

切断後1昼夜蒸留水につけていたものでは、切面が黄色から青色に変色していた。

切片の鏡検では、発達したコルク層が確認でき、皮部には石細胞が散在していた。道管は放射状方向に配列しているのが確認できた。

各種市場品の粉末については、カンゾウでは、特徴となる結晶細胞列が全てで観察された。16局のカンゾウ末の生薬の性状の項では『本品は淡黄褐色又は淡黄色～灰黄色を呈し、弱いにおいがあり、味は甘い。本品を鏡検(5.01)するとき、主として結晶細胞列を伴う黄色の厚膜性の繊維束、孔紋、網紋及び階紋の膜孔と単穿孔のある径80～200µmの道管、でんぷん粒及びシュウ酸カルシウムの単晶を含む柔細胞並びにそれらの破片、コルク組織を認める。皮去りカンゾウの粉末ではコルク組織を認めないか、又は認めてもわずかである。でんぷん粒は単粒で径は2～20µm、シュウ酸カルシウムの単晶は径10～30µmである』と記されているが、多数のでんぷん粒が観察されたのはNIB-037とNIB-176のみであり、サンプル間で異なっていた。

オウゴンについては、仮道管の破片や細長い石細胞が確認できた。寺林の報告では、横切面の道管の配列の特徴から野生品と栽培品及びその中間がの物が見いだされるとの報告があるが、粉末ではその違いはわからなかった。

その他の生薬についても、サンプル間での大きな差違は認められなかった。

カンゾウの特徴として観察を行った結晶細胞列について、オウバク、カッコン、モクツウ、センナ、チョウジについても観察し写真を撮影した。16局にはその他シャク

ヤク、ボクソクについても結晶細胞列の記載がある。また、オウギ、オウレンでは結晶細胞列を認めないことが鑑別点となっている。でんぷんの記載は、イレイセンに始まりロートコンまでの多くの生薬に見ることができ、今回はカシュウ、カッコン、コロボン、サンヤク、シャクヤク、ショウキョウなどの写真を撮影し比較することが出来た。カシュウ、カッコン、ハンゲでは複粒も観察された。コロボ、サンヤク、バイモでは大きなでんぷんが、カッコンでは角張った多面体のでんぷんの撮影をした。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1/3～1/2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。

ボタンピ: 外観 牡丹皮は管状～半管状の皮片で、厚さ約 0.5 cm、長さ 2～10 cm、径 0.8～1.5 cm 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 粒のものが多い。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。

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、主として外木包圍維管束が認められる。髓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。

カクコン: 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子が認められた。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。

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) 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

平成22年度における各生薬の示した阻害活性の強さをIC<sub>50</sub>値で求めた結果、オウゴン はCYP3A4及びCYP2D6の両者を阻害したが、CYP3A4阻害活性はNIB-035（原形、中国河北省産）の18.3 µg/mLからNIB-105（刻み、中国河北省産）の97.3 µg/mLまで、CYP2D6阻害活性もNIB-035（原形、中国河北省産）の1.51 µg/mLからNIB-059（刻み、中国河北省産）の96.1 µg/mLまでと、試料ごとにバラツキが見られた。一方、カンゾウは主としてCYP3A4阻害活性を示した（IC<sub>50</sub>：3.00-34.8

µg/mL）。その他の3生薬（ソウジュツ、ニンジン、ショウキョウ）は、CYP3A4及びCYP2D6の両者に対してIC<sub>50</sub>値が100 µg/mL以上であり、殆ど阻害活性を示さなかった。

平成23年度における各生薬エキス標準品（100 µg/mL）処理による効果は、LPS（0.1 µg/mL）刺激により樹状細胞のCD80, CD86, MHC class IIの各細胞表面分子の発現増加に対し、同様の傾向を示した。オウゴンエキス、ケイヒエキス、ビャクジュツエキスの処理により、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に抑制傾向が示された。一方、ニンジンエキス、ジオウエキス、マオウエキス、ダイオウエキス処理により、各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に促進傾向が示された。また、LPS（0.5 µg/mL）刺激による各細胞表面分子が発現した樹状細胞の増加に対しても同様の検討を行い、各生薬エキス標準品（100 µg/mL）処理によりLPS（0.1 µg/mL）刺激時に対する効果と同様の傾向が示された。これら生薬エキスのなかでも、特に、ケイヒエキスに有意な抑制効果が、ダイオウエキスに有意な促進効果が確認された。また、これら生薬エキス標準品（100 µg/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。

これら結果から、次に細胞表面分子発現した樹状細胞の増加に対し有意な効果を示したケイヒエキス（抑制効果）とダイオウエキス（促進効果）について個々の生薬エキスのロットについて検討を行った。

また、未成熟 CD11c 陽性樹状細胞は LPS（0.1µg/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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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、平成 24 年度は、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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 処理により、LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 処理により LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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、40%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 20 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 $\beta$ 誘発の神経細胞死に対する抑制作用

A $\beta$ (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。本年度検討した 17 種の生薬エキスのうち、オウレンに細胞毒性が強く Amyloid  $\beta$  誘発神経細胞死によって減少した細胞数をさらに減少させた。一方、サンシシは細胞死阻害活性を有意に示した。その他の生薬エキスは無効だった。

