

赤芍、日本産芍薬、洋種芍薬の系統関係並びに成分的な差異を明らかにしてきた。また、富山県薬用植物指導センターで栽培されているシャクヤク 99 品種について、ITS 配列により白芍系と赤芍系に分けた上で 8 成分の含量を測定し、中国産赤芍と白芍及び日本産芍薬の各市場品の成分含量を測定した。以上の定量値を用いて主成分分析を行い、生薬との類似性から赤芍または白芍（芍薬）として薬用に供することができる園芸品種を各 3 品種選出出した。

富山県で栽培可能な園芸品種から、薬用の赤芍または白芍として新たな生薬を作り出していくためには、収穫した新鮮な根の加工・調製法の検討が必要である。そこで、富山県薬用植物指導センターで栽培されている薬用品種の「梵天」の根を用いて、様々な加工・調製を行い、その加工品について 8 成分の含量を測定し、加工調製法の違いによる成分含量の変動を調べた。

B. 研究方法

1. 実験材料及び加工・調製法

富山県薬用植物指導センターで栽培されていた栽培 4 年目の薬用品種「梵天」を平成 24 年 11 月 19 日に入手した。この株から 24 本の根を得た。根の径によりそれらを大〔径 2.8-3.5 mm の根 10 本（大 1～大 10）〕と中〔径 1.7-2.3 mm の根 14 本（中 1～中 14）〕に分けた。太い根（大）についてはさらに上、（中）、下に分け、全部で 36 個体になるように調整した。その後、それらを均等に 12 グループに分けた（3 個体／グループ）。12 グループの根に対してそれぞれ、図 2 に示した 12 通りの加工・乾燥法を行った。終了後、36 個体の根についてそれぞれ 8 成分の含量を測定した。

2. 定量分析

1) 標準品、試薬

標準品：Paeoniflorin（Wako Pure Chem. Inc.）、Albiflorin（Wako Pure Chem. Inc.）、1,2,3,4,6- penta-*O*-galloyl- β -D-glucose（PGG）（Toronto Research Chem. Inc.）、

(+)-Catechin（Cayman Chem. Inc.）、Paeonol（Wako Pure Chem. Inc.）、Gallic acid（Nacalai Tesque Inc.）、Methyl gallate（ChromaDex.）、Benzoic acid（Nacalai Tesque Inc.）を用いた。

試薬：HPLC用移動相は、LC/MSグレードのアセトニトリル及び超純水（Wako Pure Chem. Inc.）、LCグレードのリン酸（Wako Pure Chem. Inc.）を用いた。

2) 測定条件

装置：Jasco HPLC システム（Pump: PU-1580、Gradient unit: LC1580-02 ternary gradient unit、Auto sampler: AS-2057 Plus、Detector: MD-1510 Multiwavelength Detector）；カラム：YMC-Pack ODS-AQ、250×4.6 mm、i. d.、s-5 μ m；移動相：A：アセトニトリル、B：0.1%りん酸水溶液。

HPLC 条件：0-5 min 10-15% A、5-40 min 15-30% A、40-45 min 30-70% A、45-46 min 70-80% A、46-50 min 80% A；for wash、50-55 min 80-10% A、55-65 min 10% A；for initial stabilization。注入量：20 μ L；流速：1 ml/min；カラム温度：27℃；検出波長：232 nm。

データ処理プログラム：ChromNAV。

3) 検量線の作成

8 化合物の標準品 [Paeoniflorin、Albiflorin、1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose（PGG）、(+)-Catechin、Paeonol、Gallic acid、Methyl gallate、Benzoic acid] を各々正確に量り取り、分析用メタノールに溶解して 1.0 mg/ml の標準溶液を調製した。この溶液を 5、10、50、100、500 倍と段階的に希釈して調製した 1.0 mg/ml、0.2 mg/ml、0.1 mg/ml、0.02 mg/ml、0.01 mg/ml、0.002 mg/ml の溶液を HPLC で分析し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

4) 試料溶液の調製

乾燥した根を粉碎し、300 μ m の篩を通し

た。得られた粉末 300 mg を正確に量り取り、遠心チューブに入れ、75% エタノール 9 ml を加えて、30 分間超音波抽出を行った。遠心分離した (10 min、4000 rpm) 後、上澄み液を分取した。以上の抽出操作をさらに 2 回 (8 ml、8 ml) 繰り返した後、全上澄み液を合せて 25 mL にメスアップした。そのうち約 2 ml を DISMIC-13HP disposable syringe filter 0.2 μ m (東洋濾紙) でろ過して HPLC 用バイアルに入れ、分析用の試料とした。これらについて、前述した HPLC 条件で 8 成分の定量を行った。

C. 研究結果

乾燥した根について、1 個体ずつ 8 成分の定量分析を行った。図 3 に示すように、成分含量は個体により大きくばらつき、同じ調製法で乾燥・加工した各グループの 3 個体においても同様であった。全体として Paeoniflorin と Albiflorin 含量はそれぞれ、15.2~36.1 mg/g と 2.32~9.39 mg/g であった。PGG 含量は 0.44~4.14 mg/g で最も変動が大きかった。

加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化を明確に見るため、成分毎に、同一の方法で加工・乾燥したグループ内の 3 個体の成分含量の平均値を求め、さらに加工・乾燥法 A-I を行った時の平均含量を 1 とし、それぞれの加工・乾燥法を行った時の平均含量を換算し、それらを比較した (図 4)。

低温貯蔵をしていない A-I~III と B-I~III の 6 グループ内を比較すると、水洗のみの A-I と B-I に比べて、周皮を除いた A-II~III 及び B-II~III では Albiflorin と (+)-Catechin の含量が減少していた。低温貯蔵した C と D の各グループにおいては、水洗のみの C-I と D-I に比べて、周皮を除いた C-II と D-II では Albiflorin 及び (+)-Catechin の含量が減少していたが、湯通して周皮を除いた C-III と D-III では (+)-Catechin の含量が減少したものの、Albiflorin 含量の減少が見られなかった。また、約 1 ヶ月間の低温貯蔵による影響を、A 及び B のグループと C 及び D のグループの間

で検討すると、低温貯蔵により Paeoniflorin 含量と PGG 含量が増加する傾向が見られた。ただし、D-II のように PGG 含量が減少しているものもあり、個体間のばらつきも影響しているものと考えられた。室内自然乾燥か乾燥機による 30℃ での通風乾燥かの違いは、顕著でなかった。現時点では、C-III の加工・乾燥方法が 8 成分の含量として最もよかった。

D. 考察

富山県では薬用品種の「梵天」が広く栽培されているが、富山県の気候風土がシャクヤクの根の調製に向かないため、掘り起こされた根はすべて新鮮な状態で奈良県に出荷される。富山県で栽培可能な品種から、薬用の赤芍または白芍として新たなブランド生薬を作り出していくためには、収穫した新鮮な根を富山県で加工・調製する最適な方法を見出すことが不可欠である。

林ら¹⁾によれば、乾燥を防いで 20℃ 以下で 22 日間以上根を貯蔵してから周皮を除去し、その後速やかに乾燥すれば内部が白く仕上がり、また Paeoniflorin や Gallotannin の向上にも繋がるとの報告がある。本研究でも C と D の各グループについては、収穫した根をビニール袋に入れ、低温室 (4℃) で 32 日間置いた後に、A と B の各グループと同様な方法で加工・乾燥した。低温貯蔵していない A と B の各グループに比べて、32 日間低温貯蔵した C と D の各グループでは、Paeoniflorin 含量が若干高くなる傾向が見られたが、顕著ではなかった。

今回の実験では同一株から得られた太さの異なる根をそのまま、または 2 または 3 分割して 36 個体を得たが、個体間で成分含量のばらつきが大きく、加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化を比較するのは難しかった。しかし、新鮮な根を 32 日間低温貯蔵し、水洗後、湯通しして、周皮を竹べらで除き、室内 (18℃) で自然乾燥する方法が最もよい成分含量を示した。今後、個体間における成分含量のばらつきを補正できるように検体数を増やし、今回の結果の再現性を検討する予定

である。

E. 結論

富山県薬用植物指導センターで栽培された栽培4年目の薬用品種「梵天」の1株を用いて、加工調製法の違いによる成分含量の変化を検討した。24本の根を36個体に分け、3個体ずつ12通りの加工・乾燥法を行い、8成分の含量を測定し、比較した。その結果、個体間におけるばらつきが大きいものの、新鮮な根を約1ヶ月間低温貯蔵し、水洗後、湯通しして、周皮を竹べらで除き、室内で自然乾燥する方法が最もよい成分含量を示した。新鮮な根を約1ヶ月間低温貯蔵することにより、顕著ではないもののPaeoniflorin含量が増加する傾向が認められた。また、皮去り加工によりAlbiflorin及び(+)-Catechinの含量が減少した。今後、個体間における成分含量のばらつきをある程度補正できるように、個体数を増やして、成分含量の差違並びに乾燥後の色合いなどについて再試験する予定である。富山の風土に適した加工調製法が確立できれば、県内で栽培されたシャクヤクの収穫後の加工が地元でできることとなり、県内のシャクヤク栽培の普及、促進、さらには富山産ブランドの芍薬の生産につながる。

