。

2 5) 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。

26) 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。

27) NMR および LC-MS-NMR 情報の集積

オウゴンについては、LC-NMR 測定は 8min に溶出する物質を除き、UV シグナルを指標として取得した。取得した分画は loop1~11 の 11 分画であった。

Loop 3 の NMR スペクトルは最大の UV 吸収を示していた化合物を含んでおり、LC-MS の結果から Baicalin と推測されたシグナルであった。loop 7 は loop 3 について 2 番目に UV 吸収の強い化合物分画であるが、LC-MS 分析より EIC 461 の Wogonoside と推測でき、6.79 ppm, 6.57 ppm のケミカルシフトを有していた。これは loop 4 の分画が有していた 6.75 ppm, 6.59 ppm のケミカルシフトと非常に近いので、loop 4 の分画化合物は Wogonoside の異性体である可能性が示唆された。Loop 9 の分画化合物は、積算回数は NS:2048 で積算時間は約 2 時間であった。本化合物は LC-MS 測定より、EIC 271 の成分を含むことが示唆されており、本化合物は Baicalein であると推測された。

サンシシに関しては、多変量解析の結果より分子量 330 の含有化合物が示唆されていたことから、NMR 測定のための LC-MS 分析を行い、データが再現するかを確認した。この結果、リテンションタイムが 16.17 min. の分画が 331.197 *m/z* となっており、本分画が目的の化合物を含む分画と考えられた。カラ

ム、流速等が異なっている分析条件であるが、スペクトルはよく再現できていた。本分画の質量数は、353.2 *m/z* であり、サンシシの LC-MS 測定データ 331.197 *m/z* と比較すると、差は 22 *m/z* となり、ナトリウム付加体のマススペクトルが得られていることが明らかとなった。リテンションタイム 15.8 min. のメインピークのマススペクトルは 411.2 *m/z* の質量数であることが明らかとなり、分子量 388.37 である Geniposide のナトリウム付加体と推察された。これらの分画を SPE 装置に導入し、リテンションタイム 15.8 min. の分画は 6 回インジェクトし、積算は 640 回で NMR 測定を行った。

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 法では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) 近赤外スペクトル情報の集積

オウゴンでは、 4680 cm^{-1} 付近および $5800\text{-}6200\text{ cm}^{-1}$ の領域で他の生薬とは明確に異なるスペクトル波形が確認された。カンゾウでは、 $5800\text{-}6200\text{ cm}^{-1}$ の領域で他の生薬とは明確に異なるスペクトル波形が確認された。ソウジュツでは、 $4080\text{-}4440\text{ cm}^{-1}$ および $5680\text{-}5840\text{ cm}^{-1}$ の領域で他の生薬とは異なるスペクトル波形が確認された。ショウキョウとニンジンとは、互いに似たスペクトル波形を示すことが確認された。

生薬間の特徴が認められた $4060\text{-}5100\text{ cm}^{-1}$, $5600\text{-}6200\text{ cm}^{-1}$, $6600\text{-}7600\text{ cm}^{-1}$ 領域に対して主成分分析を行なった。観測されたスペクトル変化に対する第1主成分の寄与率は36.0%、第2主成分の寄与率は20.5%、第3主成分の寄与率は18.2%であり、最初の3つの主成分に全体の74.7%のバラツキが反映されることが確認された。第1主成分に対して第2主成分をプロットしたスコアプロット上では、生薬の種類ごとのグループ化が可能であることが示された。第1主成分に対して第3主成分をプロットしたスコアプロット上では、第3主成分の方向で、ソウジュツと他の生薬類とに2分されることが確認された。

(5) TLC写真情報の集積

1) TLC の画像データの集積

平成 22 年度は、インチンコウ、インヨウカク、ウコン、ウヤク、ウワウルシ、カシュ

ウ、キササゲ、キョウカツ、キョウニン、ケイヒ、ゴボウシ、サンショウ、サンソウニン、シコン、シツリシ、ジャシヨウシ、ショウキョウ、シンイ、ダイオウ、トウニン、ドクカツ、テンマ、バイモ、ビャクゴウ、ビンロウジ、ベラドンナコン、ヘンズ、マシニン、ヤクモソウ、リョウキョウ、ロートコンについて画像データを集積した。