### 3) Amyloid $\beta$ 誘発の神経突起萎縮に対する抑制作用

A $\beta$ (25-35) の 3 日間後にエキスを処置し、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 $\beta$ (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。生薬エキスを後処置することにより、樹状突起を有意に伸展させたのは、カンゾウ、ソウジュツ、ニンジン、サンシシ、ゴシツ、ダイオウ、マオウ、シャクヤク、トウキであった。また軸索を有意に伸展させたのは、カンゾウ、ニンジン、ゴシツであった。

## (3) がん細胞増殖試験、NF- $\kappa$ 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。陽性コントロールとして添加した doxorubicin は細胞死を強く誘導し、ほぼ完全

に阻害することを確認した。20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。

## 2) NF- $\kappa$ B 活性化試験

平成23年度は、オウゴンとダイオウがTNF- $\alpha$ 単独よりも強くルシフェラーゼ発現を誘導した。一方、オウレンは弱いながらも阻害作用を示したことから、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にした。平成24年度は、HeLa- $\kappa$ B6細胞をTNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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、ケイヒ、ダイオウ、マオウが活性を示したため、今後各ロットの試験を実施することにした。

## (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

平成23年度は、11種類の生薬(ショウキョウ、オウゴン、ソウジュツ、オウレン、カンゾウ、ニンジン、ゴシツ、サイコ、トウキ、ソヨウ、ダイオウ)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結果、ショウキョウ、オウゴン、カンゾウ、ダイオウの熱水抽出エキスはNO産生抑制活性のロット差が大きいことが認められた。オ

ウレンは強いNO産生抑制活性を示したが、強い細胞毒性も認められた。ソウジュツ、ニンジン、ゴシツ、サイコ、トウキ、ソヨウにNO産生抑制活性はほとんど認められなかった。ロット間でNO産生抑制活性の差異があることが認められたショウキョウについて、多変量解析を行なった。NO産生抑制活性の強さにより2群に分け判別解析を行なった結果、2群はきれいに判別された。さらにS plotより2群間の判別に大きく寄与している成分( $t_R$ : 25.8 min.,  $m/z$ : 293, 191, 176)が見いだされた。本成分は標品との比較から、ショウキョウの辛味成分である [6]-gingerolと同定された。

平成24年度は、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がグループ化せず、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

平成22年度に分析した各生薬は、粉末色に特徴が見られた。ニンジンとショウキョウのL\*値は類似しているが、b\*値25を境にして区別された。ソウジュツのL\*値は70未満で、a\*値が5以上であった。オウゴンのb\*値は概ね30以上で特徴的であった。アルコール抽出液や熱水抽出液の透過光でもとくにb\*値に特徴が見られ、カンゾウについては変異の幅が大きかった。熱水抽出液に塩化第二鉄試液を添加するとオウゴンのL\*値が0近くとなり、カンゾウも測定値が20～50になった。水酸化ナトリウム試液ではb\*値がカンゾウで110を越え、オウゴンでは80～100に変化した。ヨウ素試液の反応ではニンジンとショウキョウのL\*値が著しく小さくなったが、他の生薬ではほとんど変化がなかった。

平成23年度に分析した各生薬は、粉末色にも特徴が見られた。ブクリョウは色が白いた

め、 $L^*$ 値が100付近となり、また測定した生薬の中では唯一 $a^*$ 値がマイナスとなった。その他、葉類生薬のソヨウ、種子類のシャゼンシ、黄色みが強いオウレン、赤みが強いサンシシなども離れた場所に位置した。エタノール抽出液の透過光では、葉緑素を含むソヨウとマオウで $L^*$ 値が小さくなり、 $L^*$ 値と $a^*$ 値の座標上で他と区別された。また、黄色みが強いオウレン、ダイオウ、サンシシの $b^*$ 値が95以上となり、明確に区別された。熱水抽出液の透過光でもオウレン、ダイオウ、サンシシの $b^*$ 値が80以上となり同様の結果が得られた。熱水抽出液に水酸化ナトリウム試液添加後の透過光では、オウレン、ソヨウ、ダイオウ、サンシシがそれぞれ $L^*$ 値と $b^*$ 値で特徴的な値を示し、他と区別された。熱水抽出液に塩化第二鉄試液添加後の透過光では、とくにダイオウとソヨウの $L^*$ 値が小さくなった。熱水抽出液にヨウ素試液添加後の透過光では、今回測定した生薬の中には特徴的な値を示すものはなかった。

平成24年度に分析した各生薬の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液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液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液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、澱粉を含有するカクコンにおける $L^*$ 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

15 品目の生薬それぞれについて味要素の

数値及びそれぞれの平均値から作製した各品目生薬の味のパターンを算出した。

平成22年度は、5品目それぞれの特徴として、オウゴンでは、酸性及び塩基性の苦味に関する味の要素の値が大きく得られた。カンゾウは塩基性苦味後味が大きく得られるのと同時に、酸性苦味及び渋味の値も大きかった。ショウキョウは酸性苦味の値が大きく得られ、ソウジュツでは塩基性苦味後味が特徴的に大きかった。また、ニンジンも塩基性苦味後味に大きな値が得られた他、旨味の値がその他の味要素より大きく得られたところが特徴的であった。