参考文献

- 1) 林茂樹、姉帯正樹、佐藤正幸、柴田敏郎：北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が生薬の品質に及ぼす影響、生薬学雑誌、64(2)、68-75 (2010)。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 朱姝、于曉麗、白石史遠、小松かつ子、村上守一、田村隆幸：Genetic characterization of White/Red Peony roots and the horticultural cultivars of *Paeonia lactiflora* by nuclear rDNA ITS sequences. 日本薬学会第133年会 (2013.3. 28-30、横浜)
- 2) 于曉麗、朱姝、吳煜秋、小松かつ子、村上守一、田村隆幸：芍薬の成分的多様性の解析(2) —白芍・赤芍の成分的差異と園芸品種の薬用資源としての可能性。日本薬学会第133年会 (2013.3. 28-30、横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

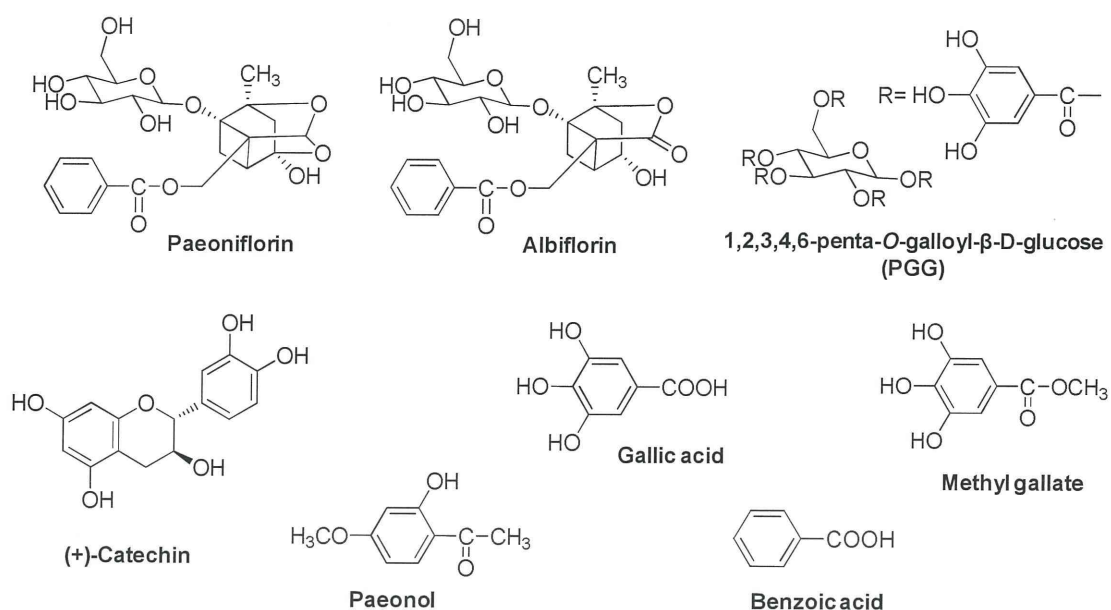


図1 定量分析に用いた成分の構造式

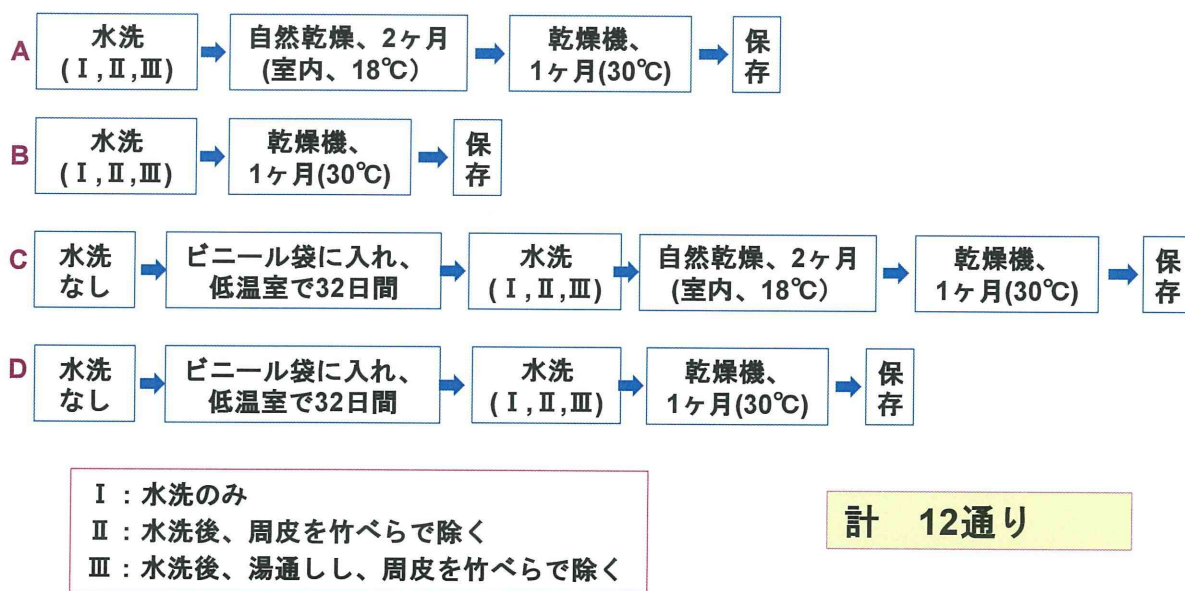


図2 収穫した新鮮な根についての加工・乾燥法

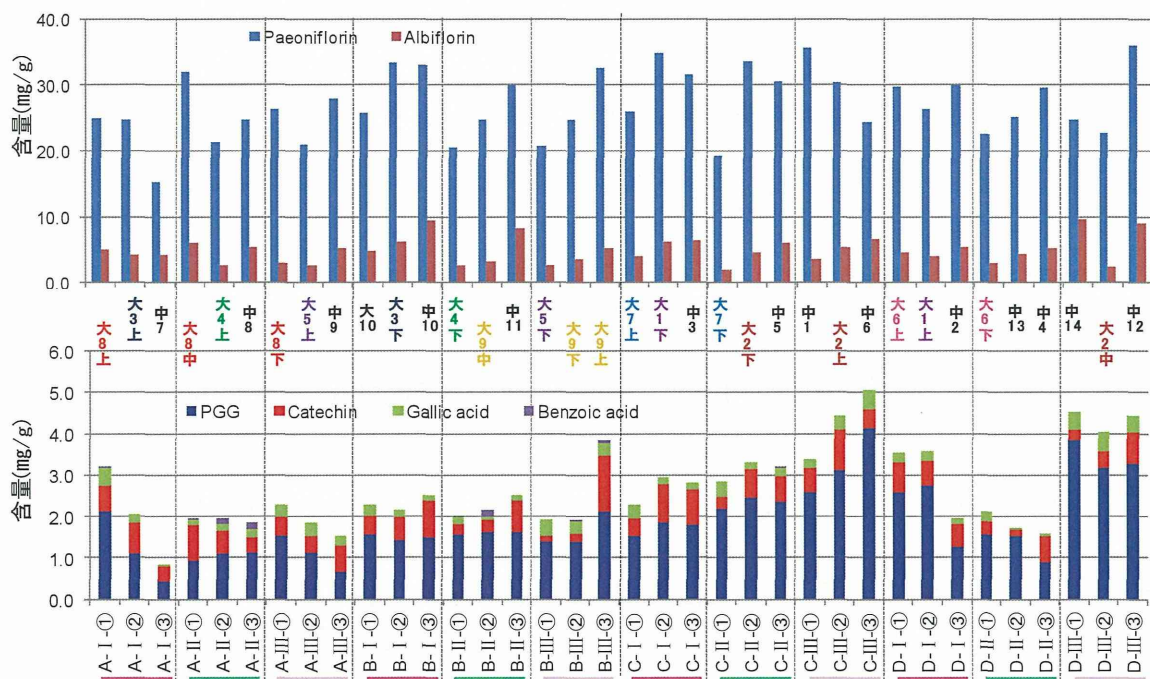


図3 12通りの加工・乾燥法で処理した根の成分含量

上下のグラフは同一個体の測定結果を示す。例えば A-I-①は、大8の根の上部を材料にし、A-Iの調製法を行った時の6成分の含量を示す。大は直径2.8~3.5 mmの根、中は直径1.7~2.3 mmの根である。