平成 23 年度は、昨年度からの継続分も含め、アカメガシワ、アラビアゴム、アロエ、ウワウルシ、エンゴサク、オウギ、ガイヨウ、カシュウ、カッコウ、カクコン、カンキョウ、キクカ、ケイガイ、ゲンチアナ、コウイ、コウジン、コウベイ、サイコ、シャクヤク、センナ、センブリ、ダイオウ、チクセツニンジン、ニンジン、ビンロウジ、ボウフウ、ボクソク、リュウタン、ローヤルゼリーについて画像データを集積した。

平成 24 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 Rf 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いる。市販の薄層板はメーカーによって使用している担体の粒度や活性度が異なることが考えられることから、画像データの収集に際しては、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 社製の薄層板を用い、展開結果に差があるかを検討した。

まず全体的な Rf 値の再現性について見ると、試験法を厳密に守ることにより、良好な Rf 値の再現性を得ることができると明らかとなった。次に Merck 社と Wako 社の薄層板の差について見ると、Merck 社より Wako 社のプレートの方が Rf 値が大きい傾向にあり、サンソウニン、ダイオウ、ビャクゴウの確認試験で Rf 値の差が大きかった。

平成 22 年度に検討した生薬のうち、局方に Rf 値が規定されている品目について、局方に規定された Rf 値と実際に得られた値を比較すると、局方に規定された値は Merck 社製プレートで得られた値とほぼ一致していた。しかし、ドクカツについては、局方規定値と実際に得られた値とが 0.1 程度異なるため、局方の規定を訂正する必要があるものと思われる。

平成 23 年度に検討した生薬のうち、局方に Rf 値が規定されているアカメガシワ、エンゴサクク、カッコウ、コウベイ、ボクソについて、局方に規定された Rf 値と実際に得られた値を比較すると、局方に規定された値は Merck 社製プレートで得られた値とほぼ一致していた。なお、16 局で収載されたコウベイについては、局方規定値と実際に得られた値とが 0.1 程度異なっており、条文作成時の誤記と思われた。

平成 24 年度に検討した生薬のうち、日局に Rf 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 Rf 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 Rf 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 Rf 値の再現性に関する検討

配糖体の確認試験に用いられている 1-ブタノール/水/酢酸(100)のような高極性溶媒を使用する場合、非常に長い展開時間を必要とする。展開に要する時間は、プレートの上に行く程長くなるため、現在 10 cm で行われている展開距離を 7 cm に変更することにより、展開に要する時間を大幅に短縮できるものと考えられる。

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、両者の間にクロマトグラムのパターンの差はほとんどなく、スポットの確認には全く支障がないことが明らかとなった。一方、展開に必要な時間について見ると、7 cm の展開に必要な時間は、ほとんどの溶媒系で 10 cm 展開するのに必要な時間の半分程度であり、展開距離を 30% 短くすることにより、展開に要する時間を大幅に短縮できることが明らかとなった。

(6) HPTLCによる国内流通生薬の成分比較

1) オウゴンの抽出条件の検討

試料溶液の調製は、局方ではメタノールで加温抽出することになっている。そこでより簡便な方法として、室温下での調製法を検討した。抽出溶媒として、メタノール、エタノール、50%メタノール、*n*-ヘキサン、アセトンおよび酢酸エチルで抽出したものと、従来のメタノールで加温抽出したもので、標準品 baicalin の検出について比較検討を行った。エタノール、*n*-ヘキサン、アセトン、酢酸エ

チル抽出試料溶液では、baicalin のスポットは検出されなかった。一方、メタノール、50%メタノールの室温抽出およびメタノール加温抽出では baicalin のスポットが観察された。一方、室温下でメタノール抽出した試料溶液はいずれのスポット量においても baicalin と一致したスポットを観察した。それゆえ、加温操作なくても検出可能であることが示された。

