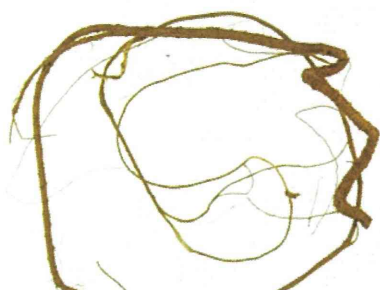


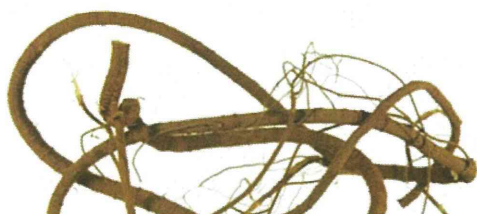
14GuTS-13



14GuTS-34



14GuTS-48



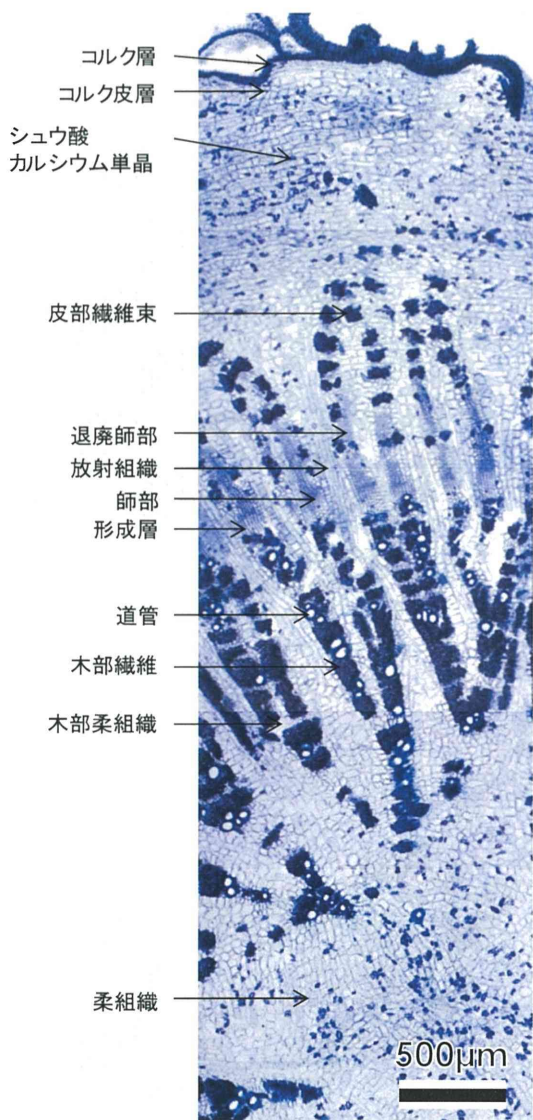
14GuHK-3



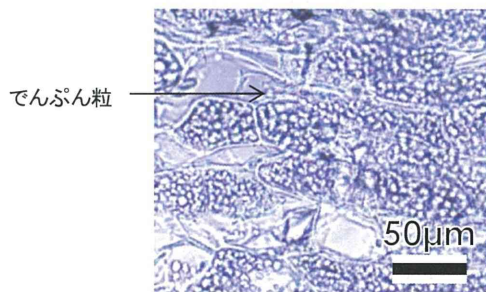
14GuKU-2



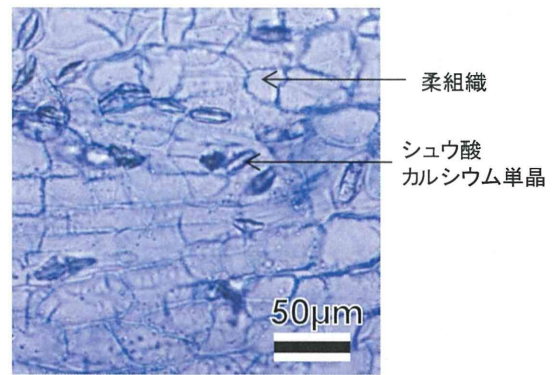
図1 外部形態および内部形態の調査場所



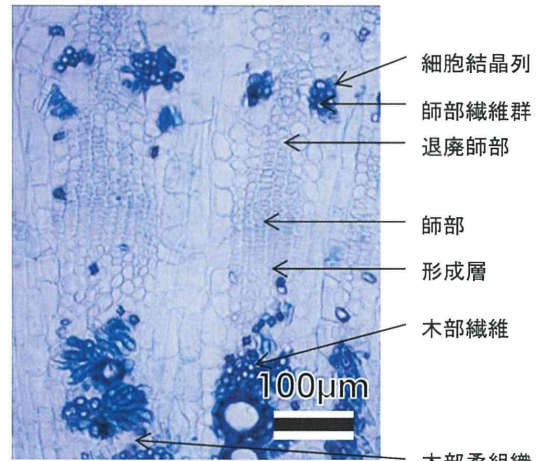
横切片全体



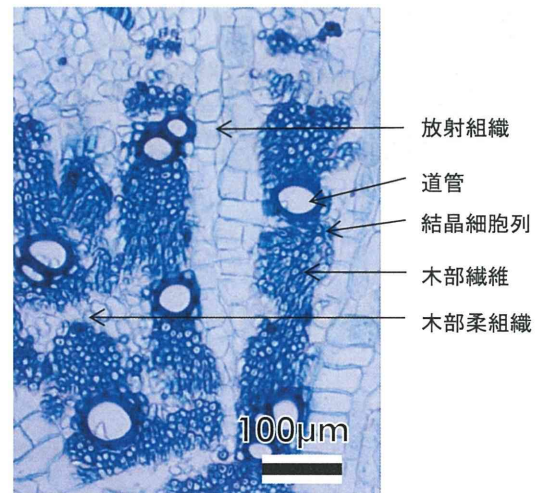
皮部周辺 (朱漂白)



