

表3 グリチルリチン酸含量

		グリチルリチン酸含量(%)	
系統名	株No.	径0.5cm以上	径0.5cm未満
GuIV2	1	2.04	1.69
	2	1.92	1.46
	3	1.74	1.49
	平均值	1.90	1.55
	S.D.	0.15	0.13

GuIV1	4	2.89	2.57
	5	1.98	1.95
	6	0.52	0.48
	7	2.11	1.79
	8	3.62	2.70
	9	1.83	1.74
	10	2.11	1.80
	11	2.24	2.14
	平均值	2.16	1.90
	S.D.	0.89	0.68

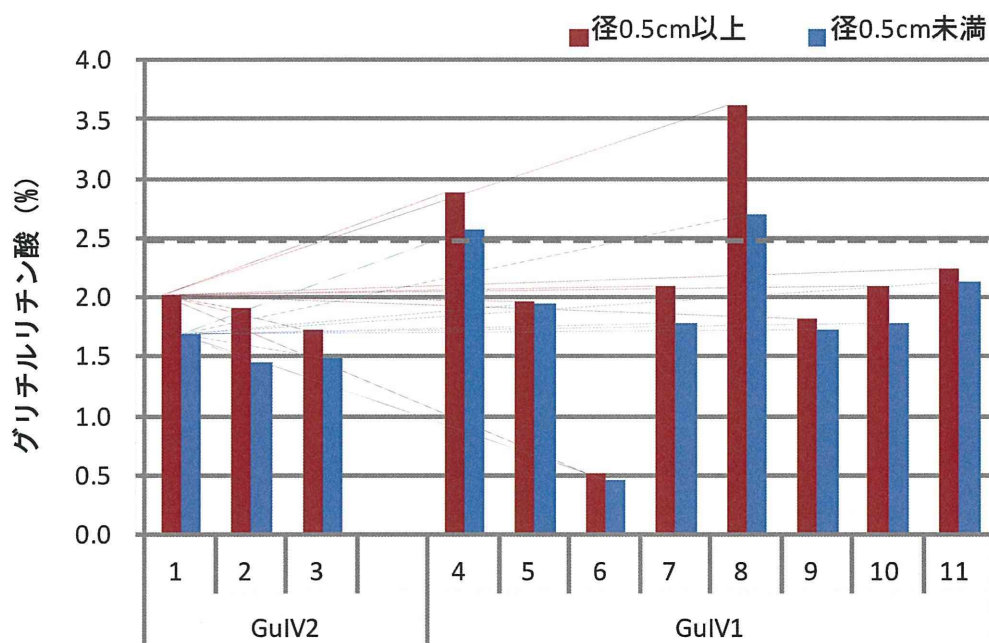
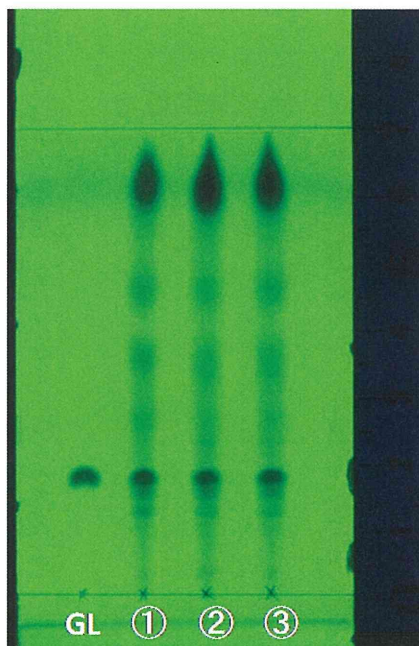


図11 グリチルリチン酸含量

表 4 理化学試験結果

試験項目	日局規格	GuIV1系統			
		株No.4		株No.8	
		径0.5cm以上	径0.5cm未満	径0.5cm以上	0.5cm未満
確認試験 (TLC,グリチルリチン酸)	スポットを確認	確認	確認	-	確認
乾燥減量	12.0%以下	6.73%	6.17%	-	6.36%
灰分	7.0%以下	5.60%	5.54%	-	5.73%
酸不溶性灰分	2.0%以下	0.21%	0.14%	-	0.16%
エキス含量	25.0%以上	46.99%	37.67%	-	37.71%



GL:グリチルリチン酸 標準溶液  
 ① GuIV1系統No.4直径0.5cm以上  
 ② GuIV1系統No.4直径0.5cm未満  
 ③ GuIV1系統No.8直径0.5cm未満

図 12 確認試験 (TLC)

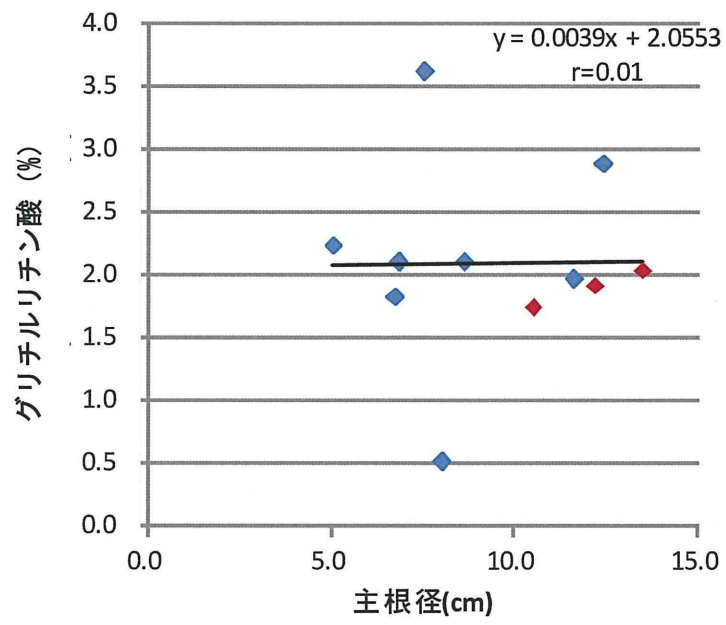


図 13 主根径とグリチルリチン酸含量

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた  
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）  
分担研究報告書

分担研究課題：水耕栽培により生産した「甘草」の生薬・食品添加物としての安全性  
および有効性評価

分担研究者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

**要旨** 1. 従来生薬甘草市場流通品と人工水耕栽培品の変異原性試験における比較 DNAに影響を与え、その結果遺伝子突然変異を起こすかを明らかにするために、従来生薬である甘草市場流通品3種と人工水耕栽培品3種について、それぞれ熱水抽出したエキスをを用い、細菌の増殖の評価による復帰突然変異試験（Ames test）を行い、変異原性の有無を確認した。市場流通品及び水耕栽培品ともに遺伝子突然変異誘発性は認めなかった。市場流通品と水耕栽培品が変異原性において同等であることが示唆された。2. 市場流通品および人工水耕栽培品に含まれるヒ素および重金属の測定 ヒ素と鉛に関しては、カンゾウ根およびストロン中に蓄積し得る不純物として、日本薬局方・食品添加物公定書いずれにも、比色法あるいは比濁法を用いた純度試験を行うことが規定されている。本研究ではICP-MSを使用し、ヒ素および鉛の他に、天然に広く分布するカドミウム、水銀を加えた四種の元素の含有量を定量した。供試した市場流通品4検体のうち、3検体からヒ素（0.16-0.49 ppm）、1検体からカドミウム（0.13 ppm）、4検体すべてから鉛（0.2-0.49 ppm）が定量された。水耕栽培品（3検体）からはヒ素は検出限界以下、カドミウム、水銀は定量下限以下であった。また鉛については市場流通品同様、すべてのサンプルから定量値を得た（0.21-0.36 ppm）。いずれの甘草も、ヒ素、鉛に関しては日本薬局方、食品添加物公定書の基準値の1/10以下の濃度であった。

3. 甘草熱水抽出エキスの抗アレルギー活性評価系の構築 甘草では、すでに様々な病態マウスモデルを用いた抗アレルギー作用が報告されている。病態モデルに甘草熱水抽出エキスを経口投与しアレルギー炎症への影響を評価する目的で、本研究ではアレルギーモデルマウスを用いた二つの抗アレルギー評価系の構築を検討した。一つはイムノグロブリンE（IgE）依存的に発症する即時型アレルギーと複合的要因で発症する遅延型アレルギーを含む三相型の炎症を誘導したマウスモデル（triphasic ear swelling model）系であり、構築中である。さらにもう一つはT細胞依存的な接触性皮膚炎の症状を呈する遅延型アレルギーマウスモデル評価系であり、今年度構築した。