平成23年度は、5品目でもっとも特徴的な味のパターンを示したのはオウレンであった。オウレンは、塩基性苦味後味と塩酸塩苦味後味が非常に大きな値を示し、それら以外の味要素はほとんど得られなかった。官能試験においても、センサで測定した濃度0.1 mg/mLでも極めて苦く、苦味以外の味は全く感じられなかった。その他4種類の生薬については、センサによる測定において、どの生薬も塩基性苦味後味が一番強く検出されたが、官能試験において特に苦味を強く感じたものは無く、これらの生薬で塩基性苦味後味を評価対象とするのは適当でないと考えられた。塩基性苦味後味を除き、その他の味要素と官能試験での表現を合わせると、ジオウ、シャクヤク及びトウキについては、味センサのデータとある程度対応していた。しかしながら、これらの生薬の測定液は全体的に味が弱く、各生薬の明確な特徴を捉えにくかった。ケイヒについては、センサの応答性に合わせて、試料濃度5 mg/mL及び1 mg/mLの2種類で測定を行った。官能試験での表現では、甘味と辛味が主に表現された。

平成24年度は、5品目の生薬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】

平成22年度の検討では、以下の生薬を中心に情報を収集した。

##### （1）黄芩

###### 1) 臨床に応用が可能な生物活性

抗炎症、抗アレルギー作用が明らかになっている。また、アセトアミノフェンや四塩化炭素による肝障害改善作用、ジクロフェナクによる小腸粘膜障害促進作用、担癌マウスにおける生存率延長作用、インフルエンザ感染予防作用などが認められている。

###### 2) 禁忌

脾胃陽虚証の下痢。中焦虚寒の者、血虚胎動不安の者、肺寒咳喘痰嗽の者。脾胃虚寒。

###### 3) 副作用

薬剤疫学による解析方法により、生薬・漢方薬が引き起こす薬物性肝障害、間質性肺炎の原因として疑われている。また、欧米でハーブティーの原料として使用されている

Skulcupには、肝機能障害の副作用が知られている。

#### 4) 好ましくない薬物相互作用

特に報告はない。

### (2) 甘草

#### 1) 臨床に応用が可能な生物活性

さまざまな動物モデルにおける抗炎症作用、抗アレルギー作用が報告されている。なお、抗アレルギー作用は甘草を修治して炙甘草にすることにより増強する。

#### 2) 禁忌

湿旺盛、吐き気また嘔吐。湿盛脹満の者、浮腫のある者。腹部膨満・嘔吐・浮腫のある湿盛の者。実証中満腹脹の者。

慢性肝障害、胆汁鬱滞型肝障害、肝硬変、重篤な腎不全、糖尿病、高血圧、筋緊張性亢進症、低カリウム血症の者。

#### 3) 副作用

甘草含有化粧品により、接触性皮膚炎の症例が報告されている。慢性的に摂取すると、高血圧、浮腫、高カリウム血症と低カリウム血症などの偽アルドステロン症を引き起こす。

#### 4) 好ましくない薬物相互作用

理論的に降圧薬と拮抗することが指摘されている。低カリウム血症の副作用が重複するため、理論上、ループ利尿薬またはチアジド系利尿薬との併用は避けたほうがよい。

### (3) 生姜

#### 1) 臨床に応用が可能な生物活性

ラットにおける抗潰瘍作用、制吐作用、モルモットにおける胃内容物排出促進・消化管運動促進作用が知られており、健胃薬としての実験的な根拠が認められるほか、抗炎症作用、担癌ラットにおける抗ガン作用も認められている。

#### 2) 禁忌

肺熱、胃熱、陰虚熱、暑証。陰虚火旺の者、温熱内盛の者。陰虚内熱・血熱妄行の者。出血傾向のある者。陰虚内熱・表虚自汗・胃陰虚の者。

#### 3) 副作用

消化器症状（ガスの充満、腹部膨満感）をまれに起こすことがある。

#### 4) 好ましくない薬物相互作用

理論的に生姜は血小板凝集抑制作用を起こす可能性があるため、具体的な症例があるわけではないが、抗凝固薬、抗血小板薬との併用は避けたほうがよい。

### (4) 蒼朮

#### 1) 臨床に応用が可能な生物活性

白朮と蒼朮には、利尿作用があるとされているが、結果には報告間で差異があり、詳細は不明である。酢酸ライジングによる抗炎症作用は、白朮は抗炎症作用を示すものの、蒼朮は弱いことが報告されている。また、白朮、蒼朮はともに抗潰瘍作用、利胆作用が認められ、健脾作用との関連が推察される。

#### 2) 禁忌

多尿の者。陰虚津少の者。陰虚で咯血・鼻出血のある者。陰虚内熱・気虚多汗の者。

#### 3) 好ましくない薬物相互作用

特に報告はない。

### (5) 人参

#### 1) 臨床に応用が可能な生物活性

エタノールエキスには血流増大作用、血液凝固抑制作用と血栓形成抑制作用が認められている。人参エキスには、抗潰瘍作用、血糖降下作用、肝保護作用、抗炎症作用、抗リウマチ作用が認められている。