皮部柔組織中の  
シュウ酸カルシウム単晶

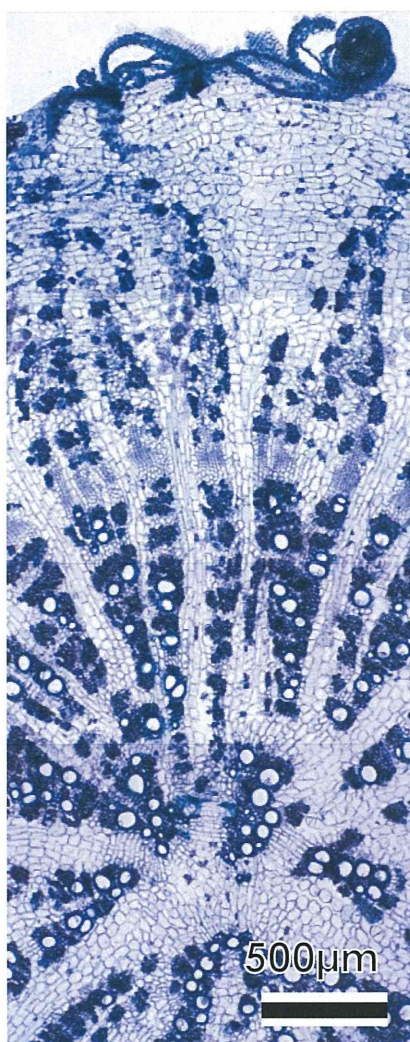


形成層付近

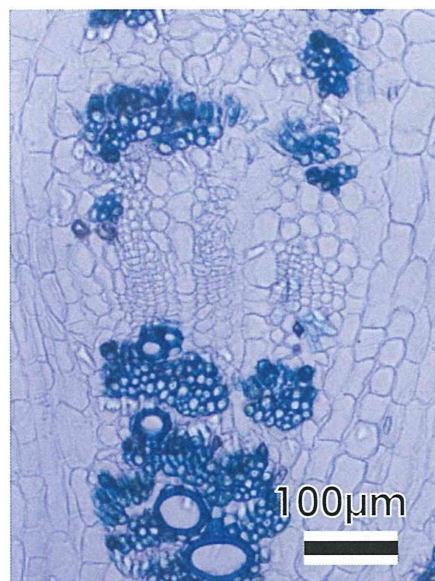


道管周辺

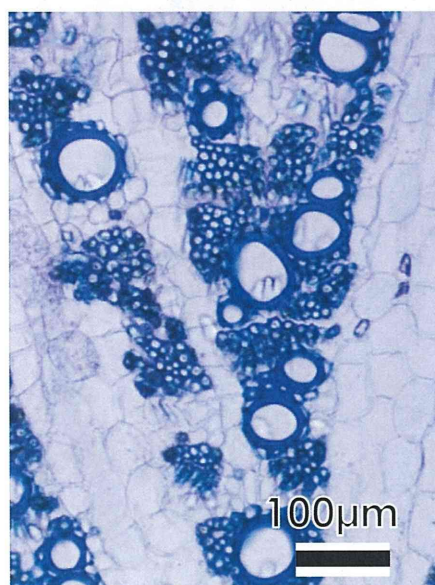
図 2-1. 短筒栽培甘草 No. 14GuTS-13 (Gu71#12-3、 苗種別：地上茎、栽培日数 388 日) の径 0.5cm 以上の横切片鏡頭図