研究協力者  
大月典子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員

#### A. 研究目的

効率的かつ安定的な国内産甘草を供給するために、水耕栽培システムで生産した甘草の安全性と有効性についてのデータを蓄積

する必要がある。本研究では、安全性評価として、甘草市場流通品と人工水耕栽培品における変異原性試験による評価と有毒微量元素（ヒ素および重金属類）の定量を行った。有効性評価としては、異なる要因から惹起されるアレルギー炎症の抑制作用に着目し、両甘草品を評価するための評価系を構築した。従来生薬で報告されてきた安全性と薬理効

果を複数のクローンの水耕栽培甘草を用いて検討することにより、生薬としての価値を維持した機能的クローンを同定する。それにより、品質の安定化と確実な国内供給に結びつくことを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 従来生薬甘草市場流通品と人工水耕栽培品の変異原性試験における比較

#### ①試料

市場流通品および水耕栽培の甘草は（独）医薬基盤研究所より提供を受けた。

市場流通品三種、すなわち NIB-003、NIB-074、NIB-176 および、水耕栽培品三種、GuIV2③-43、GuIV2⑥-2、GuIV2⑥-13 の計六種の甘草熱水抽出エキスを試料として検討に用いた

調製法を要約すると、カンゾウ根粉砕物 20 g を 200 mL の抽出溶媒（超純水）に加え、100°C で 2 時間煮沸した。得られたエキスに凍結乾燥処理を 7 時間施し、非晶質の形態として試料に用いた。試料は -80 °C で保存した。

#### ②エキス調製液と希釈について

試料エキスを秤量し、Dimethyl sulfoxide (DMSO、和光純薬工業株式会社、大阪) を加えた後、超音波処理により懸濁し、調製液とした。(本試験 I: 50.0 mg/mL、本試験 II: 6.25 mg/mL)。この濃度を最高濃度とし、以下同溶媒で 2 倍ずつ段階希釈をした(用時調製)。調製濃度は以下に示す。本試験 I: 50.0、25.0、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 mg/mL) 本試験 II: 6.25、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977 mg/mL)

#### ③細菌株・培地・添加物について

使用細菌株

・ヒスチジン要求性細菌株：  
*Salmonella typhumurium* TA100、TA1535、は一塩基変異を検出するものとして、TA98、TA1537 はフレームシフト型変異を検出するものとして使用

・トリプトファン要求性細菌株：*Escherichia coli* WP2 *uvr0A*

培地：Nutrient Broth (Becton Dickinson Co, Ltd., Franklin Lakes, NJ)、最少グルコース寒天平板培地 (DZAD6M01、極東製薬工業株式会社、東京)

添加物：S-9 mix (雄ラット肝臓由来代謝活性化酵素、Lot: RAA-650、キッコーマン株式会社、千葉)

#### ④培養方法

試験前日に種菌株懸濁液を溶解しニュートリメントブイヨン培地 10mL に接種する。37°C で 14 時間振とう培養後、15 mL 滅菌チューブに移し、使用直前まで水中に静置した。エキスや酵素の希釈や準備が整った後に細菌をよく混和し、②で用時調製したエキスの希釈液各 100  $\mu$ L と S-9 mix、あるいは緩衝液のみを試験管内で混合し、37°C、20 分のブレインキュベーションを行った。その後、寒天平板培地上に細菌を播種し、37°C、48 時間の培養を行った。各プレート当たりのエキス試料の量は以下のとおりである。本試験 I: 5000、2500、1250、625、313、156、78.1  $\mu$ g/plate、本試験 II: 625、156、78.1、39.1、19.5、9.77  $\mu$ g/plate

NIB-176 および GuIV2③-43、GuIV2⑥-2、GuIV2⑥-13 に関しては本試験 II も行った。NIB-176 は TA1535、TA98 および TA1537 を用いて、GuIV2③-43、GuIV2⑥-2、GuIV2⑥-13 は TA1537 を用いて、S9 mix 非存在下について検討した。

陰性対照にはエキス調製液の希釈媒体 (DMSO) を 100  $\mu$ L 加え、陽性対照については変異誘導物質 (表を参照) を加えて上記と同様の操作を行った。

陰性対照あるいは陽性対照の変異コロニー数の平均値をそれぞれ陰性対照値あるいは陽性対照値とした。なお、陰性対照値および陽性対照値は同時に実施した四試験は共通に用いた (GuIV2③-43、GuIV2⑥-2、GuIV2⑥-13、および NIB-176)。

NIB-003 については DMSO を媒体として実施した試験において培養後の平板上に雑菌が認められ、コロニー計測を正確に行うことが不可能であった。この結果を踏まえて行

った予備検討の結果、70 v/v%エタノールを用いて調製したエキス調製液については均一性が良好な懸濁液であり、培養後の平板上に雑菌は認められなかった。したがって70 v/v%エタノールを媒体に選択して本試験を実施した。

NIB-003 を秤量し、超音波処理により70 v/v%エタノール\*に懸濁した後、段階希釈を行い各濃度のエキス調製液を作製した。

\*日局注射用水（製造番号：K1J87、株式会社大塚製薬工場、東京）およびエタノール（Lot: DCE2074、和光純薬工業）を3:7の割合で要時に混合して調製した。

## 2. 市場流通品および人工水耕栽培品に含まれるヒ素および重金属の測定

すべての過程で用いる器具および容器は3N HNO<sub>3</sub> で洗浄し、超純水で置換した後に乾燥させたものを使用した。

### ①試験試料

市場流通品4検体、NIB-003、NIB-007、NIB-074、NIB-176 および、水耕栽培品3検体、GulV2③-43、GulV2⑥-2、GulV2⑥-13の計7検体の甘草粉砕物を試料とした。

### ②予備試験

#### ②-1 試料 甘草市場流通品4検体

1. NIB-003
2. NIB-007
3. NIB-074
4. NIB-176

#### ②-2 灰化法

予備試験は、甘草市場流通品4検体について、既存のプロトコールに従った灰化法により遂行した<sup>1)</sup>。添加回収試験を行うにあたり、市場流通品の中で最もヒ素および重金属含量の少ない試料を選択するために行ったものであり、最適化する以前の手法である。

各試料約3.0 gを秤量し、高速振動試料粉砕機 TI-200 (株式会社平工製作所、福島)により、1分間試料を粉砕した。プラスチック製

スパーテルを用い、0.1 gを正確に秤量し、マイクロ波分解装置用テフロン型密閉容器に入れた。さらに試料秤量後の微量な試料が残存したろ紙について計量を行い、秤量した重量より減じた。

試料をいれたテフロン容器に60%硝酸(13-1685-5、シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京)5 mLを加え、分解装置のチャンバーにセットし、マイクロ波分解装置 ETHOS One (マイルストーンゼネラル株式会社、神奈川)による密閉系湿式灰化を行った。

灰化プログラムの設定は別表に示す(図1)。灰化終了後、試料を回収、超純水で容器を洗いこみ、50 mLにメスアップし、予備試験の試液とした。

### ②-3 標準液

1. ヒ素 (013-15481、1,000 ppm、和光純薬工業)
2. 鉛 (124-0249、1,000 ppm、和光純薬工業)
3. カドミウム (036-16171、1,000 ppm、和光純薬工業)
4. 水銀 (1,000 ppm、ジーエルサイエンス株式会社、東京)

6%硝酸水溶液で各元素が2 ppmになるよう希釈した。その標準液をもとに、0.1 ppbまで段階希釈を行い、標準液とした。

標準液の濃度は以下に示す\*。

\*2,000、200、100、40、20、10、4、2、1、0.4、0.2、0.1、および0 ppb

### ②-4 試料の測定

灰化した試料4サンプルについて ICP-MS Agilent 7500c (アジレントテクノロジー株式会社、東京)により分析した。

分析の詳細については以下の通りである。積算時間：1秒、分析法：スタンダードモード (ノーガスモード)