2) オウゴン国内流通品の成分分析

オウゴン国内流通品 15 種について、局方の調製法に準じて試料溶液を調製し、TLC を行った。局方に従い、試料溶液 5 μ L をスポット幅 0.5 または 5 mm の 2 パターンでスポットし、ブタノール/水/酢酸混液 (4:2:1) で約 10 cm 展開後、UV 検出および塩化鉄 (III)・メタノール試液噴霧により検出した。試料 15 種全てにおいて、いずれの検出においても R_f 0.5 付近に標準品 baicalin の明瞭なスポットを検出した。

薄層板 TLC と HPTLC での結果を比較すると、baicalin の検出に関しては両者とも明瞭なスポットが観察された。TLC 分析した試料溶液について、併せて逆相 HPLC を行った。TLC での結果と同様、全ての試料において標準品 baicalin が主ピークとして検出された。他のピークについて観察すると、baicalin のアグリコンである baicalein のピークが検出されたが、試料間でその含量にばらつきが認められた。

3) 各生薬の HPTLC 分析

各生薬国内流通サンプルについて、それぞれ試料溶液を調製し、研究方法に記した方法で HPTLC 分析を行った。試料溶液のスポットには、ばらつきをなくす目的で TLC サンプルアプリケーションを用い、TLC 画像の撮影

には専用機である TLC ビジュアルライザーを用いた。各生薬の結果を以下に記す。

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

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

ニンジン：局方の確認試験法に準じて HPTLC 分析を行った。ニンジンの国内市場品 16 試料について、ginsenoside R_{g1} および ginsenoside R_{b1} を標準品として、HPTLC 分析した。その結果、標準品 2 化合物とともに、他の ginsenoside 類のものと考えられるスポットが 10 個近く観察された。

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

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

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

オウゴン：15 試料について、局方の TLC

確認試験に準じて HPTLC 分析を行った。その結果、大きく 3 つの領域に明瞭なスポットが観察された。

シャクヤク：局方に TLC による確認試験法が記載されており、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 paeoniflorin 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記載されており、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, b₂, 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記載されており、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記載されており、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記載されており、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記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、ヘキサン抽出物を *n*-ヘキサン/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記載されていない。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記載されていない。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記載されていない。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記載されており、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記載されていない。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記載されていない。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 *catapol* 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記載されており、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記載されていないが、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romo-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記載されており、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：タクシャについては、局方に TLC による確認試験法が記載されていない。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記載されており、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: ゴシュユについては、局方に TLC による確認試験法が記載されていない。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記載されており、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。

(7) 各種測定データの掲載方法の検討

生薬の起原植物に関する情報を生薬全体の「概要」と位置つけて情報を整理した。各生薬についてウィキ上に概要を掲載するページを作成し、このページを軸に植物の分類情報や生薬の学術情報をリンクした。さらに各生薬について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・鏡検を章として掲載するページを作成し、生薬の栽培情報データベースのプロトタイプとした。1600枚の画像はすべて画面内にコンパクトに収まるように縮小し、クリックして拡大する形式にした。118生薬のLC-MSクロマトグラムはJCAMPと呼ばれるフォーマットでウェブ上に掲載し、JCAMP形式を閲

覧するツールおよびそれをウィキ上に埋め込む仕組みを実現した。

【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

これまでの研究結果に基づき、ニンジンの基原解析に有用である核DNAの18S rRNA遺伝子の部分領域及び葉緑体DNAの遺伝子のイントロンの部分領域に着目し、解析を行った。解析した18S rRNA遺伝子の5'側660 bpの塩基配列は、全検体において同一の配列を示し、GenBankに登録された*Panax ginseng* C. A. Meyerの同領域の配列 (D83275) と完全に一致した。*trnK*遺伝子のイントロン領域では、3'側の約1600 bpの塩基配列を解析した結果、3試料 (4検体) 以外の全検体が同一配列を示し、GenBankに登録された*P. ginseng*の同領域の配列 (AB087999) と完全に一致した。一方、3試料 (4検体) では、AB087999の配列において、1箇所M (Adenine/Cytosine) の2重ピークが観察された。