横切片全体

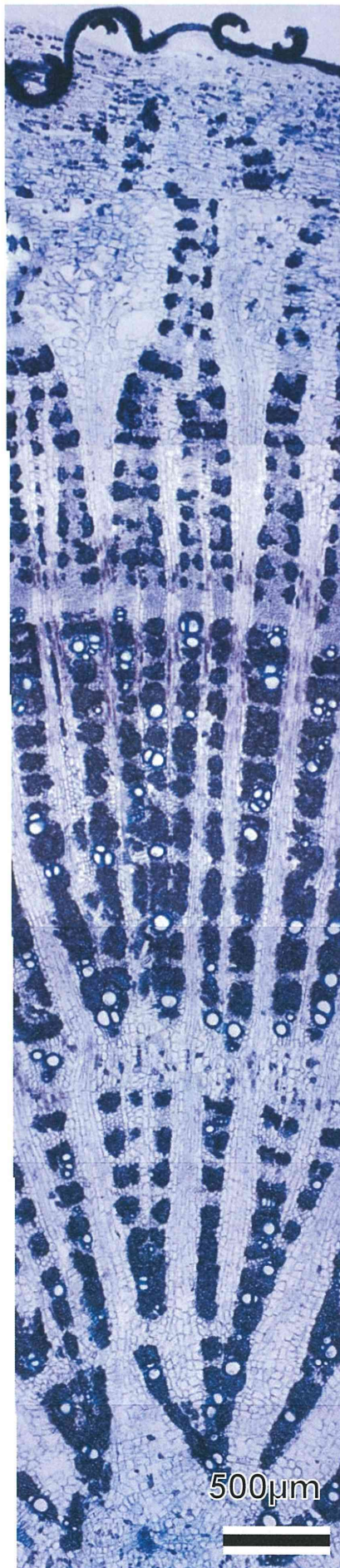


形成層付近

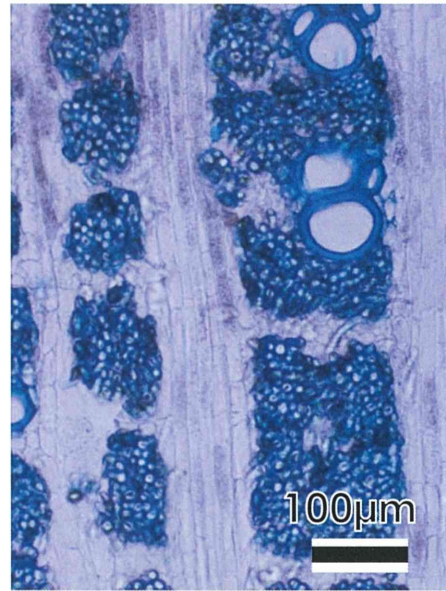


道管周辺

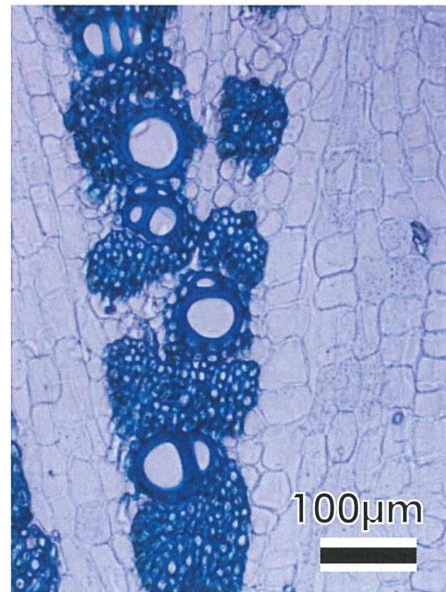
図 2-2. 短筒栽培甘草 No. 14GuTS-13 (Gu71#12-3、苗種別：地上茎、栽培日数 388 日) の径 0.5cm 未満の横切片鏡顕図



横切片全体



A部の道管周辺

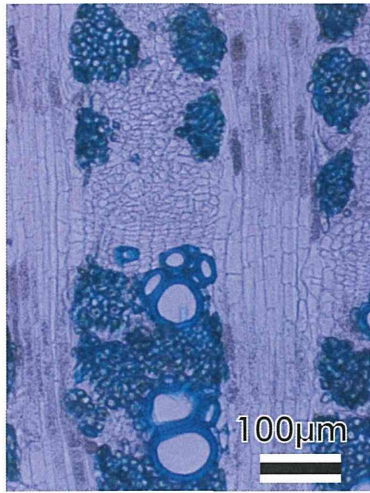


B部の道管周辺

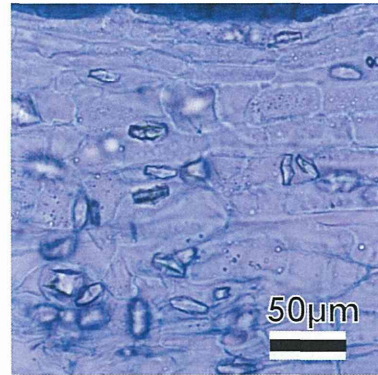
A部

B部

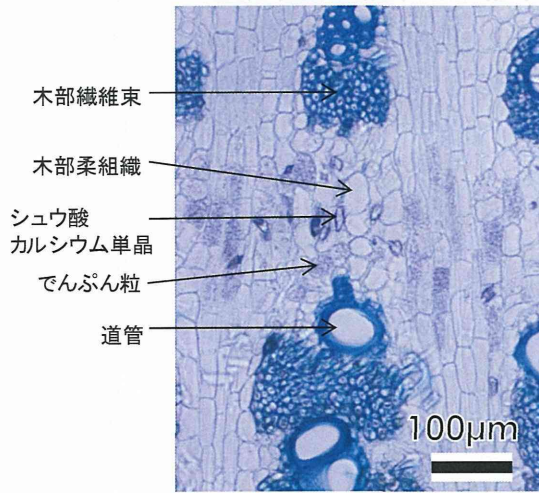
図 2-3. 筒栽培甘草  
No. 14GuTS-34 ( GuIV1S5 、  
苗種別：ストロン、栽培日  
数 483 日) の径 0.5cm 以上の  
横切片鏡頭図