I：水洗のみ、II：水洗後、周皮を竹べらで除く、III：水洗後、湯通しし、周皮を竹べらで除く
A：室内で自然乾燥、B：乾燥機による乾燥、C：低温貯蔵後、室内で自然乾燥、D：低温貯蔵後、乾燥機で乾燥

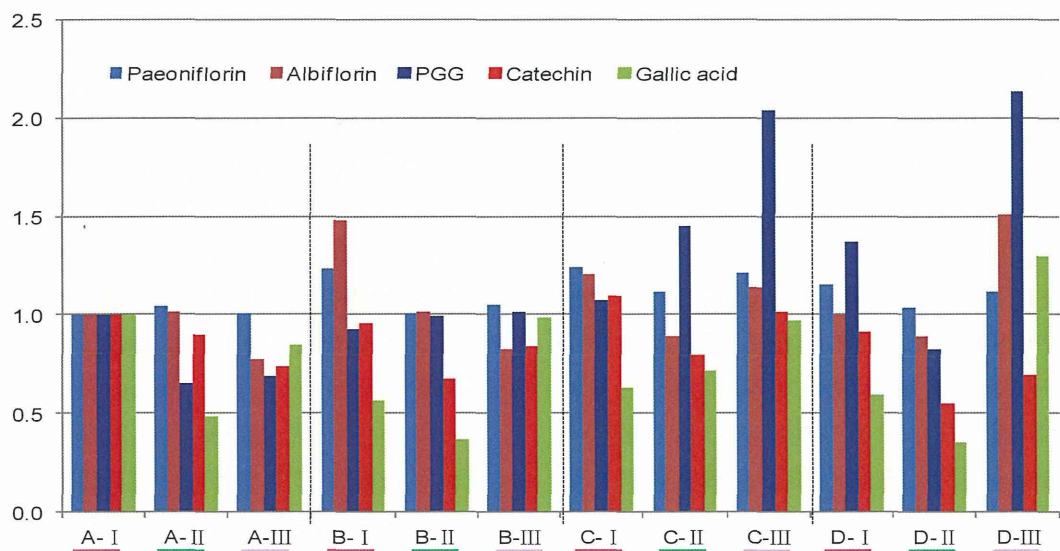


図4 異なる加工・乾燥法による根の成分含量の変化

同一調製法を行った3個体の成分含量の平均値を求めた。A-Iの調製法を行った時の成分含量を1として、他の調製法で行った時の成分含量を換算した。

I：水洗のみ、II：水洗後、周皮を竹べらで除く、III：水洗後、湯通しし、周皮を竹べらで除く
A：室内で自然乾燥、B：乾燥機による乾燥、C：低温貯蔵後、室内で自然乾燥、D：低温貯蔵後、乾燥機で乾燥

平成25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：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—イメージングMSを用いたシャクヤクの主要成分の局在解析—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨 イメージング質量分析（MS）は二次元的にMSを行うことにより、生薬及び薬用植物に含まれる薬効成分の組織内分布を視覚的に明らかにできる。今年度は主にシャクヤクの根におけるペオニフロリン、アルビフロリン、ペオノール及びカテキンの組織内分布を検討した。ペオニフロリンとアルビフロリンの組成式は同じであるが、MALDI-TOF-MSでポストソース分解を行ったところ、アルビフロリンに特異的な m/z 197 のフラグメントイオンが検出された。また、イオン化支援剤としてDHBを用いた場合、アルビフロリンでは m/z 481 のプロトン化分子が検出されたが、ペオニフロリンでは検出されなかった。そこで、シャクヤクの根の横断切片について m/z 197 と m/z 481 でイメージングMSを行ったところ、両者の局在位置は一致し、アルビフロリンは周皮に局在し、皮層にも存在することが確認された。ペオノールは皮層と師部付近に局在し、一方カテキンは全体に見られたが、周皮と皮層に多い傾向が見られた。

研究協力者

平 修 福井県立大学生物資源学部
准教授

A. 研究目的

二次元的に質量分析（MS）を行うことにより種々の化合物の分布状態を明らかにできるイメージング質量分析（MS）（図1）を用いて、多成分からなる生薬における各成分の分布を明らし、生薬の品質を視覚的に評価する。

漢方薬は天然物由来の生薬から構成されるため、生薬の品質が漢方薬の薬効を左右することになる。そのため、漢方薬の品質保証には、広範囲な成分の複合体の網羅的解析と、それらと薬効との関係を把握する手法の開発が求められている。従来、多成分の分析にはLC/MSなどが用いられてきたが、サンプル

量、前処理方法や感度の面で問題がある。また、生薬の供給量の不足から市場には低品質のものや偽品も出回っており、生薬の簡便、迅速な品質評価技術の開発が急務である。

今回、多成分からなる試料を感度良く分析できる質量分析を応用した新技術であるイメージングMS法により、生薬「芍薬」の原植物であるシャクヤク *Paeonia lactiflora* における主要成分の組織内分布を明らかにすることを目的とする。芍薬には鎮痛・鎮痙、抗炎症、活血作用などが報告されており、その作用成分として、ペオニフロリン、アルビフロリン、ペオノール、カテキンなどが報告されている。そこで本研究ではこれら4化合物の組織内分布を解析した。

本手法は、免疫染色と異なり、抗体、蛍光物質を用いることなく標的成分群を可視化することができる。一枚の切片（数十マイクロ

ン)から複数成分の局在を明らかにできることも他の可視化技術と一線を画す。

B. 研究方法

シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas) の園芸品種「エジュリスパーバ」(富山県薬用植物指導センターから入手、栽培6年目)の根を凍結したものから、クライオミクロームにより厚さ20 μm の試料切片を作製した。切片を導電性透明電極のITO(酸化インジウム・スズ)スライドガラス上に載せ、イオン化支援剤(2,5-Dihydroxybenzoic Acid: DHB)を切片表面にスプレーした。用いた質量分析装置は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化型(MALDI)質量分析装置である。ポジティブモードで、レーザー照射間隔100 μm でイメージング質量分析測定を行った。

C. 研究結果

1. 標的成分の質量分析

予備実験として、MALDI-TOF-MSでAlbiflorin、Paeoniflorin (MW: 480.1632: $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$)、Paeonol (MW: 166.0630: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$)、Catechin (MW: 290.079: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$)の標品の質量分析を行った。イオン化支援剤としてDHBを用い、ポジティブモードで分析した。Albiflorinではプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 481) 及びナトリウムイオン付加分子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (m/z 503) が検出され、一方、Paeoniflorinでは $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (m/z 503) のみが検出された(図2)。AlbiflorinとPaeoniflorinは組成式が同じであるため、質量から両者を識別するのは困難であるが、プロトン化分子が検出されたのはAlbiflorinだけであった。この知見より、 m/z 503のシグナルはAlbiflorinであるかPaeoniflorinであるかを区別することはできないが、 m/z 481のシグナルであればAlbiflorinである可能性が高い。さらに、MALDI-TOF-MSでポストソース分解を行ったところ、Albiflorinでは m/z 197のフラグメントイオンが生じた(図3)が、Paeoniflorinでは検出されなかった。

Paeonolではプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z

167) が検出され、また、Catechineでもプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 291) が検出された。4化合物と同時に検討したPentagalloylglucose (MW: 940.118: $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{O}_{26}$)ではネガティブモードで脱プロトン化分子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ が検出された。

以上のように、標品のイオン化を確認できたことから、シャクヤクの横断切片においてこれらの質量シグナルに着目することでイメージングが行えることが示唆された。

2. シャクヤクの根のイメージングMS

シャクヤクの根の横断切片は径が約1 cmであるため、その1/4の区画をイメージングMSを行う領域とした(図4)。切片表面について、PaeonolまたはCatechinのプロトン化分子の質量である m/z 167または m/z 291でイメージングした結果(画像解像度100 μm)、Paeonolは皮層と師部付近に局在し、一方Catechinは全体に見られたが、周皮と皮層に多い傾向が見られた(図4)。次に、Albiflorinを検出するため表面を m/z 481と m/z 197でそれぞれイメージングした結果、両者で見られるAlbiflorinの局在は一致し、周皮に局在し、皮層にも認められた(図5)。

D. 考察

Albiflorinが周皮と皮層、Paeonolが皮層と師部に局在することは、これまでの報告と一致しているが、今回始めて可視化できたことは意義が深い。また、ブランド芍薬の加工調製法を決める際の有益な知見となった。Catechinのような抗菌作用のある化合物が、根の皮層だけでなく全体的に認められたことは、植物として外敵(菌)から根を防衛し、2次代謝物を貯蔵する行為であると考えられる。今回はパオニフロリンの組織内分布については検討できなかった。今後の検討課題である。