### ③添加回収試験

予備試験により暫定的に測定した市場流

通品サンプルの中で各金属の含有が最も少ないと思われた NIB-007 を用いて添加回収実験を行った。

③-1 試料 市場流通品カンゾウ NIB-007

③-2 灰化法

甘草試料約 3.0 g を秤量し、高速振動試料粉碎機 TI-200 により、2 分間試料を粉碎した。プラスチック製スパーテルを用い、試料 0.1 g をそれぞれ秤量し、マイクロ波分解装置用テフロン型密閉容器に入れた(ブランク用；n=6、添加試料用；n=5)。さらに試料秤量後の微量な試料が残存したろ紙について計量を行い、秤量した重量より減じた。

そこに 60%硝酸(シグマアルドリッチジャパン合同会社) 5 mL と 35%塩酸(13-1685-5、シグマアルドリッチジャパン合同会社) 0.5 mL を加え、分解装置のチャンバーにセットした。灰化プログラムの設定は別表に示す(図 1)。プログラムを一回終了した後、チャンバー全体を浸水し、試料を室温まで下げ、容器を開けて圧を抜いた。目視により、プログラム 1 サイクルでは不十分であったため、再度 1 サイクル実行した。灰化終了後、再び試料が室温に下がるのを待ち、目視により灰化終了を確認した後に超純水でテフロン容器を洗いこみ、50 mL にメスアップしたものを試料とした\*。

(\*灰化直後は二酸化窒素の黄褐色～黄色を呈しているが、超純水で希釈すると呈色は消失する。希釈後も黄色く着色された状態になっている場合は有機物の残留によるものなので灰化をやり直す必要がある)

③-3 標準液と添加試料

標準液

予備試験の際の各元素の定量下限がおおよそ 0.4 ppb であったことから、添加試料は最終濃度 4 ppb になるように調製した。

標準液は 6%硝酸と 0.35%塩酸を含む水溶液で各元素が 2 ppm になるよう希釈した。その標準液をもとに、0.1 ppb まで段階希釈を行った。測定に用いた標準液の濃度は以下に示す\*。\*2,000、200、100、40、20、10、4、

2、1、0.4、0.2、および 0.1 ppb

添加試料

2 ppm の濃度の標準液より各試料 0.1 g 中に 100  $\mu$ L 添加し、試料を灰化させたのち、50 mL にメスアップして添加試料とした(最終濃度：4.0 ppb)。\*2,000、10、4、2、1、0.4、0.2、0.1 および 0 ppb

③-4 添加回収試験の測定法

灰化したブランク試料 6 サンプル、添加試料 5 サンプルについて ICP-MS により分析した。分析方法の詳細については以下の通りである。

積算時間：1 秒

分析法：鉛、カドミウム、水銀はスタンダードモード(ノーガスモード)。ヒ素のみ He ガスによるコリジョンモードを採用し、干渉イオンによるバックグラウンドの上昇を排除した。He ガス流量：1 mL/min

④本試験

添加回収試験にて、定量性を確認した後、市場流通品および人工水耕品カンゾウ残りの 6 試料について同様に分析した。

④-1 試料

市場流通品 4 検体

1. NIB-003
2. NIB-007
3. NIB-074
4. NIB-176

水耕栽培品 3 検体

1. GuIV2③-43
2. GuIV2⑥-2
3. GuIV2⑥-13

④-2 灰化法

市場流通品試料約 3.0 g を秤量し、高速振動試料粉碎機 TI-200 により、2 分間試料を粉碎した。水耕栽培品試料に関してはすでに粉碎されているものを使用した。その後の過程

については添加回収試験③-2と同様に行った。

#### ④-3 標準液

標準液は6%硝酸と0.35%塩酸を含む水溶液で各元素が2 ppmになるよう希釈した。その標準液をもとに、0.01 ppbまで段階希釈を行い、標準液とした。

測定に用いた標準液の濃度は以下に示す\*。  
\*2,000、10、4、2、1、0.4、0.2、0.1、0.04、0.02、0.01 および 0 ppb

#### ④-4 本試験の測定

灰化法、測定法ともに予備試験の際よりも最適化が進み、感度が上昇したため、ごく低濃度の微量元素を測定するにはさらなる最適化が必要であった。そこで積算時間の延長とヘリウムガス流量についての検討を行い、分析を行った。分析条件の詳細については以下の通りである。

積算時間：9秒

分析法：鉛、カドミウム、水銀はスタンダードモード（ノーガスモード）。ヒ素のみ He ガスによるコリジョンモードを採用し、干渉イオンによるバックグラウンドの上昇を排除した。He ガス流量：5 mL/min

### 3. 甘草熱水抽出エキスの抗アレルギー活性評価系の構築

#### ①試料

市場流通品 3 種、すなわち NIB-003、NIB-074、NIB-176 および、水耕栽培品 3 種、GulV2③-43、GulV2⑥-2、GulV2⑥-13 の計 6 種の甘草熱水抽出エキスを試料として検討に用いた。

#### ②動物および細胞、抗体、アレルゲン等 マウス

雌、6週令、BALB/c

#### 細胞と抗体

TNP(2, 4, 6-Trinitrophenol)特異的 IgE 抗体はハイブリドーマ IGELb4 (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA) を

BALB/c マウスの腹腔に播種し、腹水を回収し定量した。

#### 抗体の調製法

CrIj: CD1-Foxn1<sup>tm</sup> マウス (ICR nude; 週令 5 週、雌) はハイブリドーマ接種 7 日以前にあらかじめ腹腔に pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane, P7820、シグマアルドリッチ合同会社) を投与し、ハイブリドーマの生着と抗体産生が効率よく行われるよう処置を施した。

IGELb4 は 4 mM L-Glutamine、4,500 mg/L Glucose、1 mM Sodium pyruvate、1,500 mg/L NaHCO<sub>3</sub>、20% Fetal bovine serum を含んだ Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) で継代した。細胞の増殖曲線が対数期 (Log phase) を保っている時期に細胞を回収し、PBS (-) で 2 度洗浄後、1 x 10<sup>6</sup> cells/0.2 mL/マウスの濃度で PBS(-) に再懸濁し、マウスの腹腔に投与した。

投与後、ほぼ 2 週間 (10~14 日) で貯留した腹水を 18G の針を腹部に刺し、体外に流出させた。その際にあらかじめヘパリンを適宜入れた 15 mL コニカルチューブを用意しておき、針から流れてくる腹水を受けた。

回収した腹水は 2000 rpm、室温で遠心分離をし、細胞成分および凝固タンパク等を除いた。その後ろ紙でろ過し、最終的に 0.45 μm のシリンジフィルター (SLHV033R, Merck & Co., Whitehouse Station, NJ) を通し不純物を除いた。さらに透析膜バイオテック CE メンブレン (131417, 100 kDa, Spectrum Laboratories, Inc., St. Rancho Dominguez, CA) を用いて PBS(-) で透析した。透析後再度 0.45 μm のシリンジフィルターを通過させ、滅菌処理を施したのち、ELISA によって IgE 量を定量した。Mouse IgE ELISA MAX Deluxe (432404, BioLegend Company, San Diego, CA) を用いて Sandwich ELISA を行い TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) で発色させた後に、マイクロプレートリーダー (Ultramark, Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA) で 450 nm の吸光度を測定した (参照波長: 570 nm)。

#### アレルゲン

TNP11-conjugated OVA (Ovalbumin) (T-5051-10, Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA)



### ③三相型アレルギーモデルマウスの病態誘導

BALB/c (7 週令、雌)に抗 TNP-IgE 抗体 (11-300 µg/mice) を尾静脈より注射し、疑似感作状態を獲得したのち (Sensitization, day -1)、一日後にアレルゲンである TNP11-OVA (10 µg/10 µL) を耳介の皮内に投与した (Challenge, day 0)。

Challenge 後 2 時間は 30 分間隔で、その後は 2 時間間隔で 12 時間まで耳介の腫脹を測定した。その後、24 時間後 (day 1)、48 時間後 (day 2)、と day 8 に至るまで 1 日 1 回ずつ計測を行った。