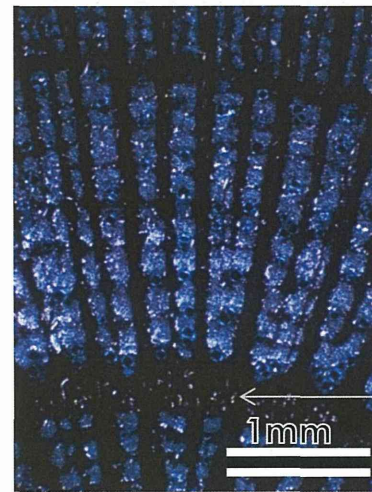
形成層付近



皮部柔組織中の  
シュウ酸カルシウム単晶



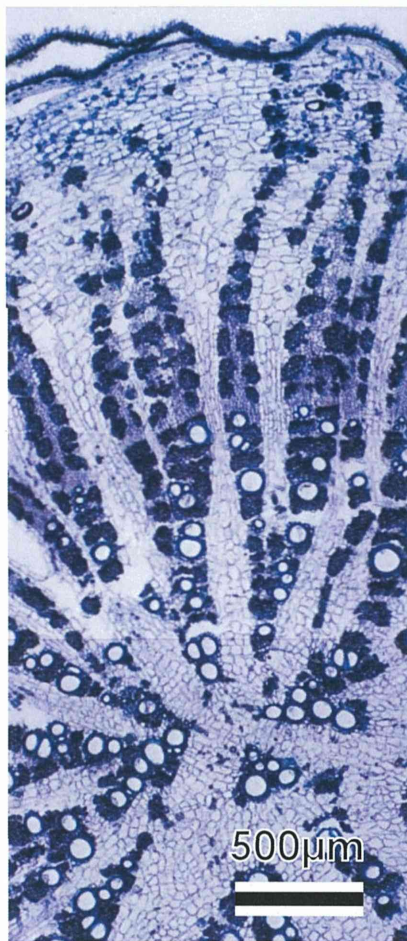
A部とB部の境目付近



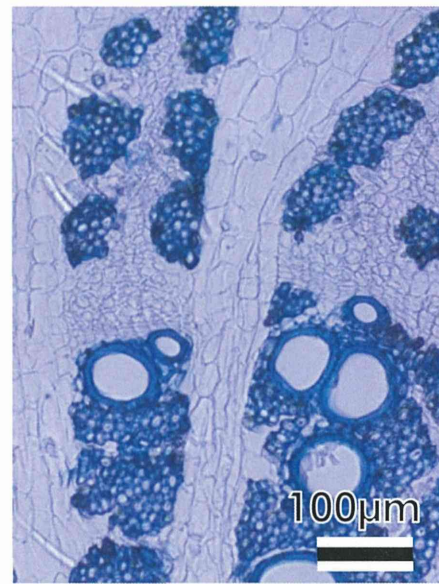
A部とB部の境目付近 (偏光)