(2) シャクヤク

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

(3) ダイオウ

ダイオウ市場品の *matK* 遺伝子全領域の塩基配列を決定し、これまでの当研究室の研究

結果と比較した。*matK* 遺伝子全領域は長さ 1517 bp であった。9 市場品はすべて *Rheum palmatum* に由来し、そのうち 6 市場品は RPI 系統で Rp4 の遺伝子型 (AB115670)、2 市場品は RPII 系統で Rp5 の遺伝子型 (AB115671)、1 市場品は RPIII 系統で Rp13 の遺伝子型 (AB115680) をそれぞれ示した。

(4) マオウ

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

従って、今回解析したマオウ 11 市場品の基原植物は、内蒙古自治区産の 9 市場品がすべて *E. sinica* であり、新疆ウイグル自治区産及び甘粛省産各 1 市場品がそれぞれ *E. equisetina* 及び *E. intermedia* であった。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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Cytisine (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。

(8) ショウキョウ

1) 核 rDNA ITS 領域

ダイレクトシーケンスの結果、得られたシーケンスデータは、複数の配列の混合物と思われる波形を示した。このような現象は、多コピー遺伝子である rDNA においては、度々観察されており、ショウキョウと同じショウガ科に属する *Curcuma* 属植物でも見出されている。このような場合、塩基配列解析を行うには、PCR 産物をプラスミド DNA へ組み込み、大腸菌へと形質転換し、個々の塩基配列に分離した後に、シーケンス解析を行う必要がある。このような手法は、ショウキョウの基原植物である *Zingiber officinale* の種としての進化、成立過程等を考察する際には、有用であると思われるが、種の鑑別を目的とした塩基配列情報の整備を指向する本研究の目的には適さない。以上のことから、ITS 領域については、これ以上の解析は行わなかった。

2) 葉緑体 DNA *trnL-F* 領域

ITS 領域と異なり、葉緑体 DNA *trnL intron* 領域及び *trnL-F IGS* 領域共に、配列解析は可

能であった。ただし、*trnL-F IGS* 領域については、一塩基の挿入/欠失に基づくと思われるマイナーなピークが認められた。この領域については、メインのピークを基に、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、*trnL intron* 領域、*trnL-F IGS* 領域共に、全試料において同一の配列を示し、前者が、519 bp、後者が、328 bp だった。

(9) トウキ

1) 核 rDNA ITS 領域

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

2) 核 DNA の LEAFY 遺伝子

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

後、解析を行い、得られた配列を各遺伝子型に帰属した。

(10) サンシシ

1) 核 rDNA ITS2 領域

Gardenia 属植物の配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行った San-1, 3 については、部分配列 183 bp、その他の試料については、全長配列 201 bp の塩基配列を決定した。全 11 検体で 7 つの遺伝子型が見出され、その内の一つ (San-1, 5, 7, 9) がデータベース上の *G. jasminoides* の配列 (Acc. no.: GQ434646, GQ434647) と一致した。また、この配列と 198 番目の塩基のみが異なる配列が、San-6, 10 で検出され、このものとデータベース上の *G. jasminoides* の配列との雑種と考えられる配列が San-11 に認められた。

2) 葉緑体 DNA *trnL-F* 領域

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

(11) ハング

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。

(12) カッコ

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ニング

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、ジェノタイプニング解析を行った。

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。

(13) オウゴン

1) 遺伝子情報検索の結果

DDBJ において登録配列を検索し、遺伝子鑑別関連の登録データを抽出したものをまとめた。*S. baicalensis* の *rpl16-rpl14* 領域については 1 件 AB112068、また ITS 領域については 5 件 (AB557593, AY394851, FJ546846, FJ609732, FJ883534) の登録があった。