耳介の腫脹はダイヤル・シックネス・ゲージ (G-1A、株式会社尾崎製作所) で測定した。

カンゾウエキス経口投与群は、50 mg/kg の量で、Challenge 2 時間前、day 1 より day 5 まで反復投与、プレドニゾロン 21 経口投与群は、10 mg/kg の量で、Challenge 2 時間前、day 1 より day 5 まで隔日投与を行った。三相の炎症反応と投薬のタイミングについては、別図に示す (図 3、A および B)。

### ④接触性皮膚炎モデルマウスの病態誘導

BALB/c (7 週令、雌)の側腹部の体毛を感作開始 2 日前にバリカンで剃毛する (day-2)。感作開始日を day 0 とし、2, 4, 6-trinitrochlorobenzene (TNCB)をアセトン:オリブ油を 4:1 で混合した溶媒に溶解し、5%TNCB 溶液を 150 µL 側腹部に塗布した (Sensitization、day 0)。Day 7 に 1% TNCB を耳介に 20 µL 塗布し (Challenge、day 7)、day 8 (24 時間後)、day 9 (48 時間後)の耳介の腫脹を測定した。

カンゾウエキス経口投与群は、50 mg/kg の量で、day 0 より challenge 前日の day 6 まで計 7 回反復投与した (図 4)。

これらの動物実験はヘルシンキ宣言に示された倫理的原則の遵守と、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に基づき、国立医薬品食品衛生研究所、動物実験審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1. 従来生薬甘草市場流通品と人工水耕栽培品の変異原性試験における比較

#### 市場流通品 NIB-003

試験の結果を表 1 に示す。TA100、TA1535 および TA98 の S9 mix 非存在下においては 1,250 µg/plate 以上の用量で、TA1537 の S9 mix 非存在下においては 625 µg/plate 以上の用量で、TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の S9 mix 存在下においては 2500 µg/plate 以上の用量で生育阻害が認められた。WP2 *uvrA* においては、生育阻害は認められなかった。変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。以上の結果から NIB-003 は、当該実験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない、すなわち陰性と判定した。

#### 市場流通品 NIB-074

試験の結果を表 2 に示す。TA100 の S9 mix 非存在下においては 1,250 µg/plate 以上の用量で、TA1535 の S9 mix 非存在下においては 313 µg/plate 以上の用量で、TA98 および TA1537 の S9 mix 非存在下においては 156 µg/plate 以上の用量で、TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の S9 mix 存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で生育阻害が認められた。WP2 *uvrA* においては、生育阻害は認められなかった。変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。以上の結果から NIB-003 は、当該実験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない、すなわち陰性と判定した。

#### 市場流通品 NIB-176

本試験 I と II の結果を表 3-A、B に示す。TA100 の S9 mix 非存在下においては 1,250 µg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 および TA1537 の S9 mix 非存在下においては 156 µg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 および TA1537 の S9 mix 存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で生育阻害が認められた。TA100 の S9 mix 存在下および WP2 *uvrA* においては、生育阻害は認められなかった。変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

本試験 I の結果に基づき、TA1535、TA98 および TA1537 の S9 mix 非存在下において

は生育障害の認められない用量が 4 用量以上得られなかったことから、用量を下げた本試験 II を実施した。その結果、用いたすべての検定菌において、156 µg/plate の用量で、生育障害が認められた。変異コロニー数は陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。以上の結果から NIB-176 は、当該実験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない、すなわち陰性と判定した。

#### 水耕栽培品 GulV2③-43

本試験 I と II の結果を表 4-A、B に示す。本試験 I の結果、TA100 の S9 mix 非存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 2,500 µg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 の S9 mix 非存在下においては 1,250 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で、TA1537 の S9 mix 非存在下においては 156 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 2,500 µg/plate 以上の用量で生育障害が認められた。WP2 *uvrA* においては、生育障害は認められなかった。変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

本試験 I の結果に基づき、TA1537 の S9 mix 非存在下においては生育障害の認められない用量が 4 用量以上得られなかったことから、用量を下げた本試験 II を実施した。その結果、156 µg/plate の用量で、生育障害が認められた。変異コロニー数は陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。以上の結果から GulV2③-43 は、当該実験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない、すなわち陰性と判定した。

#### 水耕栽培品 GulV2⑥-2

本試験 I と II の結果を表 5-A、B に示す。本試験 I の結果、TA100 の S9 mix 非存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 2,500 µg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 の S9 mix 非存在下においては 1,250 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で、TA1537 の S9 mix 非存在下においては 156 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 2,500 µg/plate 以上の用量で生育

障害が認められた。WP2 *uvrA* においては、生育障害は認められなかった。変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

本試験 I の結果に基づき、TA1537 の S9 mix 非存在下においては生育障害の認められない用量が 4 用量以上得られなかったことから、用量を下げた本試験 II を実施した。その結果、156 µg/plate の用量で、生育障害が認められた。変異コロニー数は陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

以上の結果から GulV2⑥-2 は、当該実験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない、すなわち陰性と判定した。

#### 水耕栽培品 GulV2⑥-13

本試験 I と II の結果を表 6-A、B に示す。本試験 I の結果、TA100 の S9 mix 非存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 2,500 µg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 の S9 mix 非存在下においては 1,250 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 5,000 µg/plate 以上の用量で、TA1537 の S9 mix 非存在下においては 156 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 2,500 µg/plate 以上の用量で生育障害が認められた。WP2 *uvrA* においては、生育障害は認められなかった。変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

本試験 I の結果に基づき、TA1537 の S9 mix 非存在下においては生育障害の認められない用量が 4 用量以上得られなかったことから、用量を下げた本試験 II を実施した。その結果、156 µg/plate の用量で、生育障害が認められた。変異コロニー数は陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

以上の結果から GulV2⑥-13 は、当該実験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない、すなわち陰性と判定した。

## 2. 市場流通品および人工水耕栽培品に含まれるヒ素および重金属の測定

### ① 予備試験結果

市場流通品カンゾウ 4 試料 (NIB-003、NIB-007、NIB-074、NIB-176) について、既

存のプロトコールに従った灰化法により遂行した。添加回収試験を行うにあたり、市場流通品試料の中で最もヒ素および重金属含量の少ない試料を選択するために行ったものであり、最適化する以前の方法である（表7-A、B）。

#### 試料重量

NIB-003...0.13257 g  
 NIB-007...0.11806 g  
 NIB-074...0.10199 g  
 NIB-176...0.10148 g

#### 試料液の測定値 ppb (ng/mL)

50 mL に調整した試料液の定量下限については以下の同位体を指標にして定めた。

ヒ素	<sup>75</sup> As	0.4 ppb
カドミウム	<sup>111</sup> Cd	0.4 ppb
水銀	<sup>200</sup> Hg	0.4 ppb
	<sup>202</sup> Hg	0.4 ppb
鉛	<sup>208</sup> Pb	1.0 ppb

#### ・ NIB-003

ヒ素	0.90 ppb
カドミウム	検出限界以下
水銀	( <sup>200</sup> Hg) 定量下限未満 (0.33 ppb)
	( <sup>202</sup> Hg) 定量下限未満 (0.36 ppb)
鉛	1.01 ppb

#### ・ NIB-007

ヒ素	定量下限未満 (0.30 ppb)
カドミウム	検出限界以下
水銀	( <sup>200</sup> Hg) 定量下限未満 (0.24 ppb)
	( <sup>202</sup> Hg) 定量下限未満 (0.25ppb)
鉛	定量下限未満 (0.30ppb)

#### ・ NIB-074

ヒ素	定量下限未満 (0.30 ppb)
カドミウム	検出限界以下
水銀	( <sup>200</sup> Hg) 定量下限未満 (0.20 ppb)
	( <sup>202</sup> Hg) 定量下限未満 (0.24ppb)
鉛	定量下限未満 (0.27ppb)

#### ・ NIB-176

ヒ素	定量下限未満 (0.30 ppb)
カドミウム	定量下限未満 (0.20 ppb)
水銀	( <sup>200</sup> Hg) 定量下限未満 (0.20 ppb)
	( <sup>202</sup> Hg) 定量下限未満 (0.23ppb)
鉛	定量下限未満 (0.31ppb)