シュウ酸  
カルシウム単晶

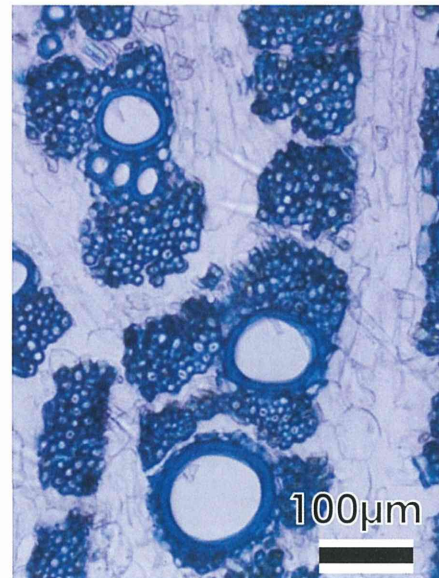
図 2-3. 続き



横切片全体

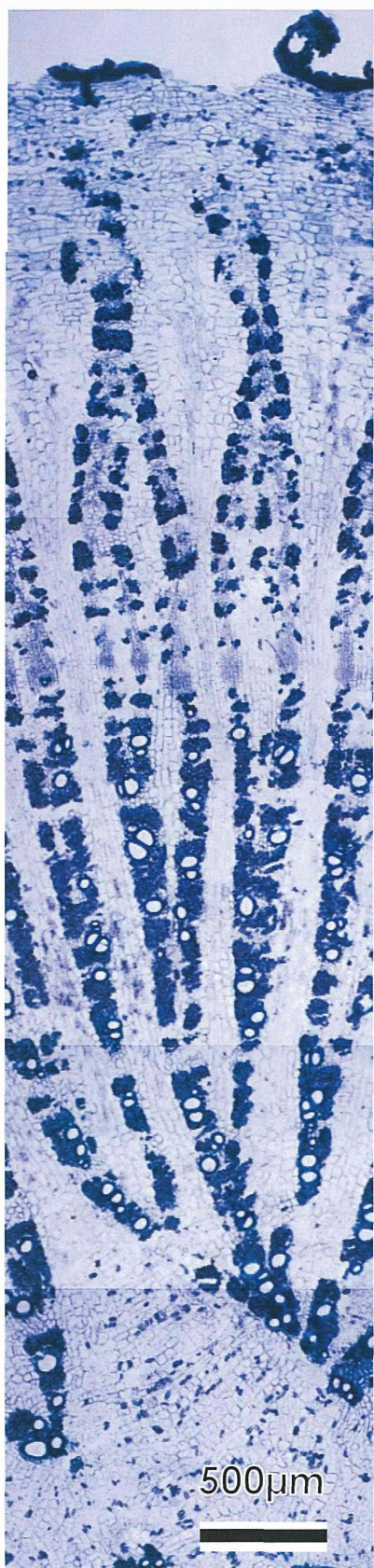


形成層付近

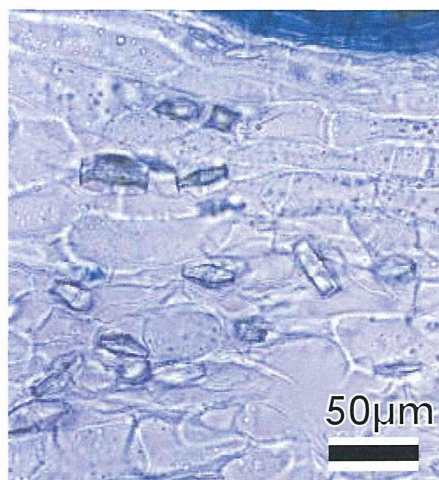


道管周辺

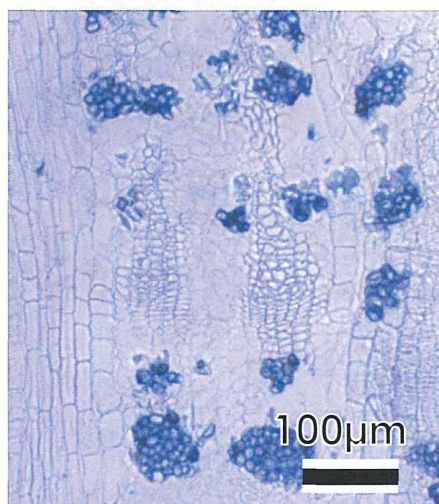
図 2-4. 筒栽培甘草 No. 14GuTS-34 (GuIV1S5、苗種別：ストロン、栽培日数 483 日) の径 0.5cm 未満の横切片鏡顕図



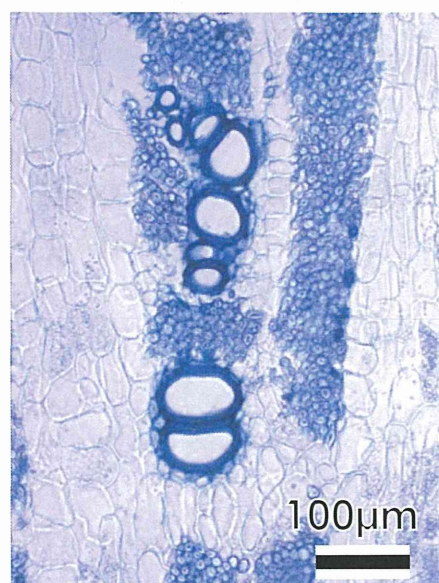
横切片全体



皮部柔組織中の  
シュウ酸カルシウム単晶

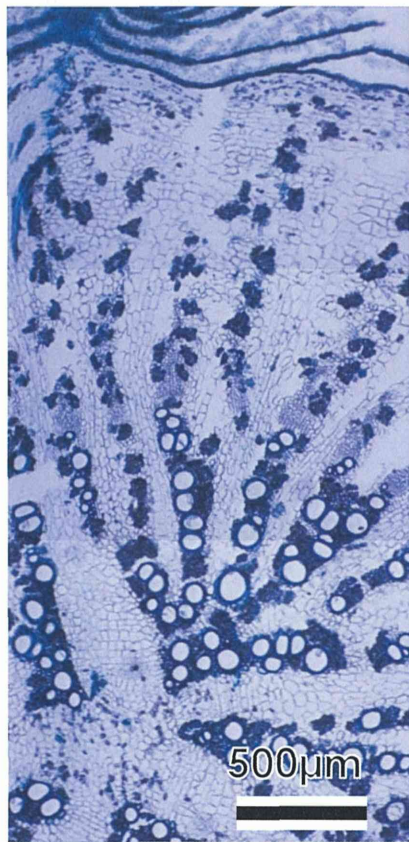


形成層付近

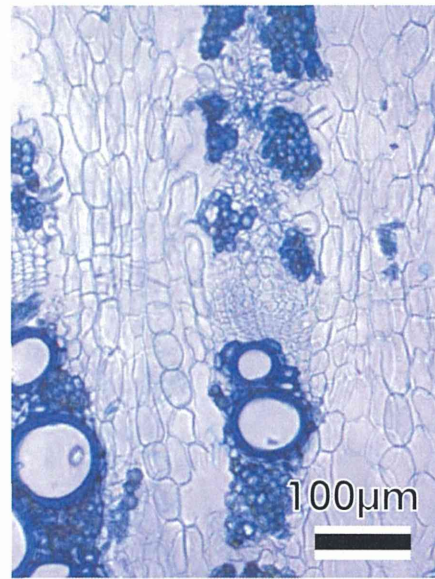


道管周辺

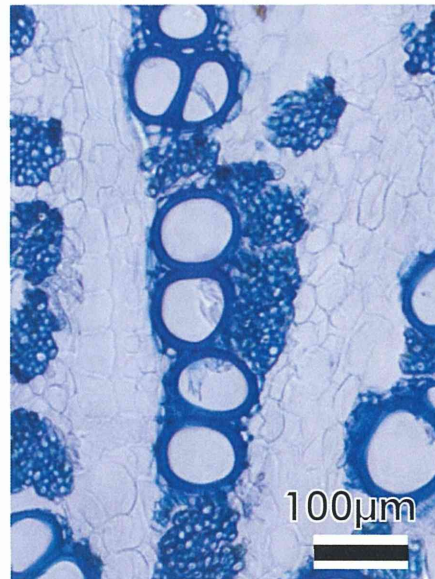
図 2-5. 筒栽培甘草 No. 14GuTS-48 (Gu71#23-1、苗種別：地上茎、栽培日数 420 日) の径 0.5cm 以上の横切片鏡頭図