#### 2) 禁忌

虚熱証、湿熱証、肝陽上亢による高血圧、

表証。肝陽上亢の者、肺熱咳痰の者、陽虚内熱・陰不制陽の者、血熱上逆吐衄の者、脾胃実邪・熱邪停滯の者、外感初起表証の者。実証・熱証の者。肝陽上亢による高血圧、湿熱による浮腫。実証で不眠・煩躁のある者。陰虚陽亢の骨蒸潮熱、肺熱で痰の多い咳嗽、肝陽上亢の頭眩目赤、火鬱内熱の者。肝陽亢盛及び湿阻熱盛の者。

### 3) 副作用

不眠症、鼻血、頭痛、神経過敏症、嘔吐などが知られている。

### 4) 好ましくない薬物相互作用

人参に実験的な抗凝固作用があることから、ワルファリンとの併用時に活性化部分トロンボプラスチン時間とトロンビン時間を延長させることが予想され、併用は注意したほうがよいとされているが、ラットおよびヒトを用いた試験では、人参はワルファリンの薬物動態には影響しない。

平成23年度の検討において、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、11報に22処方漢方製剤に関する間質性肺炎、肝機能障害の副作用情報が症例とともに掲載されていた。また、医療用漢方製剤の添付文書で「使用上の注意」の改訂がなされた処方については、メーカーからの報告によるもので副作用のないようについての記載がなかったため、データベースには採用しなかった。

医中誌では551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、165報を得た。同様に、PubMedでは149報を得て、同様の選

抜方法により、21報を得た。以上の186報について内容を精査し、重複を除いて177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。

この文献検索では、年代を制限せずにすべてのデータから抽出したが、漢方薬が引き起こした副作用報告で最も古いものは、1991年に小柴胡湯による間質性肺炎疑いの症例報告であった。

報告されている処方としては、多い順から、小柴胡湯23報、芍薬甘草湯22報、柴苓湯13報、防風通聖散11報、柴胡桂枝乾姜湯8報、柴朴湯7報、乙字湯5報、葛根湯5報、牛車腎気丸5報、紫雲膏5報、清心蓮子飲5報、抑肝散5報であった。

また、副作用の内容としては、間質性肺炎69報、偽アルドステロン症47報、薬物性肝障害35報、薬疹13報、膀胱炎11報、接触性皮膚炎5報であった。

しかし、漢方薬の添付文書において間質性肺炎と薬物性肝障害への注意が喚起されている処方すべてがこの検索できたわけではなかったため、医中誌においては検索対象を学会発表まで広げた。その結果、さらに628件の文献情報がヒットし、このうち、漢方薬が引き起こし副作用に関する論文をピックアップして、405報を得た。

報告されている処方としては、小柴胡湯45報、芍薬甘草湯19報、柴苓湯16報、柴朴湯8報、防風通聖散8報、柴胡桂枝乾姜湯8報、黄連解毒湯(温清飲を含む)7報、乙字湯6報、清心蓮子飲6報であったが、処方名がなく甘草含有とだけ記載のある報告が22報、中国由来の薬物による副作用の方国43報、漢方薬とだけ記載があるが詳細は不明な報告が116報もあった。

副作用の種類としては、間質性肺炎が103報、薬物性肝障害が75報、偽アルドステロン症が42報、アリストロキア酸腎症が27報、薬疹が21報、間質性腎炎が12報、薬物性膀胱炎が12報、接触性皮膚炎が8報であった。

学会発表で報告された漢方薬の副作用情報については、処方名の記載がないもの、誤った基原の生薬を使用したために発症し本来の漢方薬の副作用とは言えないアリストロキア酸腎症に関する症例報告、また、学術論文で報告されたものと重複しているもの等が多いことから、今回のデータベースには登録しない方針とした。

平成24年度の検討において、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 phleboscrosis 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、ゲニポシド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言いがたい。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

平成 22 年度は、局方生薬として流通する黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人参に関して、平成 23 年度は、局方生薬として流通する黄连、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、さらに平成 24 年度は、牛膝、大黄、白朮、麻黄及び茯苓に関して、それぞれの 20 g 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算出した。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 (Cv) を算出したところ、平成 22 年度は、黄芩、甘草及び蒼朮は 10% 以下に収まっているが、生姜では 26.5%、人参では 26.7% と大きなばらつきを示した。平成 23 年度は、いずれの生薬も 10% 以下に収まり、特に、地黄、芍薬及び当帰については、それぞれ 5.6%、4.1% 及び 4.6% と小さなばらつきであった。平成 24 年度は、牛膝、大黄、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。一方、会社内変動係数はいずれも数パーセントであり、同じ会社の生薬に関する測定間のばらつきは小さいことが分かった。

ただし、例外的に桂皮及び当帰については会社内のばらつきが大きい場合もあった。

## 2) オウゴン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オウゴン生薬原料は、原形のものと同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 20 g 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算出した。15 種類の生薬原料におけるエキス収率の変動係数は、16.6% であった。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数パーセントであり、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った。