この値を材質あたりの含有量 (μg/g、ppm) に換算したところ、NIB-003 を除いたすべての試料がすべての元素において、定量下限未満であったため、定量に至らなかった。

そこで試料濃度を反映する積算値を比較したところ NIB-007 が最も元素の含有量が低いことが予想されたため、測定精度を確認する添加回収試験には NIB-007 を用いることとした。

#### ②添加回収試験

予備試験のプロトコールに従って灰化と測定を行ったところ、以下のような問題点があげられた。

1. ヒ素の回収率が高すぎる (>120%)
2. 水銀の回収率が低すぎる (40~45%)
3. 水銀に関しては、<sup>200</sup>Hg と <sup>202</sup>Hg による換算値の違いに対する根拠を考察する必要がある。

2に関しては、当初は測定機器のラインへの水銀の吸着を考えた。しかしながら、1に見られるように、ヒ素の増感作用が有機物によるものだとしたら、試料の灰化が不十分である可能性が想定され、残留した有機物への水銀の吸着を排除するためにも、灰化条件を再検討するに至った。また、1の原因としてプラズマを構成するアルゴンガスと塩素の反応による <sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl、試料中の共存元素に由来する <sup>40</sup>Ca<sup>35</sup>Cl によるバックグラウンドの上昇も明らかになり、測定条件の再検討も必須であることが判明した。

3に関してはその後の検索により、微量ではあるがタングステン(W)に由来する酸化物イオン (<sup>184</sup>W+<sup>16</sup>O<sup>+</sup>=200、<sup>186</sup>W+<sup>16</sup>O<sup>+</sup>=202) とピークが重なるためにおこりうるバックグラウンドの影響を考え、水銀の同位体は <sup>201</sup>Hg をモニターすることとした。

以上のことから灰化溶媒、灰化温度、灰化時間、測定モード、同位体の選択について検討し、変更したプロトコールで添加回収試験を行った結果、以下の結果が得られた(表8)。添加試料は予備試験の定量限界である0.4 ppbの10倍である4.0 ppbのポイントを用いた。

ヒ素	<sup>75</sup> As	98.9% (RSD : 3.7%)
カドミウム	<sup>111</sup> Cd	97.0% (RSD : 1.9%)

水銀	<sup>201</sup> Hg	98.3% (RSD : 2.7%)
鉛	<sup>208</sup> Pb	103.0% (RSD : 4.2%)

### ③市場流通品および水耕栽培品中のヒ素および重金属の測定

数回の分析により、定量下限付近の微量元素の測定は、同じ試料を繰り返し測定した場合でも、測定値が変動しやすく、信頼値を得ることが困難であった。そこで、定量下限の定義を明確にする必要があると考えられた。そこで当該試験の定量下限として以下の二点を定義することとした。

1. モニターした質量のカウント(cps; count per second)三回の平均値のRSDが5%以内であること。
2. 作成した検量線の方程式にcpmの平均値を代入して、求められた濃度と設定した濃度の差が±10%以内であること。

また、特にヒ素に関しては、干渉イオンを排除する条件をさらに検討する必要があると考えられ、<sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl、<sup>40</sup>Ca<sup>35</sup>Clに衝突、分解させるHeガスの流量について毎分0 mLから5 mLの間で検討した。その結果1 ppbのヒ素を測定する場合、最もブランクと測定値の差が得られ、バックグラウンド相当量を抑えすぎない条件として、5 mL/minでHeガスを流すことが適切であることが考えられた(図1)。

また、データの積算時間を1秒から9秒に延長し、低濃度でも再現性の高い積算値(cps)が得られるようにした。

以上の変更点を踏まえて測定した結果が表9である。材質あたりの濃度について簡単にまとめると、以下ようになる(表9)。

市場流通品	
ヒ素	検出限界以下~0.36 ppm
カドミウム	定量下限以下~0.13 ppm
水銀	検出限界以下~定量下限以下
鉛	0.20~0.49ppm
水耕栽培品	
ヒ素	検出限界以下
カドミウム	検出限界以下~定量下限以下
水銀	検出限界以下~定量下限以下
鉛	0.21~0.36 ppm

ヒ素、カドミウムの測定値を見る限りでは水耕栽培品の方が有害元素の含有量が低い印象を受ける。水銀に関しては市場流通品、水耕栽培品ともに定量値は得られなかった。

定量値を得られた鉛に関して有意差検定を行った結果、 $p=0.396$ であり、2郡の間に有意差は得られなかった。

すなわち、水耕栽培品と従来市場流通品のヒ素および重金属の含有量はいずれも基準値以下であったが、ヒ素とカドミウムに着目すると、水耕栽培品のほうがより安全性が高いことが確認された。

### 3. 甘草熱水抽出エキスの抗アレルギー活性評価系の構築

#### ①三相型アレルギーマウス系へのカンゾウエキス経口投与の影響

TNP(2, 4, 6-Trinitrophenol)特異的 IgE抗体は作成し、マウスモデル評価系を構築中である。

#### ②接触性皮膚炎モデルマウスへのカンゾウエキス経口投与の影響

確立した病態モデルマウスの耳介を測定したところ、24時間後は90 μm、48時間後は60μm前後の腫脹が観察された。現在予備実験の段階なので、腫脹の程度、およびカンゾウエキスによる抑制効果についての結果は得ていない。しかしながら、グリチルリチン酸モノアンモニウムを経口投与した実験では、人の十倍量にあたる用量を投与し、約50%程の腫脹抑制が認められており、準備が整い次第、検討と解析に着手する方針である。

### D. 考察

#### 1. 従来生薬甘草市場流通品と人工水耕栽培品の変異原性試験における比較

大別すると、トリテルペン配糖体とカルコン配糖体、あるいはフラバン配糖体などを有効成分として含む *Glycyrrhiza uralensis* の根およびストロンは<sup>1)</sup>、生薬としてだけでなく、甘味料、あるいは酸化防止剤として食品添加物・既存添加物名簿に記載されている<sup>2, 3)</sup>。また、動物用医薬品としてもカンゾウ末から精製したグリチルリチン酸の誘導体が承認されており、間接的に摂取した場合の安全性評価も十分検討されてきた<sup>4)</sup>。本研究で使用した熱水抽出エキスは、トリテルペン配糖体であるグリチルリチン酸類を優位に含有し

ていることより、煎じ薬としての生薬、あるいは甘味料としての安全性を評価するものといえよう。

本検討により、水耕栽培品は市場流通品同様、Ames 試験において変異原性陰性という結果を得ることができた。

検討の過程で、カンゾウエキスによるダイレクトな生育阻害により、156 µg/plate 以下の濃度で検討する実験 II を行った例が 6 検体中 4 検体存在した。これらはほぼ特定の条件下で類似の抗菌活性を示していることはとても興味深い。

本来、グリチルリチン精製物はグラム陽性菌、陰性菌ともに抗菌試験は陰性と評価されているが<sup>9)</sup>、その一方で油性分画あるいはアルコール抽出を施したフラボノイドやカルコン類には一部のグラム陽性菌と、多くのグラム陰性菌に対する抗菌作用が報告されている<sup>6, 7, 8)</sup>。熱水抽出エキスを用いた今回の検討では、混入したフラボノイド分画由来の抗菌活性が、サルモネラ菌に対して発現した可能性が容易に想定されるが、生薬という crude な天然化合物である故に、副組成物や混入物による影響も評価の対象となると考えられた。さらに興味深いことに、エキスそのものではサルモネラ菌に生育阻害を示した場合でも、代謝活性化酵素とのプレインキュベーションによりすべて生育阻害能が緩和されている。代謝物質は生体内で穏やかに生理活性を発揮する現象の一例が *in vitro* で示された。また、それにより変異原性を評価できるエキス濃度が高くなったことは、安全性を評価する上で重要なことであったと考える。

遺伝毒性試験には、本検討である Ames 試験による変異原性試験の他に、*in vitro* 染色体異常試験、*in vivo* あるいは *in vitro* の小核試験の二つが一般的に行われており、カンゾウエキスから精製したグリチルリチン酸モノアンモニウムではいずれの試験も陰性であることが報告されている<sup>9)</sup>。我々の検討した熱水抽出エキスでのさらなる評価が必要であれば取り組むことも視野に入れている。