E. 結論

今回、シャクヤクの機能性成分の一部であるAlbiflorin及びPaeonolが豊富に存在す

る部位は皮層周辺であることを視覚的に示すことができた。質量解析において、同一の組成式をもつ化合物（Albiflorin と Paeoniflorin）である場合、フラグメントイオンを解析することが、化合物を特定する鍵となることを見いだせたことは、新たな知見を与えたと言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 平修、朱姝、小松かつ子、磯田進、吉松嘉代：イメージング質量分析を用いたダイオウの二次代謝産物の組織内分布. 第30回和漢医薬学会学術大会 (2013.8.31-9.1、金沢).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

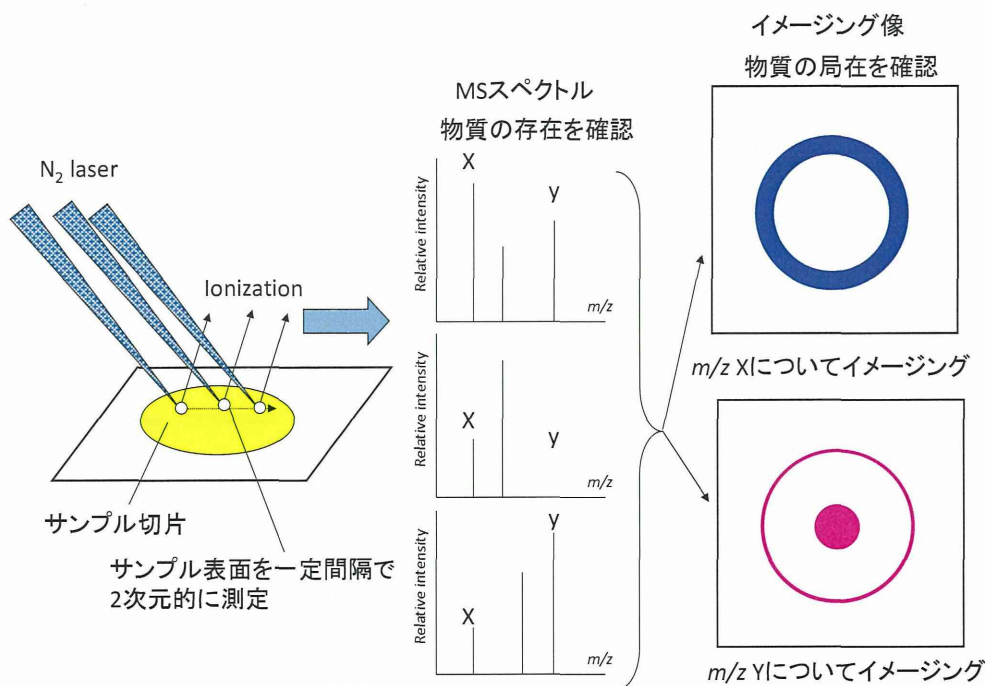


図1 イメージング質量分析の原理

切片上を2次的にMS測定後、注目したいシグナルに対してイメージすることで注目成分の2次的局在を示すことができる。

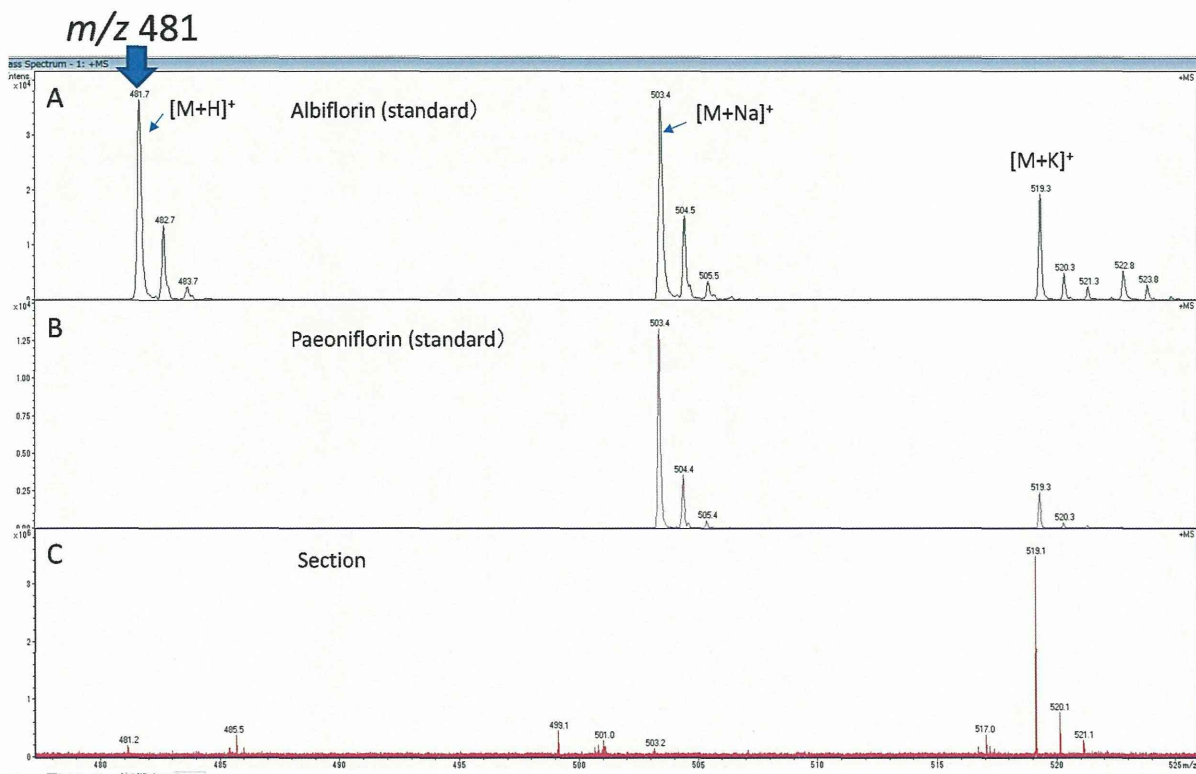


図2 MALDI-TOF-MSによる質量分析

A: Albiflorin (MW: 480.1632 : C₂₃H₂₈O₁₁)、B: Paeoniflorin (MW: 480.1632 : C₂₃H₂₈O₁₁)、C: シャクヤクの横断切片。イオン化支援剤としてDHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) を用い、ポジティブモードで測定した。