横切片全体



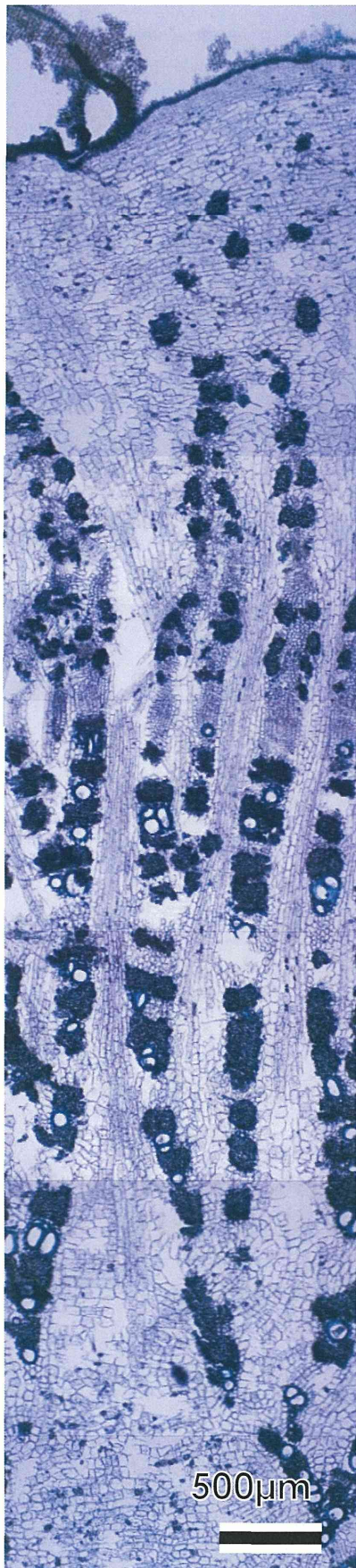
形成層付近



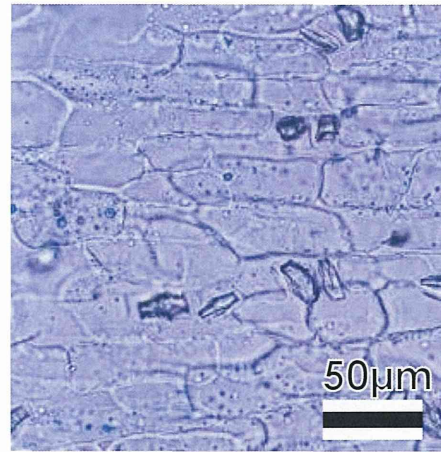
道管周辺

図 2-6. 筒栽培甘草 No. 14GuTS-48 (Gu71#23-1、苗種別：地上茎、栽培日数 420 日) の径 0.5cm 未満の横切片鏡頭図

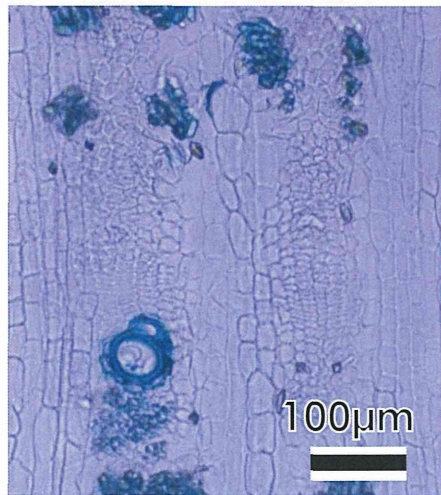




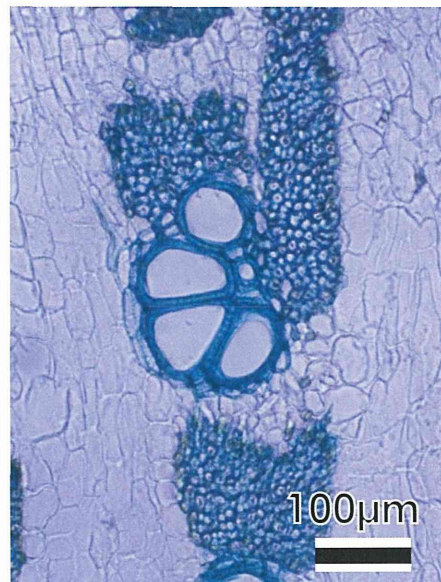
横切片全体



皮部柔組織中の  
シュウ酸カルシウム単晶

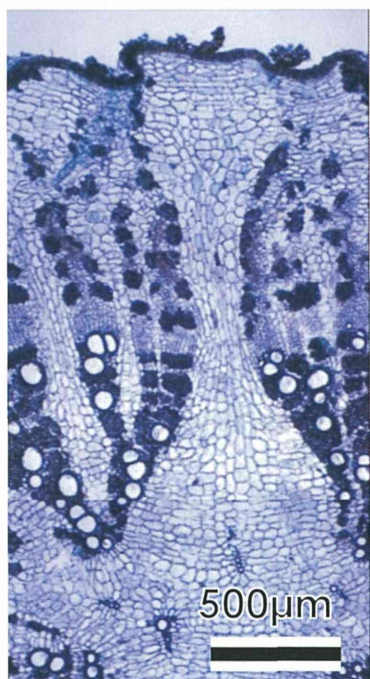


形成層付近

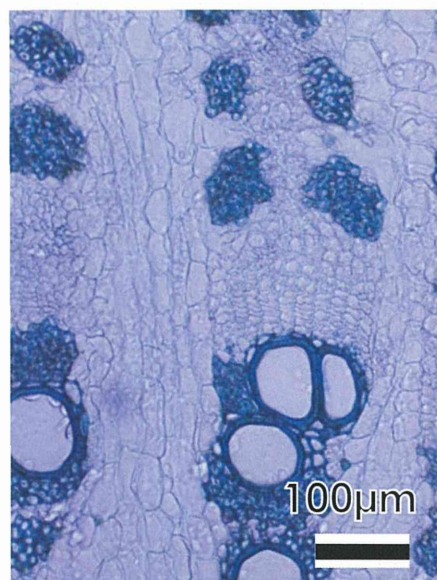