## 2. 市場流通品および人工水耕栽培品に含まれるヒ素および重金属の測定

植物は大気、水、あるいは土壤中から様々な元素を取り込む。カンゾウは根およびスト

ロンを利用する植物であることから特に土壤中に含まれる元素の影響を受けやすいことが懸念される。現在、カンゾウ由来の生薬原料、食品添加物原料には日本薬局方、食品添加物公定書ともに鉛(10 µg/g)とヒ素(5 µg/g)以内に基準値が定められている<sup>1, 2)</sup>。しかしながらこの数値は標準液との比濁法、あるいは比色法で基準以内であることを確認するものであり、定量性を伴うものではない。定量的なデータを蓄積する必要があると同時に他の重金属、天然に広く分布し、食品衛生法でも有害であることが特に指摘されるカドミウムと水銀を含めた分析を本研究の安全性評価とした。

当初、野生の市場流通品に関しては、無機元素だけではなく、毒性の高い有機化合物、例えばメチル水銀などの測定も視野に入れていたが<sup>10)</sup>、我々の行った水銀についての測定値を見る限りでは、定量下限以下、あるいは検出限界以下であった。すなわち、今回の我々の実験系では検知できない。

2008 年の報告によると、土壤金属の影響を受けやすいと考えられる根あるいは根茎を原料とする植物生薬 20 種類の分析をヒ素、水銀、カドミウム、鉛について行ったところ、これらの元素の混入が特に低い植物生薬の一つに、甘草があげられている<sup>11)</sup>。我々の分析結果でも、市場流通品の甘草からは、野生種にも拘わらず、ヒ素以外はほとんど水耕栽培品と同等の安全性が示唆されている。しかしながら、数種類の生薬を配合する漢方処方では、それぞれの生薬の有害物質の濃度を可能な限り抑え、複数の生薬由来の有害物質を混入させないことも必要だと考えられる。管理された環境下で生育する水耕栽培品は、必然的に重金属の混入経路が限定され、結果としてヒ素に関してはすべての検体が検出限界以下で、市場流通品よりもさらに高い安全性が示唆された。唯一、鉛については市場流通品(野生品)、水耕栽培品ともにすべての検体でほぼ同等の含有量を測定したが、いずれの検体も基準値の 1/20 以下だった。鉛混入の原因として野生品では土壌、大気、水等が考えられ、水耕栽培品では水道水あるいは肥料が考えられた。しかし、今回の分析による含有量が同等といえども、日本の水道水の水質基準の安全性を考慮すると<sup>12)</sup>、今後はさらに安定した品質の水耕栽培品が収穫可能

になることが予想される。

本分析以上に安全性についてのデータを収集するのであれば、比較的土壌の表層に蓄積しやすい、亜鉛や銅、クロムやセレンなど他の金属<sup>13)</sup>、または農薬などの化学物質、さらに放射性同位元素などの混入や曝露を検討項目に入れても、水耕栽培品の優位性が示される可能性は高いことが期待される。

### 3. 甘草水溶性抽出分画の抗アレルギー活性評価系の構築

甘草の主成分であるグリチルリチン酸による抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍効果等は数多く報告されている。マウスを用いた解析では、様々な疾患モデルで、病態の改善が試みられている。本研究で取り上げた解析系も、過去に効果がすでに報告されているモデルである<sup>14)</sup>。

かなり以前から知られていた薬理効果を担う機序のひとつに、ステロイド代謝に関する経路が有名である。グリチルリチン酸のアグリコン、グリチルレチン酸は、副腎皮質ホルモンの一つ、糖質コルチコイドに分類される活性型ホルモン、コルチゾールを不活性型のコルチゾンに変換する酵素の活性を抑制する<sup>15)</sup>。このホルモンのレセプターは細胞質でリガンドと会合した後、核内に移行し、転写因子様の機能を経て、様々な機能分子の発現を上昇させる<sup>16, 17)</sup>。その中には細胞内シグナルタンパク質や細胞表面分子<sup>18, 19)</sup>あるいは、サイトカインやケモカインなどの液性因子の発現<sup>20)</sup>をも修飾する分子を含むことから、全身的な免疫応答を制御する可能性もあると考えられている。また、コルチゾールは糖質コルチコイドレセプター (Glucocorticoid receptor; GR) だけでなく、鉱質コルチコイドレセプター (Mineralcorticoid receptor; MR) にも高い親和性をもち<sup>21)</sup>、過剰に存在することにより本来のリガンドであるアルドステロン様の疑似リガンドとして結合し、尿細管からのナトリウムの再吸収とカリウムの排泄を促す結果となる<sup>22)</sup>。

このようにグリチルリチン関連物質は、内分泌系を通じて、機能遺伝子の発現を制御し、神経系や生殖器系を含む様々な局所の分子のクロストークに影響を与えている可能性が示唆されている。同時に体内のイオンバラ

ンスの均衡にも関与することから、個体の恒常性にも深く関連するものと思われ、非常に興味深い。

## E. 結論

### 1. 従来生薬甘草市場流通品と人工水耕栽培品の変異原性試験における比較

本研究で使用した甘草、従来生薬市場流通品3検体 (NIB-003、NIB-074、NIB-176) および水耕栽培品3検体 (GuIV2 ③-43、GuIV2 ⑥-2、GuIV2 ⑥-13) について Ames 試験法による変異原性試験を行ったところ、市場流通品同様、水耕栽培品に関しても、遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。以上により Ames 法による変異原性試験は陰性であり、従来生薬市場流通品と水耕栽培品が変異原性において同等であることが示唆された。

### 2. 市場流通品および人工水耕栽培品に含まれるヒ素および重金属の測定

市場流通品からは3検体からヒ素 (0.16-0.49 ppm) 1検体からカドミウム (0.13 ppm) 4検体すべてから鉛 (0.2-0.49 ppm) が定量された。水耕栽培品からはヒ素は検出限界以下、カドミウム、水銀は定量下限以下であった。また鉛については市場流通品同様、すべてのサンプルから定量値を得た (0.21-0.36 ppm)。いずれの甘草も、ヒ素、鉛に関しては日本薬局方、食品添加物公定書の基準値の1/10以下の濃度であった。

水耕栽培品はヒ素、カドミウムに関して市場流通品より混入度が少なく、市場流通品同等以上の安全性が確認された。水銀に関して定量下限以下で、安全性に懸念はないものと考えられる。鉛に関しては市場流通品と同等の蓄積が認められ、その量に有意差はなかった。