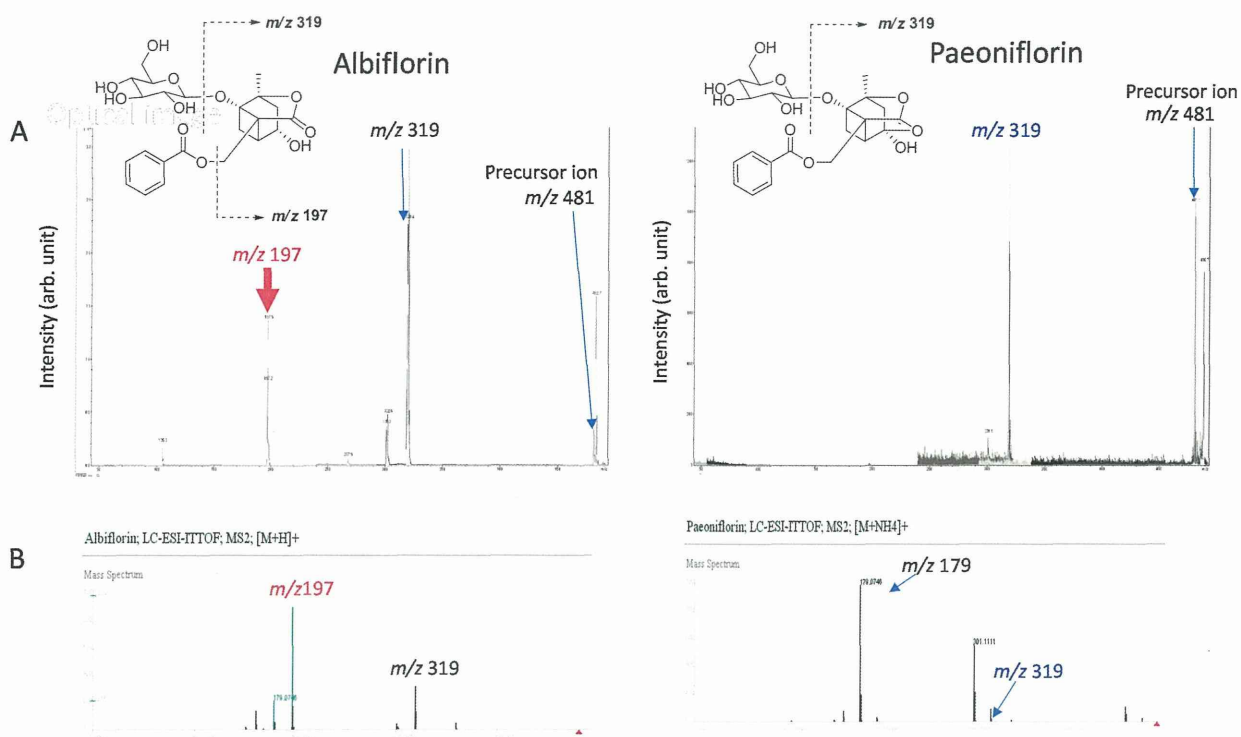


図3 AlbiflorinとPaeoniflorinのMSスペクトル

A: m/z 481に対するPSD (post source decay) MSスペクトル、
B: データベースによるダンデンMS (MS²) スペクトル

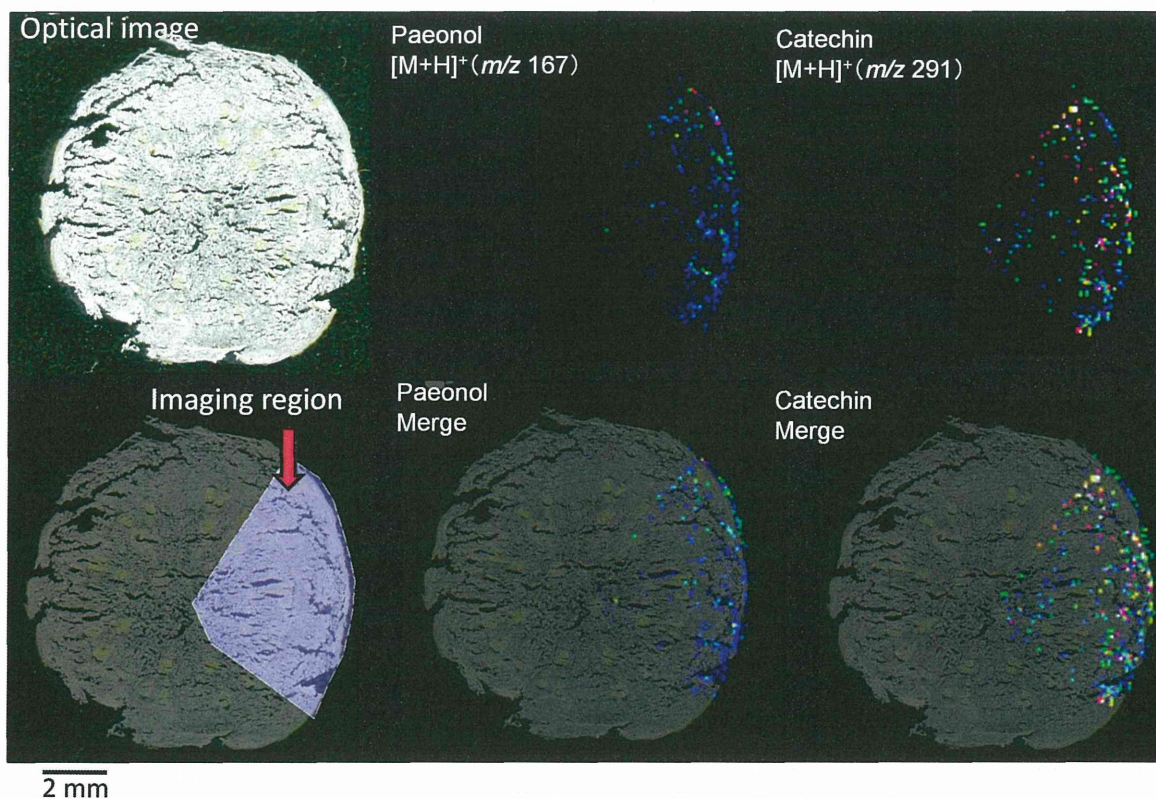


図4 シャクヤクの根の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像—PaeonolとCatechin
シャクヤクの検体2について、Paeonolのプロトン化分子 m/z 167及びCatechinのプロトン化分子 m/z 291でイメージングした。イオン化支援剤としてDHBを使用。

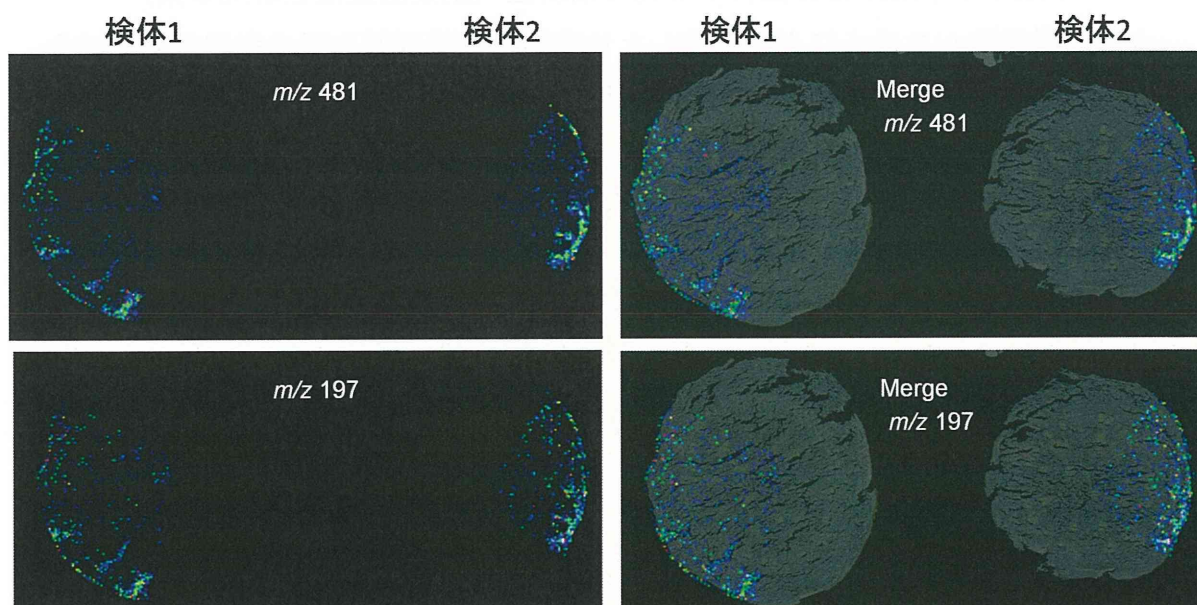


図 5 シャクヤクの根の切片のイメージング質量分析像と重ね合わせ像—Albiflorin
 シャクヤクの検体1及び検体2について、Albiflorinのプロトン化分子 m/z 481及びフラグメントイオン m/z 197でイメージングした。イオン化支援剤としてDHBを使用。

平成25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：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—シャクヤクの地下部に含有される無機成分に関する研究—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨 栽培したシャクヤクの根及び芍薬市場品について、蛍光X線分析により12種類の無機元素のマッピングを行った結果、カリウム、カルシウム及び硫黄について特徴的な分布様式を確認できた。栽培シャクヤクの根では、カリウムは皮層と木部の中心部またはほぼ全体に検出され、外皮にも存在した。一方、カルシウムは形成層のすぐ内側の木部に多く検出され、外皮にも存在した。硫黄はわずかに検出される程度であった。芍薬市場品でも同様であったが、カルシウムは白芍より赤芍に多かった。また、硫黄は栽培シャクヤクの根より明瞭に白芍、特にHPLC分析でPaeoniflorin sulphonateが検出された市場品で認められた。このように中国市場の白芍では、乾燥または漂白の目的で使用された硫黄が生薬にも残留していることが示唆され、これを検出するために蛍光X線分析は有用な手法であった。

研究協力者

伏見裕利 富山大学和漢医薬学総合研究所
准教授

今後は、無機成分の量や分布様式などを検討することにより、良品質の芍薬を作成するための肥料の充実化や新たな栽培方法の模索が可能になることが期待される。

A. 研究目的

薬用植物の中には、ある特定の無機成分を多く含有するものがある。一定量の無機成分は植物体が成長する上で必要不可欠であり、生育する土壌や水質環境に大きく左右されることが考えられるが、大量に蓄積する理由など、明らかになっていない点も多い。

これまで生薬「芍薬」については、原子吸光光度法を用いて生薬中に含有される無機成分を定量した報告があり、カルシウムを多く含有することが報告されている¹⁾。一方、シャクヤクは有機化合物であるモノテルペン配糖体のペオニフロリンなどを合成しており、無機成分の含量との関連性も興味深い。

一方で、栽培方法だけでなく、収穫後の乾燥方法や修治法にも配慮すべきことがある。乾燥時に品質の悪い硫黄分を含有する石炭を使用したり、漂白を目的として硫黄分を用いた燻蒸を行ったりすることもあるので、注意が必要である。これまでに川原らは、生薬中の残留二酸化硫黄について、食品衛生検査指針に収載されている改良ランキン装置を用いるアルカリ滴定法による測定を行っている²⁾。生薬中に残存する硫黄分が、人体へ及ぼす影響も否定できないことから、継続した検討が必要である。