2) コガネバナの核 rDNA ITS 領域の解析

コガネバナ筑波研究部保存系統 2 系統の ITS1 及び ITS 2 領域の塩基配列を検討した結果、ITS1 及び ITS2 領域の塩基配列は、植物系統の差異によって変異が認められることから、同一植物種内の系統識別に利用できる可能性が示唆された。しかしながら、同一植物から塩基の挿入を伴う複数種の塩基配列が見出されることから、ダイレクトシーケンシングによる塩基配列解析は適しておらず、本研究課題である生薬の基原植物種同定には適しないと判断した。

3) オウゴン市場品の葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の増幅及びダイレクトシーケンシング

PCR 産物が得られた 28 検体のうち、DNA の plus, minus 両鎖が解析でき、高品質な解析結果が得られたのは 12 検体であった。DNA 鎖の一方のみが解析できた検体は 11 検体であり、両鎖が解析できた結果と合わせると、生薬 15 市場品中 13 市場品については、なんらかの塩基配列データが得られた。

4) 葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の塩基配列における変異

高品質の塩基配列情報が得られた

rpl16-rpl14 の遺伝子領域については、一部を除くほぼすべての試料由来の塩基配列は AB112068 と同一であった。ただし、AB112068 の塩基番号を基準とすると、174 番目の塩基が AB112068 では A に対し、NIB-036#1 では T であった。また、281 番目の塩基が AB112068 では T に対し、NIB-057#2 及び NIB-073#2 では C であった。

これらは GenBank に登録されている他の *Scutellaria* 属の同領域の配列 (*S. falericulata*: AB112069, *S. lateriflora*: AB112072, *S. altissima*: AB112067, *S. incana*: AB112070 及び AB112071) との変異点とは異なり、植物種内変異と考えられる。

(14) オウレン

1) モデル試料の ITS1 領域の塩基配列情報収集

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

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

10種のモデル試料より調製したゲノムDNA各2サンプル合計20サンプルを鋳型とした *rpl16-rpl14* 領域のPCR増幅の結果をもとに塩

基配列解析を行い、各試料についてアラインメント解析を行った結果、変異点の情報が得られた。生薬を試料とした場合、本領域の3'領域が解析不明瞭となる場合が多かった。*Coptis* 属植物由来の同領域の塩基配列は、*C. chinensis* (2タイプ), *C. deltoidea*, *C. teeta*, *C. omeiensis*, そして *C. japonica* とタイプ分離することが明らかになった。

(15) 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間で変異点は無いこと、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。

(16) 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、ゴシユユ、ホンゴシユユ、コホクゴシユ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。

(17) 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。

(18) カンゾウ

今回入手した全てのサンプルからITS領域を増幅し、その遺伝子型を決定することができた。

(19) ソウジュツ

1) PCR-RFLP 法による鑑別

市場品8試料 (A-H) について電気泳動を行った。試料CとEでは、*Fau* I消化により約80 bpと60 bpの2つの断片の生成を認め、*Msp* Iによる消化では切断を認めないことから*A. lancea*を基原とするものであると判定できた。試料のうちB, D, G, Hでは、*Fau* Iによる切断は認めず、*Msp* I消化によって約90 bpと50 bpの2つの断片の生成を検出した。このことからこれらの試料は*A. chinensis*を基原とするものであると推定した。

2) 直接シーケンスによる鑑別

8試料について、シーケンスを行った結果、試料CとEでは5つの鑑別サイトの全てで塩基が*A. lancea*のものと一致した。試料GとHでは同じく*A. chinensis*のものと一致した。また、試料AとFでは、5つのサイトの全てで*A. lancea*と*A. chinensis*に由来する2つの塩基が検出された。一方、試料BとDでは5つのサイトのうち4つで*A. chinensis*のものと一致したが1つでは異なっていた。

(20) ジオウ

trnK 領域の全長約2600塩基について比較したところ、*trnK*-5'-half と *matK* 領域の間のイントロン部および *matK* コード領域内の各1サイトでアカヤジオウとカイケイジオウの間で塩基置換が存在しており、生薬の基原種鑑別のためのマーカーとして利用できる可能性が認められた。そこで、それぞれをサイト1およびサイト2として、提供を受けた生薬について塩基配列の解読を行うこととした。サイト1は内部プライマ