道管周辺

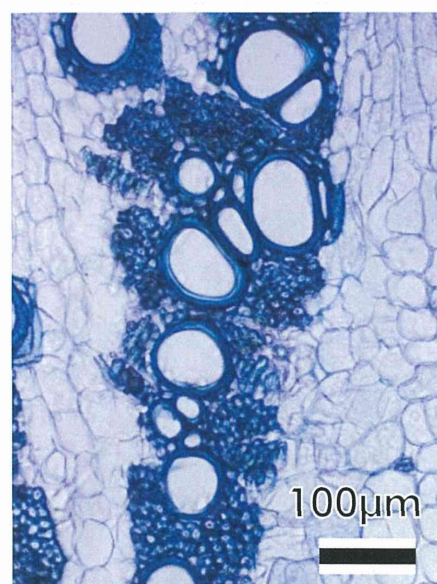
図 2-7. 北海道圃場栽培甘草 No. 14GuHK-3 (GuIV1、 苗種別：地上茎、栽培日数 818 日) の径 0.5cm 以上の横切片鏡頭図



横切片全体

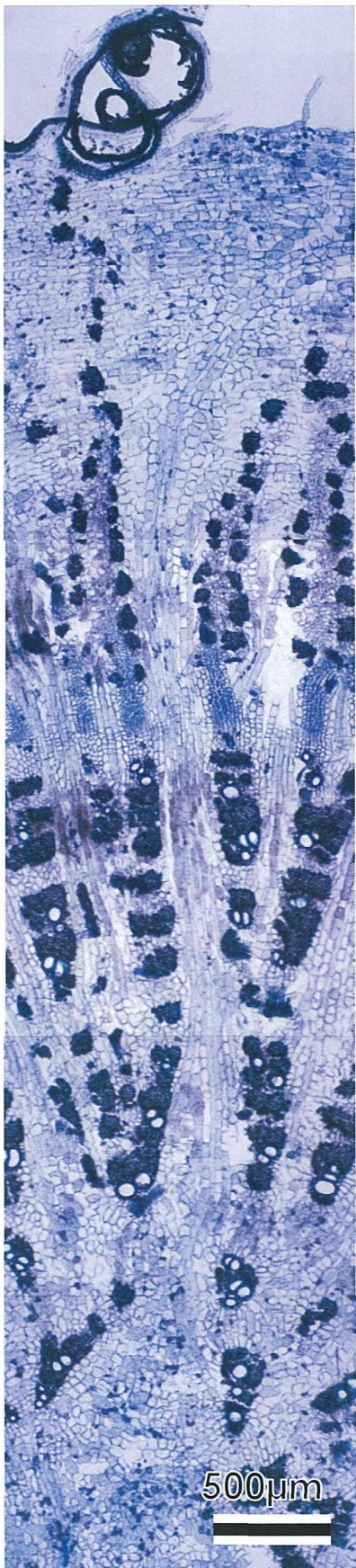


形成層付近

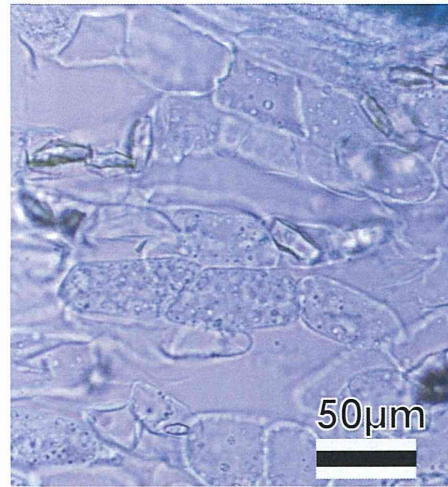


道管周辺

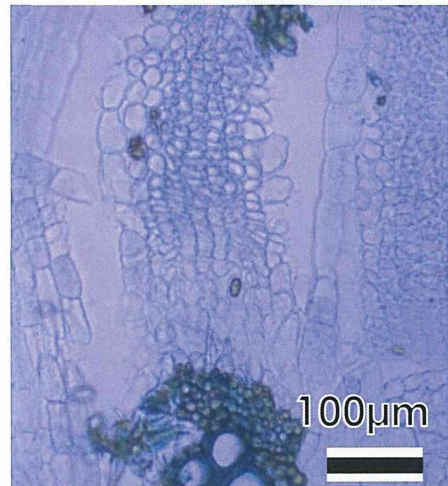
図 2-8. 北海道圃場栽培甘草 No. 14GuHK-3 (GuIV1、 苗種別：地上茎、 栽培日数 818 日) の径 0.5cm 未満の横切片鏡頭図