## 3) 甘草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甘草生薬原料は、原形のものと同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 20 g 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。16 種類の生薬原料におけるエキス収率の変動係数は、18.1% であった。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数パーセントであり、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った。

## 4) 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、原形のものと同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 20 g 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 であった。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った。

## 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】

構築中の総合データベースは、テキスト、画像データだけではなく、LC/MS データ、NMR データ等多様なデータ形式に対応する

必要があったが、最も多様な形式を有するデータの収載が想定された成分分析情報についてデータベースの構築を平成 22 年度に完了しており、主要な問題点は克服されたと考えている。

遺伝子鑑別情報、組織培養情報、栽培法に関する情報、生物活性情報などに対するデータベース構築及びデータの登録は次年度以降であるが、必要なデータ項目の抽出は各分野においてほぼ完了しており、今後とくに技術的な問題は生じないものと考えられる。

また、本データベースは開発言語として汎用性の高い MySQL を採用しているため、他のデータベースからの接続に柔軟な対応が可能であり、独立行政法人 医薬基盤研究所で進めている統合データベース開発においても、横断検索からダイレクトな検索結果の表示が可能になると考えられる。

平成23年度は、医薬基盤研究所外部の拠点研究者からのインターネットを介したデータ登録システム及び、一般への公開システムの構築が完了し、データベースシステムの骨格構築についてはほぼ完了したと考えられる。

今後、試験運用を行い、実際にデータの登録または閲覧を行い、登録システム及び公開システムの問題点を点検し、さらに来年度のシステム改良、構築へ反映させる予定である。

また、本データベースシステムは、汎用データベース言語である MySQL で構築されているため、昨年度より医薬基盤研究所内のメディカルバイオリソース研究事業の計画として行なっているデータベースの統合事業においても、各種データベースの横断検索から、ダイレクトな検索結果の表示が可能であり、収集されたデータのよりいっそうの広範

な活用ならびに、薬用植物及び生薬の情報の普及につながるものと期待される。

平成24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】

平成 22 年度では、生薬の熱水抽出において、コア 5 品目中、ニンジン、ショウキョウについては抽出後の吸引ろ過がまったくできなかった。その理由としてニンジンはサポニン含量が特に高く、水を強く吸着しろ過を困難にすると考えられた。ショウキョウも同様に水を強く取り込みろ過ができず収量が極端に低い結果となった。こられ 2 品目については遠心分離を試みることによりやや改善された。

データベース上での成分情報のフレーム構築に関しては、LC-MS 情報での LC 部分は TIC および UV 情報の両方を JCAMP 方式でダウンロード可能なようにすることで精細

なチャートを閲覧可能なようにしたが、JCAMPを閲覧するためのViewerを利用者はダウンロードせざるを得ず、ダウンロードのリンクをはるなどの措置が必要と考えられた。NMR情報に関してはFIDのダウンロードを可能とし、各NMR機器のシステムソフトウェアにて精細なチャートを閲覧可能なようにしたが、これも同様にフリーのFID変換ソフトウェアのダウンロード先にリンクするなどの措置が必要と考えられた。

平成23年度では、生薬の熱水抽出において、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が、その理由は粉末が極端に疎水性の性質を呈しているため、水に懸濁ができないためである。そこでブクリョウは粉末にはせず、刻み状態で抽出を行い、最終的には吸引濾過にて残渣を除いたところ、エキスを得ることが可能となった。

データベース上での成分情報のフレーム構築に関しては、入力上の問題点について、システム開発元である富士通九州システムズ株式会社へ伝えられた。NMR情報化合物情報新規入力の際の「 $\prime$ 」による入力不可については、開発元でも同様の現象は確認しており、バグの修正により、本現象は解消された。モデル試料管理システムからの写真の転送については、モデル試料の生薬写真を保存しているWindowsマシンからLinux(web)サーバにファイルを転送する設定を再度開発者側にて行い、写真表示が可能となった。

LCMS分析に関して平成22年度では、オウゴン $\text{MS}$ 結果からの多変量解析に結果、一部の試料のみに $m/z$  461のピークが認められたが、この質量数はwogonosideに一致する。標準品がないため確定はできないが、本

化合物がマーカとなる可能性があり、現在さらに多くのオウゴン検討試料を追加収集している。

ソウジュツにおいては、Chemical Combined Dictionaryにて検索したソウジュツの化合物検索結果に掲載されている化合物は、いずれもESIよりAPCIでイオン化し易い構造であると考えられる。そのためAPCIでの再測定が必要であると考ええる。またソウジュツに関しては基原が2種類あることから、遺伝子検討班の検討結果を待ち、それらの結果を反映させた考察が必要である。ショウキョウはいずれも雲南省産のものであるが、[6]-Gingerolやshogaolなどの成分も同様にAPCIでの測定が必要と考えられた。

カンゾウに関しては、性質の異なる2成分のスペクトル解析の結果から、本分析条件によってカンゾウに含まれる成分についての化学情報の集積が可能であると考えられた。しかしながら、ただデータを積み上げるのではなく、データを積み重ねた上で、その生薬を特徴づけるものに絞り込み、整理する必要が有るものと考えられた。