以上のことから水耕栽培品は重金属の混入する経路が限定される為 (水、肥料、容器など)、より安全性の高い生薬を得ることのできる可能性が示唆された。

### 3. 甘草水溶性抽出分画の抗アレルギー活性評価系の構築

三相型アレルギーマウスの病態モデルを現在構築中である。また、接触性皮膚炎マウス病態モデルの構築は完了し、予備実験としてグリチルリチン酸モノアンモニウムの経

口投与を行ったところ、耳介の腫脹が抑制された。

#### 参考文献

- 1) Mohamed A Farag, et al. 2012. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medical licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques *Phytochemistry*. 76: 60-72.
- 2) 厚生労働省 2011 第十六改正 日本薬局方
- 3) 厚生労働省 2009 第 8 版食品添加物公定書
- 4) 食品安全委員会 動物用医薬品専門委員会 2007 年 10 月. グリチルリチン酸モノアンモニウムを有効成分とする牛の乳房注入剤 (マストリチン) 動物用医薬品評価書.
- 5) 農林水産省、マストリチン動物用医薬品製造承認申請書添付資料：薬理試験
- 6) He J, et al. 2006. Antibacterial compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *J Nat Prod*. 69(1):121-4.
- 7) Asl MN, et al. 2008. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. And its bioactive compounds *Phytother Res*. 22: 709-724
- 8) Gafner S, et al. 2011. Isoflavonoids and coumarins from *Glycyrrhiza uralensis*: antibacterial activity against oral pathogens and conversion of isoflavans into isoflavan-quinones during purification. *J Nat Prod*. 74(12):2514-9.
- 9) 農林水産省、マストリチン動物用医薬品製造承認申請書添付資料：毒性試験
- 10) Agilent Technologies, 2005. HPLC-ICP-MS による水および土壌に含まれるメチル水銀の定量
- 11) 塩田寛子ら、2008. 生薬中の重金属およびヒ素に関する含量調査 (第二報) 東京都健安研七周年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 59: 103-108
- 12) 社団法人 日本水道協会 (監修・水道法令研究会) 平成 24 年 4 月版 水道法関係法令集
- 13) 井上千弘、自然由来の重金属の土壌汚染 [http://mric.jogmec.go.jp/kouenkai\\_index/2011/briefing\\_111130\\_4.pdf](http://mric.jogmec.go.jp/kouenkai_index/2011/briefing_111130_4.pdf)
- 14) Yamamoto Y, et al., 2003, Pharmaceutical Evaluation of *Glycyrrhiza uralensis* Roots Cultivated in Eastern Nei-Meng-Gu of China *Biol. Pharm. Bull.*. 26(8): 1144-1149
- 15) Pennig T.M. et al. 1983. Inhibition of a major NAD(P)-linked oxidoreductase from rat liver cytosol by steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents and by prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 4504-4508
- 16) Levin ER. 2008. Rapid signaling by steroid receptors *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(5):R1425-30
- 17) Yoshikawa M., 1997. Effects of glycyrrhizin on immune-mediated cytotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol.*, 12: 243-248
- 18) Wang J., et al. 1998. Inhibitory effect of glycyrrhizin on NF-kappaB binding activity in CCl4- plus ethanol-induced liver cirrhosis in rats. *Liver* 18: 180-185
- 19) Ming-Zhi Zhang, et al. 2009. Inhibition of 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase type II selectively blocks the tumor COX-2 pathway and suppresses colon carcinogenesis in mice and humans *J Clin Invest* 119 (4) 876-885
- 20) Okamoto T. et al. 2000. The protective effect of glycyrrhizin on anti-Fas antibody-induced hepatitis in mice. *Eur. J Pharmacol.* 387: 229-232
- 21) Laurence Amer, et al. 2010 Aldosterone-producing adenoma and other surgically correctable forms of primary aldosteronism *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5: 9-21
- 22) Shibata S. et al. 2000. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi* 120(10):849-62
- 23) Mukai K, et al. 2005, Basophils Play a Critical Role in the Development of IgE-Mediated Chronic Allergic Inflammation Independently of T Cells and Mast Cells. *Immunity*, 23: 191-202

F. 健康危険情報  
なし

## G. 研究業績

### 1. 論文発表

1. Watanabe-Ishizuka, A., Akiyama, H., Kondo, K., Obitsu, S., Kawahara, N., Teshima, R., Goda, Y.: Determination of Cyanogenic Glycoside Linamarin in Cassava Flour using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19, 38-43 (2012).
2. Watanabe, S., Taguchi, H., Temmei, Y., Hirao, T., Akiyama, H., Sakai, S., Adachi, R., Urisu, A., Teshima, R.: Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction, *J. Agric. Food Chem*, 60, 2108-2115 (2012).
3. Ishizaki, S., Sakai, Y., Yano, T., Nakano, S., Yamada, T., Nagashima, Y., Shiomi, K., Nakao, Y., Akiyama, H.: Specific Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of Potentially Allergenic Salmonid Fish Residues in Processed Food, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 76, 980-985 (2012).
4. Tsuruda, S., Akaki, K., Hiwaki, H., Akiyama, H.: Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Omphalotus guepiniformis* and *Lentinula edodes*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 76, 1343-1349 (2012).
5. Katayama, S., Kukita, T., Ishikawa, E., Nakashima, S., Masuda, S., Kanda, T., Akiyama, H., Teshima, R., Nakamura, S. : Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells, *Food Chem.* 138, 757-761 (2013).
6. Yoshimura, M., Akiyama, H., Kondo, K., Sakata, K., Matsuoka, H., Amakura, Y., Teshima, R., Yoshida, T.: Immunological effects of oenothelin B, an ellagitannin dimer, on dendritic cells *Int J Mol Sci.* 14, 46-56 (2012).
7. 穂山浩、大月典子：カロテノイド摂取と食物アレルギー発症の予防、 *Functional Food*, 6, 191-197 (2013).

### 2. 学会発表

1. 大月典子、杉本直樹、多田敦子、伊藤裕才、東村豊、山田敬子、竹内正樹、中川誠、伊藤澄夫、穂山浩、コチニール色素中の夾雑

アレルギータンパク質検出法の確立、第104回日本食品衛生学会学術講演会、2012年、岡山

## H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



[表 1] NIB-003 の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 I)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	試験実施期間: 2012年9月24日より2012年9月27日										
		復 帰 変 異 数 コロニー数/plate(平均)										
		塩 基 対 置 換 型					フ レ ー ム シ フ ト 型					
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	74	97	7	12	36	26	16	22	8	12	
		( 86 )		( 10 )		( 31 )		( 19 )		( 10 )		
	9.77	81	74	13	4	28	30	16	30	8	8	
		( 78 )		( 9 )		( 29 )		( 23 )		( 8 )		
	19.5	85	104	4	12	29	27	20	21	4	5	
		( 95 )		( 8 )		( 28 )		( 21 )		( 5 )		
	39.1	89	77	5	6	26	23	17	28	5	10	
		( 83 )		( 6 )		( 25 )		( 23 )		( 8 )		
	78.1	97	75	8	11	27	24	25	24	4	7	
		( 86 )		( 10 )		( 26 )		( 25 )		( 6 )		
156	83	92	6	12	34	33	27	18	8	9		
	( 88 )		( 9 )		( 34 )		( 23 )		( 9 )			
313	81	91	13	7	30	30	17	25	14	9		
	( 86 )		( 10 )		( 30 )		( 21 )		( 12 )			
625	109	101	11	12	30	26	19	27	12 *	8 *		
	( 105 )		( 12 )		( 28 )		( 23 )		( 10 )			
1250	112 *	110 *	11 *	8 *	28	25	22 *	22 *	5 *	7 *		
	( 111 )		( 10 )		( 27 )		( 22 )		( 6 )			
2500	102 *	96 *	7 *	5 *	32	31	18 *	18 *	13 *	7 *		
	( 99 )		( 6 )		( 32 )		( 18 )		( 10 )			
5000	99 *	96 *	3 *	1 *	33	30	16 *	10 *	0 *	0 *		
	( 98 )		( 2 )		( 32 )		( 13 )		( 0 )			
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	107	101	13	12	43	41	40	41	22	11	
		( 104 )		( 13 )		( 42 )		( 41 )		( 17 )		
	78.1	124	126	10	9	34	41	30	40	11	14	
		( 125 )		( 10 )		( 38 )		( 35 )		( 13 )		
	156	121	136	10	7	41	26	42	42	11	12	
		( 129 )		( 9 )		( 34 )		( 42 )		( 12 )		
	313	132	101	13	20	38	29	40	37	16	10	
		( 117 )		( 17 )		( 34 )		( 39 )		( 13 )		
625	121	118	19	10	34	26	26	42	18	13		
	( 120 )		( 15 )		( 30 )		( 34 )		( 16 )			
1250	119	134	13	9	30	32	36	32	10	19		
	( 127 )		( 11 )		( 31 )		( 34 )		( 15 )			
2500	143 *	105 *	13 *	15 *	43	32	24 *	38 *	16 *	17 *		
	( 124 )		( 14 )		( 38 )		( 31 )		( 17 )			
5000	134 *	136 *	12 *	14 *	41	25	35 *	36 *	16 *	16 *		
	( 135 )		( 13 )		( 33 )		( 36 )		( 16 )			
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2		SA		AF-2		AF-2		9AA	
		用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01		0.5		0.01		0.1		80	
		コロニー数/plate	345	322	491	444	82	74	390	365	443	551
		( 334 )		( 468 )		( 78 )		( 378 )		( 497 )		
	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA		2AA		2AA		2AA		2AA	
		用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1		2		10		0.5		2	
コロニー数/plate		628	583	334	310	625	598	359	363	190	181	
	( 606 )		( 322 )		( 612 )		( 361 )		( 186 )			