そこで今回、栽培されたシャクヤク4品種5点および中国産「芍薬」（白芍と赤芍）8

点を用いて、固体試料を分解せずに直接分析が可能な、蛍光X線分析法のマッピング機能を用いることにより、カルシウムや硫黄を含む12種類の無機元素の分布様式について検討した。なお、中国産「白芍」の内5点にはPaeoniflorin sulphonateが検出されることが確認されている。

B. 研究方法

1. 実験材料

植物材料：富山県薬用植物指導センターで栽培されたシャクヤク4品種の根5点(表1)。

生薬材料：中国市場で購入した中国産「白芍」市場品7点(D1、D17、D22、D23、D24にPaeoniflorin sulphonateが検出されている)、「赤芍」市場品1点(D12)(表2)。

2. 実験方法

シャクヤクの根または生薬市場品について、根の断面及び外皮について蛍光X線分析を行った。

蛍光X線分析では、エネルギー分散型蛍光X線分析装置(EDAX EAGLE μ Probe)を用い、無機元素のマッピングを行った。スポットサイズは高効率キャピラリ 100 μ m、測定元素はNa、Mg、Al、Si、P、S、Cl、K、Ca、Ti、Mn、Feの12元素とした。

C. 研究結果

蛍光X線分析により12元素の分布様式に関する検討を行った結果、カリウムとカルシウム及び硫黄について特徴的な分布様式が確認できた。その他の9元素については、植物体における含有量が少なかったため、検討できなかった。

富山県で栽培したシャクヤクの品種「春の粧」の根の断面を分析した結果(図1:I-4)、カリウムに関しては、木部の中心部と皮層に多く存在していた(図1:II-4)。一方、カルシウムに関しては、形成層のすぐ内側の木部(放射組織)付近で分布が多かった(図1:III-4)。また根の外皮表面にもカリウム及びカルシウムがそれぞれ存在していた。硫黄も根の断面全体に検出されたが、外皮表面で

は少なかった(図1:IV-4)。「春の粧」以外の栽培品種においても同様の結果であったが、硫黄はわずかであった。

市場品に関しては、白芍D22の断面においてもカルシウムが形成層のすぐ内側の木部付近に多く見られた(図1:III-1~3)が、カリウムの分布は均一だった(図1:II-1~3)。D22の断面には硫黄が検出され、「春の粧」の根より明瞭であった(図1:IV-1~3)。外皮表面には、カリウム、カルシウム及び硫黄が存在し、白芍D29にカリウム及び硫黄が(図2:II-2, IV-2)、一方、赤芍D12にカルシウムが(図2:III-1)多く存在していることがわかった。

硫黄は、栽培シャクヤクの根より白芍に明瞭で、特にPaeoniflorin sulphonateが検出された市場品で認められた。このように、中国市場に流通する白芍では、乾燥または漂白の目的で使用された硫黄が、生薬にも残留していることが示唆された。

D. 考察

シャクヤクの根に関して、無機元素の組織内分布を明らかにした報告は今回が初めてである。根の横断面において、形成層のすぐ内側の木部(新生木部)ではカルシウムが多く認められたが、カリウムは少ない傾向にあり、カリウムは皮層と木部中心部にやや多く認められた。このように2つの元素がそれぞれ異なる分布様式を示したことは興味深く、今後他の生薬でも同様に検討することにより、その意義が明らかになることが期待される。

HPLC分析でPaeoniflorin sulfateが検出された白芍市場品では、硫黄元素が根の断面や外皮の表面全体に検出された。したがって、硫黄燻蒸等の修治法が施されている市場品は、蛍光X線分析法で検出可能であることが明らかとなった。

本来、蛍光X線分析を用いてマッピングに関する検討を行う際には、サンプル間ならびにサンプル内で作動距離(WD)を一定にすることが望ましいが、今回使用した植物材料及び生薬材料の形状は様々であり、また湾曲す

る個体が多かったため、作動距離を一定にすることはできなかった。したがって最適な条件で分析を行うことはできなかったが、元素の分布様式に関しては一定の傾向を観察することが可能であった。

栽培したシャクヤクの根でわずかながら硫黄が検出された理由として、現在は使用していないものの、以前シャクヤクの栽培時に肥料として硫酸アンモニウムを使用していたことから、残留する硫酸アンモニウムの硫黄分が検出された可能性が高いと考えられる。今後、硫酸アンモニウムを肥料として用いていない土壌で栽培したシャクヤクを用いて比較検討をすることが望ましい。

通常圃場栽培される白芍（中国南部産）に比べ、野生品（中国北部産）である赤芍は、約 5 倍量のカルシウムを含有していることが報告されている³⁾。今回の結果においても、赤芍の外皮にカルシウムが多く認められた。シャクヤクは土壌中のカルシウムを吸収し易いものと考えられ、カルシウムの量は中国南部の栽培地では不足している可能性が考えられた。一方、白芍と赤芍では核 ITS 領域の遺伝子型が異なり、別系統である可能性がある。系統間の違いが、カルシウムの吸収量の差になって現れた可能性も考えられる。現在、シャクヤクの栽培時には、肥料としてアルカリ分が多い苦土石灰やリン酸石灰などのカルシウムを含有した肥料を加えている。今後、シャクヤクの品種ごとにカルシウムを含めた無機元素の吸収量を検討することも必要であろう。

一方、芍薬には 40,600ppm のカルシウムが含まれるが、煎液中に溶出する量は 430ppm で、少ないことが報告されている¹⁾。したがって、多量のカルシウムが直接、品質に結びつかないことも予想され、カルシウムの存在形態についても検討する必要があると考える。

E. 結論

栽培したシャクヤクの根及び芍薬市場品

について、蛍光 X 線分析により 12 種類の無機元素のマッピングを行った結果、カリウム、カルシウム及び硫黄について特徴的な分布様式を確認できた。栽培シャクヤクの根では、カリウムは皮層と木部の中心部またはほぼ全体に検出され、外皮にも存在した。一方、カルシウムは形成層のすぐ内側の木部に多く検出され、外皮にも存在した。硫黄はわずかに検出される程度であった。芍薬市場品でも同様であったが、カルシウムは白芍より赤芍に多かった。また、硫黄は栽培シャクヤクの根より明瞭に白芍、特に HPLC 分析で Paeoniflorin sulphonate が検出された市場品で認められた。このように中国市場の白芍では、乾燥または漂白の目的で使用された硫黄が生薬にも残留していることが示唆され、これを検出するために蛍光 X 線分析は有用な手法であった。

参考文献

- 1) 鈴木章、森本功、興津知明：生薬中の金属の溶出、生薬学雑誌、36(3)、190-195 (1982)。
- 2) 川原信夫、金益輝、合田幸広：食品等にも使用される市販生薬類の残留二酸化硫黄に関する調査研究、日本食品化学学会誌、13(3)、105-108 (2006)。
- 3) Shimada K, Nakamura Y, Kawase M, Komatsu K, Saito T, Takahashi K, Establishment of a methodology for identifying Paeoniae Radix based on metallomic analysis, J. Nat Med., 68(2), 407-413 (2014)。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 植物材料「シャクヤク」

No.	品種名	学名	栽培年数	備考
S1-3	春の粧	<i>Paeonia lactiflora</i>	8年生	切片
S78-3	エジュリ スパーバ	<i>P. lactiflora</i>	8年生	切片
S31-4	北宰相	<i>P. lactiflora</i>	9年生	切片
S34-3	梵天	<i>P. lactiflora</i>	8年生	切片
S34-5	梵天	<i>P. lactiflora</i>	4年生	切片、全形

表2 生薬材料「芍薬」

No.	生薬名	基原	産地	市場名	TMPW No.*
D1**	白芍	<i>Peonia lactiflora</i>	中国安徽省亳州	中国安徽省亳州	25071
D17**	白芍	<i>P. lactiflora</i>	中国安徽省亳州	中国安徽省亳州	25073
D22**	白芍	<i>P. lactiflora</i>	中国浙江省杭州	中国广西壮族自治区	26974
D23**	白芍	<i>P. lactiflora</i>	中国安徽省	中国内蒙古自治区	26975
D24**	白芍	<i>P. lactiflora</i>	中国江蘇省	中国内蒙古自治区	26976
D12	赤芍	<i>P. lactiflora</i>	中国内蒙古自治区	中国内蒙古自治区	21565
D29	白芍	<i>P. lactiflora</i>	中国浙江省磐安县	中国浙江省磐安县	26620
D2	黑白芍	<i>P. lactiflora</i>	中国安徽省亳州	中国安徽省亳州	25072