ーを用いて、サイト2は同じプライマーの組合せで nested PCR を行ったところ、どちらの方法でDNAを調製した場合でも、PCR産物を得ることが出来た。このPCR溶液を用いてExoSap-It処理後にシーケンス反応を行うことにより、サイト1およびサイト2の塩基を同定することに成功した。

(21) シャゼンシ、ビャクジュツ

1) シャゼンシ

6市場品について、シーケンスを行った。この結果、いずれの試料も中国に分布するオオバコ *P. asiatica* Linne に見られるタイプA2と完全に一致したことから、オオバコを基原種とするものと判定した。

2) ビャクジュツ

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

(22) ケイヒ

1) DNA 抽出方法の検討

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

2) 塩基配列の比較

1. *TrnL*-intron 領域

GenBank 等の塩基配列データベース、お

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

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

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

3) PCR-RFLP 法の検討

葉緑体 DNA, *rbcL* 上流領域の差異がある部位は、制限酵素 Dde I の認識配列 (CTNAG) の一部となっている。そこで、ケイヒの基原植物種の区別や純度確認に Dde I を用いた PCR-RFLP 法が適用できないか、検討を行った。その結果、制限酵素処理後に生じる 2 つの断片長がほぼ同じ長さ (約 150 bp) となるため、アガロースゲル電気泳動では 1 本の太めバンドに観察され、処理前の 300 bp バンドとほぼ同じ強度で観察できるようになった。そこで、提供されたデータベース構築用

生薬サンプルについて上記の PCR-RFLP 法を適用したところ、すべてのサンプルについて、その基原植物種は *C. cassia* であるという結果が得られた。

(23) 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 460 bp 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、Fig.4 に示すようにジャノヒゲ属では DNA 断片は 460 bp 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、266 bp と 194 bp 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, 194 bp) 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。

(24) サイコ

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

(25) 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。

(26) ボウイ

全てのサンプルで、核リボソーム 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。

【組織培養物及び効率的増殖法に関する情報に関する研究】

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

文献情報及び実際の実験で収集するデータの項目、データ内容及び各データの形式を設定した。また、図表及び文献等の名前付けのルールを設定した。

(2) 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献調査

第1コア生薬基原植物のうち、*Scutellaria baicalensis* (黄芩)、*Glycyrrhiza glabra* (甘草)、*Glycyrrhiza uralensis* (甘草)、*Zingiber 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。

(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

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

センキュウ、トウキ、ホッカイトウキの植物体の無機成分分析は、窒素の含量は植物種に関わらず葉、根、茎の順に高く、リンの含量は、トウキおよびホッカイトウキの葉や茎は、センキュウでのそれと比べ高く、根では植物種に関わらず同程度であった。カリウムの含量は、植物種に関わらず葉や茎は根に比べ高かった。カルシウムの含量は植物種に関わらず、葉や茎が高く、マグネシウムの含量は、植物種および部位に関わらず同程度であった。

生薬の無機成分を分析するための試料調製および測定条件を検討して 29 元素の一斉分析条件を決定した。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) 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

本試験では、種芋の芽が上向きに定植されたものは 15%程度で、82%が横向きまたは斜め上向きであった。植付深度は平均で 4.3 cm であり、畝によっては 6 cm 以上になる場合もあった。

(2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

種苗の機械的裁断により調整した種苗は、従来法の種苗と比較し、十分高い萌芽率を示したことから種苗の機械的裁断法は実用的であることが明らかになった。ポテトプランターによる定植方法は、各試験区の定植深度を調査したところ、手植え法による定植深度は各試験区の何れも 2 cm 程度であった。一方、ポテトプランターによる機械定植は 6 cm 程度の深植え傾向にあった。

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

(3) 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方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

植物体の部位別抗酸化活性 (ORAC) は、100 $\mu\text{mol TE/g}$ 以上の高値を示したものは、ホソバオケラ、オケラ、センキュウ、マンシユウコギの地上部であり、また、ダイオウ、エゾウコギ、カンゾウ 2 種では地上部とともに薬用部位である地下部も高かった。