陰性対照, 70 v/v%エタノール

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; 2AA, 2-Aminoanthracene

\*, 生育阻害が認められた。

[表 2] NIB-074 の細菌を用いる復帰突然変異試験 (本試験 I)

代謝活性化 系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	試験実施期間:2012年10月16日より2012年10月19日										
		復 帰 変 異 数 コロニー数/plate(平均)										
		塩 基 対 置 換 型					フ レ ー ム シ フ ト 型					
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	100	85	6	12	25	19	19	25	6	7	
		( 93 )		( 9 )		( 22 )		( 22 )		( 7 )		
	9.77	70	87	11	10	20	27	15	14	5	6	
		( 79 )		( 11 )		( 24 )		( 15 )		( 6 )		
	19.5	77	80	7	6	21	23	29	23	10	4	
		( 79 )		( 7 )		( 22 )		( 26 )		( 7 )		
	39.1	91	78	9	9	28	20	21	20	9	8	
		( 85 )		( 9 )		( 24 )		( 21 )		( 9 )		
	78.1	88	81	8	5	26	20	19	18	9	4	
		( 85 )		( 7 )		( 23 )		( 19 )		( 7 )		
	156	73	70	11	8	20	16	21 *	29 *	7 *	9 *	
	( 72 )		( 10 )		( 18 )		( 25 )		( 8 )			
313	82	85	11 *	10 *	22	23	21 *	19 *	9 *	6 *		
	( 84 )		( 11 )		( 23 )		( 20 )		( 8 )			
625	81	105	4 *	4 *	23	19	22 *	18 *	7 *	7 *		
	( 93 )		( 4 )		( 21 )		( 20 )		( 7 )			
1250	102 *	85 *	8 *	3 *	17	17	19 *	18 *	9 *	7 *		
	( 94 )		( 6 )		( 17 )		( 19 )		( 8 )			
2500 †	73 *	93 *	7 *	7 *	19	16	22 *	17 *	11 *	8 *		
	( 83 )		( 7 )		( 18 )		( 20 )		( 10 )			
5000 †	67 *	78 *	11 *	9 *	20	21	23 *	22 *	5 *	12 *		
	( 73 )		( 10 )		( 21 )		( 23 )		( 9 )			
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	86	78	9	7	37	39	29	20	11	14	
		( 82 )		( 8 )		( 38 )		( 25 )		( 13 )		
	78.1	110	114	3	10	38	33	24	26	19	17	
		( 112 )		( 7 )		( 36 )		( 25 )		( 18 )		
	156	113	101	8	8	32	40	29	35	20	16	
		( 107 )		( 8 )		( 36 )		( 32 )		( 18 )		
	313	98	102	11	6	28	31	33	27	12	14	
		( 100 )		( 9 )		( 30 )		( 30 )		( 13 )		
625	106	113	10	8	44	32	30	34	14	11		
	( 110 )		( 9 )		( 38 )		( 32 )		( 13 )			
1250	116	107	11	6	32	27	33	30	17	18		
	( 112 )		( 9 )		( 30 )		( 32 )		( 18 )			
2500	93	109	8	8	38	34	27	32	15	13		
	( 101 )		( 8 )		( 36 )		( 30 )		( 14 )			
5000	81 *	65 *	7 *	7 *	33	26	30 *	24 *	10 *	15 *		
	( 73 )		( 7 )		( 30 )		( 27 )		( 13 )			
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	AF-2		SA		AF-2		AF-2		9AA	
		用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01		0.5		0.01		0.1		80	
	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数/plate	317	332	444	510	99	84	371	396	191	201
		( 325 )		( 477 )		( 92 )		( 384 )		( 196 )		
名称		2AA		2AA		2AA		2AA		2AA		
用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1		2		10		0.5		2			
コロニー数/plate	624	637	298	299	568	519	361	350	161	151		
	( 631 )		( 299 )		( 544 )		( 356 )		( 156 )			

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

\*, 生育阻害が認められた。

[表 3] A. NIB-176 の細菌を用いる復帰突然変異試験 (本試験 I)

代謝活性化 系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	試験実施期間: 2012年8月21日より2012年8月24日										
		復 帰 変 異 数      コロニー数/plate (平均)										
		塩 基 対 置 換 型					フ レ ー ム シ フ ト 型					
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	76	83	11	8	32	27	15	19	9	7	
		( 80 )		( 10 )		( 30 )		( 17 )		( 8 )		
	78.1	96	91	8	8	31	25	19	16	10	10	
		( 94 )		( 8 )		( 28 )		( 18 )		( 10 )		
	156	83	79	7 *	13 *	27	29	14 *	18 *	6 *	8 *	
		( 81 )		( 10 )		( 28 )		( 16 )		( 7 )		
	313	81	76	8 *	7 *	26	23	23 *	19 *	5 *	11 *	
		( 79 )		( 8 )		( 25 )		( 21 )		( 8 )		
625	103	81	13 *	8 *	30	29	27 *	18 *	12 *	8 *		
	( 92 )		( 11 )		( 30 )		( 23 )		( 10 )			
1250	78 *	86 *	8 *	6 *	23	24	18 *	9 *	9 *	12 *		
	( 82 )		( 7 )		( 24 )		( 14 )		( 11 )			
2500 †	76 *	90 *	10 *	14 *	23	23	27 *	23 *	12 *	13 *		
	( 83 )		( 12 )		( 23 )		( 25 )		( 13 )			
5000 †	101 *	85 *	11 *	16 *	30	27	15 *	23 *	8 *	9 *		
	( 93 )		( 14 )		( 29 )		( 19 )		( 9 )			
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	73	80	10	9	27	32	31	34	19	14	
		( 77 )		( 10 )		( 30 )		( 33 )		( 17 )		
	78.1	100	106	6	12	28	35	31	29	13	9	
		( 103 )		( 9 )		( 32 )		( 30 )		( 11 )		
	156	126	119	10	13	28	29	27	31	15	14	
		( 123 )		( 12 )		( 29 )		( 29 )		( 15 )		
	313	99	123	12	11	34	30	34	30	15	14	
		( 111 )		( 12 )		( 32 )		( 32 )		( 15 )		
625	120	109	13	14	31	43	31	44	13	15		
	( 115 )		( 14 )		( 37 )		( 38 )		( 14 )			
1250	120	122	13	11	39	43	33	36	11	16		
	( 121 )		( 12 )		( 41 )		( 35 )		( 14 )			
2500	126	107	14	11	37	47	47	36	16	22		
	( 117 )		( 13 )		( 42 )		( 42 )		( 19 )			
5000	115	112	12 *	13 *	39	40	34 *	34 *	16 *	11 *		
	( 114 )		( 13 )		( 40 )		( 34 )		( 14 )			
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA					
		用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数/plate	282	290	513	561	112	104	366	389	200	200
			( 286 )		( 537 )		( 108 )		( 378 )		( 200 )	
		名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA				
		用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2					
コロニー数/plate	598	602	344	341	470	417	354	363	258	205		
	( 600 )		( 343 )		( 444 )		( 359 )		( 232 )			

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

\*, 生育阻害が認められた。

[表 3] B. NIB-176 の細菌を用いる復帰突然変異試験 (本試験 II)

代謝活性化 系の有無		被験物質用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	試験実施期間: 2012年 8月30日 より 2012年 9月 3日					
			復 帰 変 異 数			コロニー数/plate (平均)		
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA1535		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	9      6 ( 8 )	16      18 ( 17 )	7      7 ( 7 )				
	9.77	11      5 ( 8 )	14      11 ( 13 )	5      3 ( 4 )				
	19.5	7      11 ( 9 )	13      15 ( 14 )	6      9 ( 8 )				
	39.1	10      11 ( 11 )	20      16 ( 18 )	3      11 ( 7 )				
	78.1	10      6 ( 8 )	15      19 ( 17 )	10      8 ( 9 )				
	156	11 *      10 * ( 11 )	21 *      13 * ( 17 )	5 *      5 * ( 5 )				
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	SA	AF-2	9AA			
		用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.5	0.1	80			
		コロニー数/plate	527      508 ( 518 )	378      358 ( 368 )	239      176 ( 208 )			

陰性対照, ジメチルスルホキシド

SA, Sodium azide; AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 9AA, 9-Aminoacridine

\*, 生育阻害が認められた。