ニンジンに関してはニンジンサポニン類3成分のスペクトル解析の結果から、本分析条件によってニンジンに特徴的に含まれる成分についての化学情報の集積が可能であると考えられた。

オウゴンのLC-NMR-MSを用いた成分解析研究において、MSをトリガーとした目的試料取得が困難であることが判明した。これは、化合物中の移動性プロトンが移動相に用いる重水素と交換することにより、分子量変動を生じることによると考えられた。

平成23年度では、オウレンは熱水抽出エキスのLC-MSにおいて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。NIB-113 と 185 は日本産のオウレンであり、これらは明らかに中国産とは成分的に異なっていることがこの結果からも明らかとなった。

$m/z$  336 および 352 の XIC で観測されている 2 ピークのプロダクトイオンスペクトルは、それぞれほぼ同一のパターンを示していることから、これらはそれぞれ異性体の関係にあると考えられた。

トウキにおいては、全体的に検出されるピークは少なかった。トウキには *ligustilide* などの精油成分を多く含んでいるため、イオン源を APCI に変えるなどの対策が必要と考えられた。

サンシシに関しては、配糖体と思われるピークが多く検出されたが、多変量解析の結果、長手のものと丸手のものを分けるマーカー化合物として  $m/z$  331 に見られたが、MS のフラグメンテーションと文献記載の化合物の *epijasminoside A* と推定されたものの、MS のみからでは構造を確定できないため現在 LC-NMR-MS による特定を行なっているが、場合によっては単離が必要であり、今後エキスの精製分離も行い構造を確定させる予定である。

ジオウに関しては、熱水抽出エキス中には多くのオリゴ糖を思われる成分が LC-MS により検出されており、乾ジオウと熟ジオウの間で明確に成分差が見られた。多変量解析の結果と合わせ、マーカーとなるオリゴ糖があることが分かったが、それらの構造はまだ未決定である。

ゴシツに関してはグルクロン酸を糖部とし、オレアノール酸を非糖部とするトリテル

ペンサポニン類が多く含まれていることが知られている。特に糖部にさらに不安定な酸が結合したものを *acyranthoside* 類としていくつ報告されている。以前の当センターの研究において *acyranthoside* 類は熱に特に不安定であり、熱水抽出では存在していないと考えられる。また *chikusetsusaponin* 類も 70°C 以上の乾燥温度条件では末端部から糖が開裂していくことを明らかにしているため、同様に熱水抽出では十分な開裂が起きているものと考えられた。LC-MS データから *chikusetsusaponin* 類と考えられるピークがいくつか認められるため、今後はこれらピークの詳しい同定をしていく予定である。

ケイヒに関しては、主ピーク 1～3 は、プロダクトイオンの脱水ピークが主であることや推定組成式などから、ケイヒに特徴的なジテルペノイドと推定した。ピーク 4 はクマリン、ピーク 5 はケイアルデヒド、ピーク 6 はサフロールと推定された。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、ケイヒ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。

シャクヤクに関しては、ピーク 1 はアルビフロリン、ピーク 2 はペオニフロリンと推定された。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、シャクヤク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。

サンシシに関する LC-MS-SPE/NMR 測定において、判別に寄与していると考えられる分子量 330 の化合物は、3～4 ppm 付近に糖由来と考えられるシグナルが観測されたこ

とから、epijasminoside A と推察された。また、軽水分析が可能になるオンライン SPE (Solid Phase Extraction) 装置の利用を実行したことにより、LC-MS 解析の結果との整合性がとれ、より確実な化合物同定が可能になった。

平成 24 年度は、LC-MS 分析については、ビャクジュツの特征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征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 *Narirtin* 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 leucocarpa* 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。

カクコンは *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 catechin、ピーク 2 は 1, 2, 6- trigalloylglucose、ピーク 3 は coumaroyl glucose、ピーク 4 は resveratrol 4'-*O*-glucoside、ピーク 5 は rhein-8-*O*-glucoside、ピーク 6 は epicatechin gallate、ピーク 7 は lindleyin、ピーク 8 は resveratrol galloylglucose、ピーク 9 は trachrysone-8-*O*-glucoside、ピーク 10 は rhein とそれぞれ推定された。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 は、saikosaponin V、ピーク 9 は、saikosaponin c または f、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、saikosaponin a および 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、saikosaponin a および d 等の化合物の hydroxyl 体、ピーク 13 は、saikosaponin a および d 等の化合物の acetyl 体と推定された。また、ピーク 8 は、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 は luteolin の diglucuronid、ピーク 2 は apigenin の diglucuronide、ピーク 3 は luteolin の glucuronide、ピーク 4 は rosmarinic acid とそれぞれ推定された。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とした。

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

本研究に於いて検討した総ての確認試験について現行の 10 cm の展開と 7 cm 展開を比較したが、ほとんどの場合 Rf 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ことから、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ものと思われる。しかし、ボクソク、エンゴサク、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。

平成 22 年度に測定したコア生薬 5 品目については、近赤外吸収スペクトル及びその 2 次微分スペクトルにおいて、各生薬に特徴的なスペクトルが示された。また、2 次微分スペクトルで生薬間の特徴が認められた波数領域に対して主成分分析を行ない、第 1～第 3 主成分をプロットすることで、生薬の同定ができる可能性が示唆された。