*TMPW No.: 富山大学和漢医薬学総合研究所附属民族薬物研究センター民族薬物資料館の標本番号

** Paeoniflorin sulphonate が検出された市場品

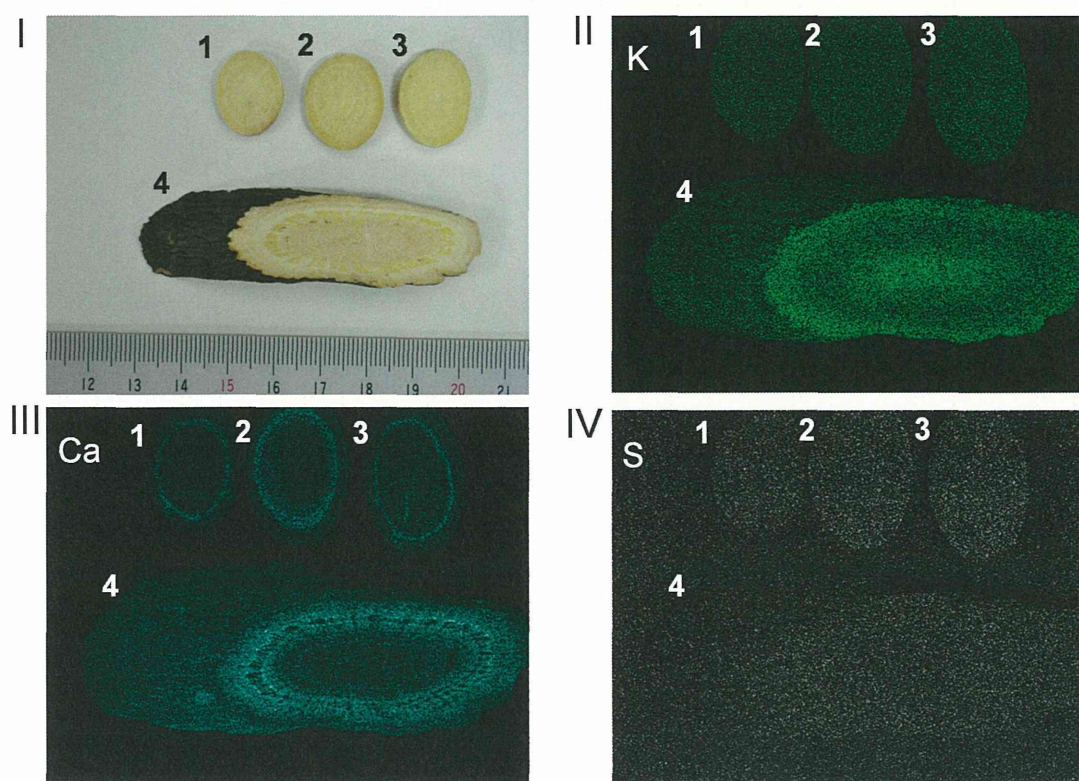


図1 蛍光X線分析装置による芍薬切片及びシャクヤクの根の切片における無機元素のマッピング

I : 「白芍」D22 の切片 (1, 2, 3) 及びシャクヤク栽培品種「春の粧」の根の切片 (4)

II : カリウムの分布, III : カルシウムの分布, IV : 硫黄の分布

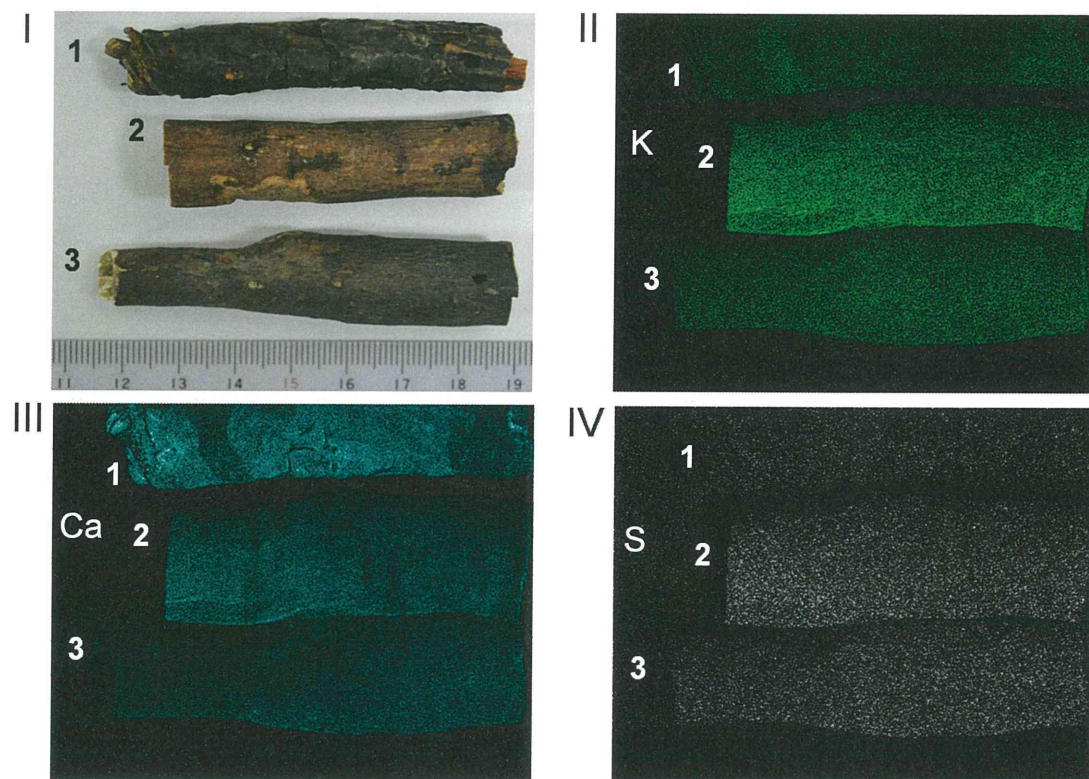


図2 蛍光X線分析装置による「赤芍」と「白芍」の表面における無機元素のマッピング

I : 「赤芍」 D12 (1)、「白芍」 D29 (2) 及び「黒白芍」 D2 (3) の外形

II : カリウムの分布, III : カルシウムの分布, IV : 硫黄の分布

平成25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：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—長野県菅平薬草栽培試験地におけるダイオウの栽培試験—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨 供試されたダイオウを標高1,400mの長野県菅平薬草栽培試験地において、2011年から2013年の3年間栽培した。*Rheum palmatum*の系統No. 29、38、41、42、A1、D5が良好な生育を示したが、特に過去の研究で高品質と結論付けた系統No. 38が比較的高い生育率を示し、本系統が長野県菅平の環境で栽培できる可能性が示唆された。

研究協力者

児玉 容 長野県健康福祉部薬事管理課
主査薬剤師

験地（長野県健康福祉部薬事管理課）圃場に定植し、栽培を行った（図1、表1）。なお、本栽培は無肥料条件下で実施した。

A. 研究目的

日本国内で栽培可能なダイオウの優良系統を見出すことを目的に、標高1,400mの長野県菅平薬草栽培試験地において、これまで11系統のダイオウを栽培し、2012年に5年目の株を収穫した。これらを用いて成分研究を行い、11株のうち *matK* 遺伝子の塩基配列が RPII 型 Rp5 タイプの系統が生育良好で歩留まりも高く、成分的にも優良であることを明らかにした。また、地下部の収穫は栽培3年目～5年目が適することを報告した¹⁾。この結果を検証するため、再度、ダイオウの栽培を、2011年から2013年の3年間実施した。

B. 栽培試験

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野で保有するダイオウ (*Rheum* 属植物) の種子から、16系統 (*matK* 遺伝子の塩基配列において5遺伝子型7タイプ) を富山県薬用植物指導センターで育苗し、2011年6月12日に長野県上田市菅平の菅平薬草栽培試

2012年6月28日、2013年6月27日、8月8日及び9月11日に生育状況の調査を行った。また、ダイオウの生育環境を調べるため、圃場の気温及び地温（地表下5cm）の測定を行った（測定期間：2013年6-9月）。

2013年11月5日に栽培3年目の一部の株を収穫した。翌日、地下部を水洗し、根茎と根に分け、さらに乾燥し易いように縦切または横切した。12月4日まで室内で自然乾燥したのち、4日間、乾燥機（30℃）で通風乾燥した。

C. 結果

1. 生育状況

3年目時点における生育状況を表2に示す。6月における種苗の生育率（生育本数/定植本数×100）を比較すると、*Rheum palmatum* の系統No. 38が94%と、試験栽培を行った種苗の中で最も高い生育率を示した。また、同種の系統No. 29、41、42、A1、D5では63-73%と良好な生育を示した。一方、*R. palmatum* の系統No. 4、14、D4及び *R. laciniatum* の