生薬エキスでは、同一の生薬であってもロットが異なると、乾燥重量あたりの ORAC 値は、黄芩、甘草、蒼朮で約 3 倍、生姜で約 2 倍、人参で約 1.5 倍とロット差が大きいことが示された。

【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】

トウキ種子の貯蔵開始時の発根率は 91.3%、出葉率は 78.7%、その時の種子の水分含量は 6.63% であった。5 $^{\circ}\text{C}$ 、-1 $^{\circ}\text{C}$ および -20 $^{\circ}\text{C}$ で 5 年間貯蔵した種子の発根率はそれぞれ 83.0%、88.7% および 88.7%、出葉率はそれぞれ 79.0%、71.3% および 61.3% であった。またその時の種子の水分含量は 5.08% であった。発根率は -1 $^{\circ}\text{C}$ 区 および -20 $^{\circ}\text{C}$ 区 で高か

ったが、出葉率は5℃区が高く、貯蔵温度が低温ほど低下した。発根後の根の伸長は、5℃区および-1℃区では根の褐変がほとんどなく良好であったが、-20℃区では根が褐変し、途中枯死する個体が観察された。

11種類の種子のうち、貯蔵開始時の発芽率（発根率、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℃で5年間貯蔵した種子の発芽率は、種子とともに封印したエージレスおよびシリカゲルの有無によって大きく異なった。エビスグサ、オオカラスウリ、ベニバナはエージレス単独およびエージレス+シリカゲル併用処理ともに貯蔵開始時とほぼ同程度の発芽率を示した。一方、コガネバナ、シソ、ハトムギ、ハブソウ、ミシマサイコ、メハジキはエージレス+シリカゲル併用処理で高い発芽率を示したが、コガネバナ、シソおよびミシマサイコは、エージレス単独で全くあるいはほとんど発芽しなかった。エージレス単独とエージレス+シリカゲル併用処理における種子中の水分含量は、シソではそれぞれ10.6%と7.7%、ミシマサイコではそれぞれ11.7%と8.4%であり、僅か3%程度の水分含量の差が発芽率に大きく影響した。

【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】

カンゾウ：今回入手した16検体のうち10検体が原形生薬であり、径は4.2~14.9mm、外面は赤褐色を呈していた。周皮を除いた物はなかった。横切面では放射構造が明らかで、裂け目が観察される場合もあった。生薬の断面については、糸鋸での横切断面および1昼夜蒸留水に浸した後、撮影した。

褐色のコルク層、放射組織が共通して観察された。NIB-038, NIB-168では明瞭な柔細胞による随が確認された。

横切面では不明瞭であったが、縦切面の観察で。結晶細胞列が確認された。

ニンジン：今回入手した16検体のうち12検体が原形生薬であった。原形生薬のうちNIB-113には紅参の記載があり、飴色で半透明を呈していた。NIB-012, NIB-112とNIB-184には湯通しの記載があり、外面は淡黄褐色を呈していたが、切面は飴色で半透明を呈しており形成層は不明瞭だった。他は外面、切面ともに淡黄褐色で、形成層付近が褐色を呈していた。

横切片の鏡検では、シュウ酸カルシウムの大きな集晶が観察された。

ソウジュツ：今回、原形生薬を8検体入手した。1昼夜蒸留水につけた物では、黄色の分泌物を確認できた。

最外層にはコルク層があり石細胞が確認できた。また皮部には大きな油室が確認され、内部に黄色の内容物が確認された。木部には発達した繊維束が観察された。

ショウキョウ：今回入手した10検体のうち6検体が原形生薬であり、灰白色~淡灰褐色で白く粉をふいたような物もあった。

切片の鏡検では、全てではないが最外層にコルク層が確認でき、皮層と中心柱が内皮によって区別できる。デンプン粒および油滴が確認できた。

オウゴン：今回入手した15検体のうち10検体が原形生薬で、そのうちNIB-002が野生品を由来としていた。外面は黄褐色を呈し、折面は黄色だった。

今回の検体は、円錐状よりもむしろ円柱状を呈していた。