生薬の栽培情報はウェブ上の読み物としては含蓄に富んだリソースだが、学術的な統計情報や比較検討とリンクさせることが難しい。現在は各ページの情報から自動的に一覧表を作る機能、TLC のような同一試験で品質評価を行うページへの自動リンク等の機能を付加しているが、将来これらの情報を半自動的に数値化して統計処理を可能とする機能が望まれる。

【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

3 試料 (4 検体) の *trnK* イントロン領域の塩基配列において、1 箇所 2 重ピーク Adenine/Cytosine が観察された。これまで解析してきた 100 検体以上の同属植物及び生薬試料において、この箇所はすべて Adenine であり、塩基置換は認められなかった。この原因については現在確認中である。

### (2) シャクヤク

これまでの研究結果では、中国内蒙古自治区産の *P. lactiflora* 及び赤芍はすべて赤芍系であり、一方、安徽省、浙江省及び四川省産の白芍はすべて白芍系であった。また、日本産芍薬の基原である薬用品種「梵天」や「北宰相」は白芍系であった。今回のシャクヤク市場品の結果はこれまでの知見と多くが一致したが、日本産シャクヤクの基原に関しては異なっていた。日本市場には薬用品種以外の園芸品種が流通していることが示唆された。

### (3) ダイオウ

RPI 系統の遺伝子型 Rp4 は、青海省東部～四川省北西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、同地域産出の錦紋大黃の系統であり、円筒状の根茎が発達し、箱黄、包黄の名称で流通する。RPII 系統の遺伝子型 Rp5 は、四川省北西部～甘肅省南西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、現地ではタンゲート大黃の名称を持ち、根の発達が良い。RPIII 系統の遺伝子型 Rp13 の大黃は、四川省中西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、雅黄の系統である。

9 市場品のうち 6 市場品が RPI 系統の遺伝子型 Rp4 であったことから、日本では品質の良いダイオウが流通していることがわかった。また、雅黄の名称を持つ 2 市場品に

ついては、1 市場品が RPIII 系統の遺伝子型 Rp13、1 市場品が RPII 系統の遺伝子型 Rp5 であったことから、前者は本来の雅黄の産地である四川省中部産であり、後者は四川省北西部産であることが推測された。

### (4) マオウ

内蒙古自治区産の市場品は *E. sinica*、甘肅省産の市場品は *E. intermedia* であり、これまでの我々が得ている結果と一致した。*E. equisetina* は、野生資源の著しい減少により、近年市場品にほとんど見られないが、今回、新疆ウイグル自治区産の市場品に確認された。少なくとも *E. sinica* 由来の 2 市場品は栽培品であり、野生品との同等性が担保されるのであれば、栽培品への移行が望まれる。

### (5) センキュウ

これまで、*C. officinale* と *L. chuanxiong* は、*trnK* 遺伝子において、上流から 767, 924, 964 番目の塩基を調べることで鑑別できることを報告してきたが、今回、明らかに *C. officinale* であると同定できる市場品の他に、3 箇所の配列が K, C, K (タイプ II) である市場品が約半数認められた。これら 5 市場品については、今後、クローニングを行い、混合配列の形成に関わる純系の配列を明らかにする予定である。また、市場品の産地は北海道であることから、*L. chuanxiong* の影響は考えがたく、市場品のみならず植物をも含めて、*C. officinale* の種内変異を検討する必要がある。

### (6) ボタンピ

ホモロジー検索の結果、99%以上の相同性を示した 12 市場品は *P. suffruticosa* と同定できる。一方、97%の相同性を示した 3 市場品については判断に迷うところであるが、市場品の性状や、産地がボタンピの主産地

である安徽省銅陵または安徽省であることを鑑み、*P. suffruticosa* であると判断した。現在の中国産ボタン市場品は、ITS 領域において、比較的多くの混合塩基が認められ、基原種である薬用ボタンは、古来、交配が行われてきたことが示唆された。混合塩基の種類から、この成因の過程には、シャクヤク *P. lactiflora* が関与した可能性も考えられる。民族薬物資料館保有の韓国産牡丹皮はおそらく 1980 年代の入手品である。純系の塩基配列をもった検体は本品のみであり、その当時中国産の牡丹皮はどのような塩基配列を有するものであったのかに興味をもたれた。今後、日本に系統保存されている薬用のボタンを含め、検討する必要がある。

#### (7) タクシャ

GenBank に登録されている *A. orientale*のうち、タイプ I ではなくタイプ II の配列である DQ339080 は日本産の *A. orientale* を材料としている。福田らもタイプ II の配列を *A. orientale* の配列として報告している。また、*A. orientale* と *A. plantago-aquatica* は近縁で、花の大きさが区別点であるとされるが、差異が認められない系統があるとも報告している。一方、植物分類学では、*A. orientale* は *A. plantago-aquatica* L. subsp. *orientale* (Samuelsson) Samuelsson のシノニムであるとされている。適切な材料の同定とともに、*A. plantago-aquatica* と *A. plantago-aquatica* subsp. *orientale* の ITS 領域の種内多型については、今後検討を要する。