系統 No. 7 の生育率は 28-40%であった。なお、*R. palmatum* の系統 No. 45 は全て枯死した(表 2)。

生育率の経月の変化を見ると、8 月までは 6 月と同様の傾向を示したものの、9 月になると全体に減少傾向が認められた。特に系統 No. 38 の生育率は 56%と大きく減少した。

花茎の成長は、系統 No. 4、7、14、27、29、A1、D4、D5 で認められた。なお、系統 No. 7 については、2 年目から花茎の成長が認められた。

圃場における気温及び地温の測定結果について表 3 に示す。測定期間(6-9 月)における気温及び地温の日平均は、それぞれ 17.3℃、18.3℃であった。また、気温は 3.6-29.9℃、地温は 10.4-27.4℃で変動した。

2. 根茎及び根の形態と収量

栽培 3 年目にあたる 10 系統の一部の株を収穫し、根茎及び根の形態、収量を調べた(表 4)。10 系統はすべて *R. palmatum* で、*matK* 遺伝子の塩基配列により 4 遺伝子型 4 タイプに分けられる。同じ塩基配列タイプに属する株では、地下部の形態が共通した(平成 24 年度の報告書参照)。根茎が明瞭に発達しているものは少なかった。一般に根の断面は、二次皮層(二次師部)が黄白色、木部が黄色～濃黄色を呈したが、系統 29(RPII 型 Rp5 タイプ)と系統 38(RPI 型 Rp4 タイプ)では橙黄色を呈し、さらに二次皮層に粘液の分泌が見られた。系統 29 では根が太く、数本あるのに対し、系統 38 では根がやや細く、数は少なかった。系統 38 は本来、紡錘形の根茎が発達するタイプであるが、菅平栽培品では根茎が短く、中国青海省採集品での形質は見られなかった。系統 D4 または D5(RPIV 型 Rp21 タイプ)においても本来不定形の根茎が見られるタイプであるが、これらでも根茎の発達が悪かった(図 2)。

D. 考察

今回の検討では、*R. palmatum* の系統 No. 38 の生育が特に良く、更に同種の系統 No. 29、41、42、A1、D5 が良好な生育を示した。一

方、*R. palmatum* の系統 No. 4 及び *R. laciniatum* の系統 No. 7、8、11 の生育は十分なものではなかった。ただし、2013 年の猛暑のため、9 月には多くの系統で生育率の低下がみられ、特に、系統 No. 38 については 56%と生育率は大きく低下した。表 5 に以前に行った 2008 年から 2011 年までの試験栽培結果と今回の検討結果をまとめて示す。基原植物と生育率との相関に関する明確な示唆は得られなかったものの、*matK* 遺伝子の塩基配列が RL 型 R1 タイプを示す *R. laciniatum* については、菅平薬草栽培試験地では十分に生育しない傾向が見て取れた。

これまで我々が行った大黃の遺伝的・成分的多様性に関する研究により、塩基配列が RPI 型を示す検体が、薬効に関与する成分を満遍なく含むという点で高品質であると結論づけてきたが、今回の検討で高い生育率を示した系統 No. 38 はこの系統に属し、加えて 3 年目時点で花茎が成長しない特徴を併せ持っていることから、今後本系統について更なる栽培研究及び成分的な検討を予定している。2008 年～2011 年の試験栽培結果では、系統 No. 38 と同じ塩基配列(RPI 型 Rp4 タイプ)をもつ系統 No. 37 は、5 年目の収穫時に全株が消失していた。そこで、今回は試験地の中でも林(自然園)に面し、西日を遮ることができる場所を選び栽培した。圃場の地表下 5 cm の地中の温度環境は、気温上昇に遅れて上昇し、また変動幅は気温に比して小さいことが明らかとなったが、系統 No. 38 では、猛暑による生育率の減少が他系統に比較して大きいことから、この系統については温度環境が生育に影響していることが示唆された。西日の遮蔽による夜間の地温の低下が、枯死する植物体を減らし、生育率を高めた可能性が考えられることから、今後、圃場の生育環境について、更なる検討を行うことを予定している。

E. 結論

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野で保有するダイオウの種子を、富山県薬用植物指導センターで育苗し、2011 年

から 2013 年にかけて長野県上田市菅平の菅平薬草栽培試験地で栽培を行った。

その結果、*R. palmatum* の系統 No. 29、38、41、42、A1、D5 が良好な生育を示した。特にこれまで生育が難しいと思われ、過去の検討で高品質と結論付けた系統 No. 38 が比較的高い生育率を示し、本系統が長野県菅平の環境で栽培できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 小松かつ子、冷正鵬、白焱晶、朱姝、葛躍偉、伏見裕利、村上守一、田村隆幸、中曽根亨、吉松嘉代：ダイオウの圃場栽培と優良系統の選抜．日本生薬学会第 60 回年会講演要旨集、p. 186、2013.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 小松かつ子、冷正鵬、白焱晶、朱姝、葛躍偉、伏見裕利、村上守一、田村隆幸、中曽根亨、吉松嘉代：ダイオウの圃場栽培と優良系統の選抜．日本生薬学会第60回（2013年）年会（2013. 9. 7-8、北海道）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 菅平薬草栽培試験地のダイオウの定植配置図

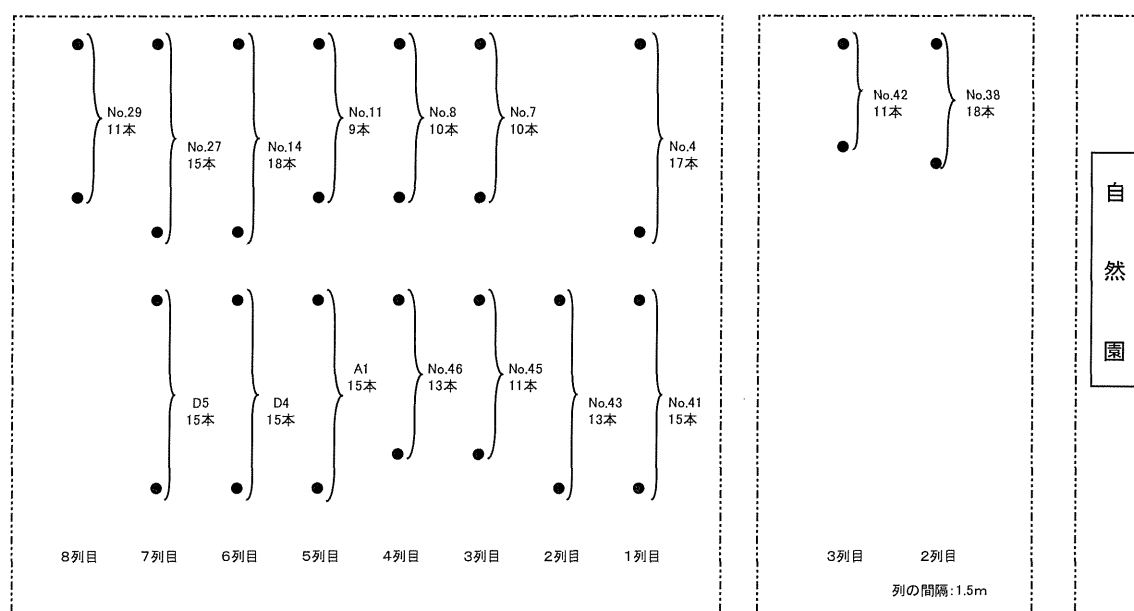


表1 栽培試験を実施したダイオウの系統

系 統	基 原		入 手 地	定植本数 (本)
	遺伝子型	塩基配列 タイプ		
No. 4	RPⅢ	Rp17	甘肅省天祝県	17
No. 7	RL	Rl	甘肅省夏河県	10
No. 8	RL	Rl	甘肅省夏河県	10
No.11	RL	Rl	甘肅省夏河県	9
No.14	RPⅣ	Rp21	甘肅省碌曲県	18
No.27	RPⅡ	Rp8	四川省若爾蓋県	15
No.29	RPⅡ	Rp5	四川省若爾蓋県	11
No.38	RPⅠ	Rp4	青海省久治県	18
No.41	RPⅡ	Rp5	四川省甘孜州色達県	15
No.42	RPⅠ	Rp4	四川省甘孜州色達県	11
No.43	RPⅡ	Rp5	四川省甘孜州色達県	13
No.45	RPⅡ	Rp5	四川省甘孜州色達県	11
No.46	RPⅡ	Rp5	四川省甘孜州色達県	13
A1	RPⅢ	RP21	甘肅省礼県上坪郷	15
D4	RPⅣ	RP21	甘肅省礼県唐王村	15
D5	RPⅣ	RP21	甘肅省礼県唐王村	15

*植物の基原にはmatK遺伝子の塩基配基づく遺伝子型とタイプを示す。
RPI~IV: *Rheum palmatum*の遺伝子型, RT: *R. tanguticum*の遺伝子型,
RL: *R. laciniatum*の遺伝子型