#### (8) ショウキョウ

塩基配列を決定出来た *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たことから、国内市場に流通するショウキョウは、上記の遺伝子領域において、

遺伝的に均質である事が明らかになった。それぞれの領域について、Blast search program により国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) に登録されている配列と相同性検索を行った結果、*trnL*-F IGS 領域については、データベース上の 4 つの *Z. officinale* の配列 (Acc. No.: HM567394~HM567397) と完全に一致した。一方、*trnL* intron 領域は、上記 4 つの *Z. officinale* の配列と前半部の配列に大きな違いが認められた。試料の来歴については、マレーシア産の *Z. officinale* の内の Bentong、Bara、Muda 及び Padi と呼ばれる系統であることが、データベース上に記載されている。従って、今回の結果からは、国内市場に流通するショウキョウは、*trnL* intron 領域の塩基配列において、マレーシア産の *Z. officinale* の各系統と判別が可能であると推定された。また、同領域が *Z. officinale* の産地及び系統判別に有用である可能性が示された。

#### (9) トウキ

ITS 領域の配列解析結果から、今回解析を行った試料は全て、日本薬局方が定める通り、*A. acutiloba* あるいは *A. acutiloba* var. *sugiyamae* であると推定された。また、今回の結果から、国内に流通する当帰の ITS 配列は、種内及び個体内変異も極わずかであることが明らかになった。ITS 領域は、多コピー遺伝子であるため、PCR 増幅が容易であることから、中国及び韓国当帰との区別には本領域の塩基配列解析が有用であると思われる。

一方、LEAFY 領域の遺伝子解析では、7 つの遺伝子型が見出された。この内、genotype 7 は、雑種型であるため、ハプロタイプとしては 6 つの遺伝子型が認められた。

6つのハプロタイプの内、genotype 4及び genotype 6は、明らかに他のハプロタイプと比べて変異が多く、異質である。これらはいずれも国内本土産であるが、その来歴について興味もたれる。

#### (10) サンシシ

今回解析した2つの領域において、全ての試料がデータベース上の *G. jasminodes* の配列と一致するかあるいは良く似た配列を示した。データベース上の配列と一致しなかった試料についても、San-3の *trnL-F* IGS配列を除いては、その違いはわずかである事から、*G. jasminoides* の種内変異の範囲であると想像される。ただし、今回の結果のみから、本研究で使用された試料の基原種を *G. jasminoides* と特定するには問題がある。この点については、*G. jasminoides* の標準植物試料を多数、収集し、その種内変異の範囲について情報を得る必要がある。

#### (11) ハンゲ

今回、*trnL-trnF* IGS領域で2検体、ITS1領域で3検体からPCR産物が得られず、塩基配列解析が不可能だった。他の多くの試料の付帯情報には、「無流」の記載があり、試料の漂白等を目的とした硫黄燻蒸が施されていないことが示されている。一方、PCR産物が得られなかった上記の検体には、「無流」の記載が無く、逆説的に考えるとこれらの試料は、硫黄燻蒸により、DNAがより断片化していたことが推察される。

葉緑体DNAの *trnL-trnF* IGS領域の塩基配列解析では、各検体間の変異が少なく、多くの検体が同一の配列を示した。これらの配列は、国際塩基配列データベース上の *P. ternata*, *P. yaoluopingensis* の配列と同一の配列を有し、*Arisaema* 属植物由来の配列と

は明確に区別された。従って、本領域の解析目的である *Arisaema* 属植物との鑑別には有用であったが、*P. ternata* と *P. yaoluopingensis* との区別が不可能だった。

一方、ITS1領域の塩基配列では、上記データベース上の配列を比較する限りにおいては、*P. ternata* と *P. yaoluopingensis* の区別が可能であり、今回の解析結果からは、HaKw-3, -7, -14, -15の4検体を除き、いずれも *P. yaoluopingensis* 型の塩基配列を示した。また、北朝鮮産の3検体の内、HaKw-14, -15は、他の検体と異質の配列を示した。また、甘粛省産の2検体では、上記の *P. yaoluopingensis* 型の配列と HaKw-14, -15型の配列の雑種と思われる混合配列が見出された。HaKw-14, -15の配列を持つ試料の基原植物とその分布域に興味を持たれる。

#### (12) カッコン

ITS2領域の塩基配列解析の結果からは、今回解析を行った試料は、全て日本薬局方が定める通り、*P. lobata* を基原としていると推定された。一方、5S rDNAのIGS領域の塩基配列長の違いに基づくジェノタイプ解析では、解析可能だった23検体より計5つの遺伝子型が見出された。本研究では、Sunらが、*P. thomsonii* 特異的遺伝子型として報告している genotype A を持つものが4検体で見出された。前述の通り、Sunらの報告は、検討検体数が不十分なため、今回の結果のみをもって、局方不適合である *P. thomsonii* の遺伝子を持つものが流通していると結論付けるのは拙速である。しかしながら、genotype Aが見出された検体の産地は、3検体が湖北省、1検体が四川省であり、これらの地域は、ちょうど、*P. lobata* と *P.*