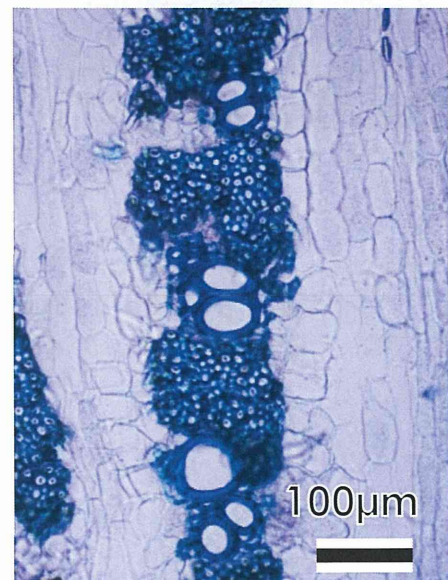
横切片全体



皮部柔組織中の  
シュウ酸カルシウム単晶

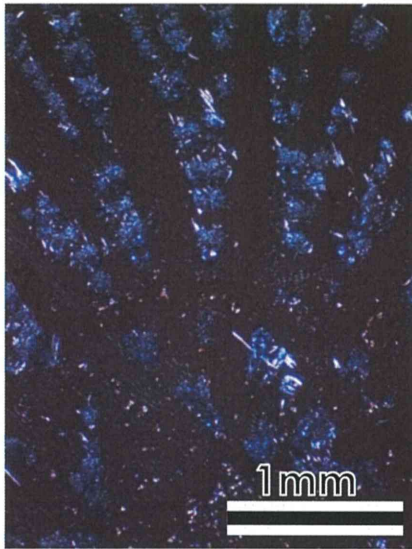


形成層付近

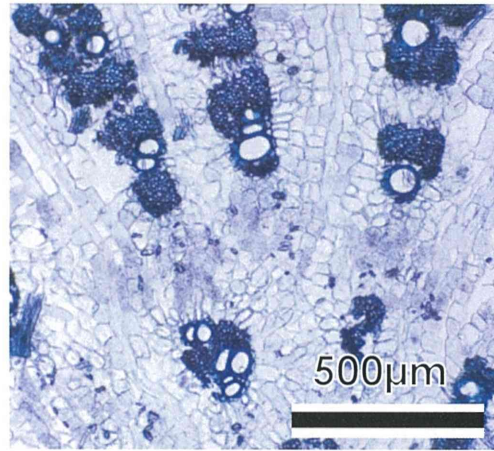


道管周辺

図 2-9. マルチ栽培甘草 No. 14GuKU-2 (GuIV1S10、 苗種別：地上茎、栽培日数 447 日) の径 0.5cm 以上の横切片鏡頭図

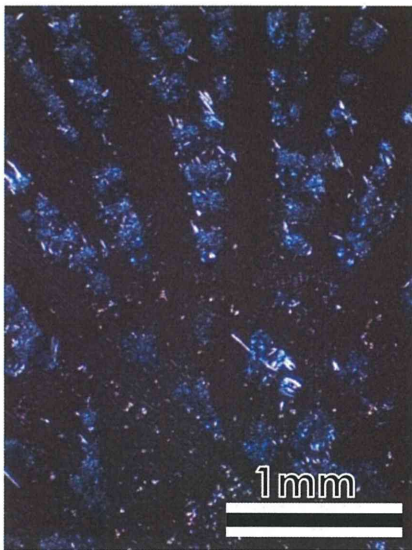


木部 (偏光)

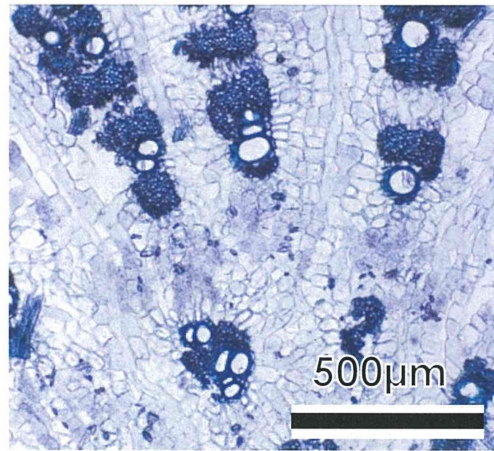


木部柔組織付近

図 2-9. 続き



木部 (偏光)



木部柔組織付近

図 2-10. マルチ栽培甘草 No. 14GuKU-2 (GuIV1S10、 苗種別：地上茎、 栽培日数 447 日) の径 0.5cm 未満の横切片鏡頭図

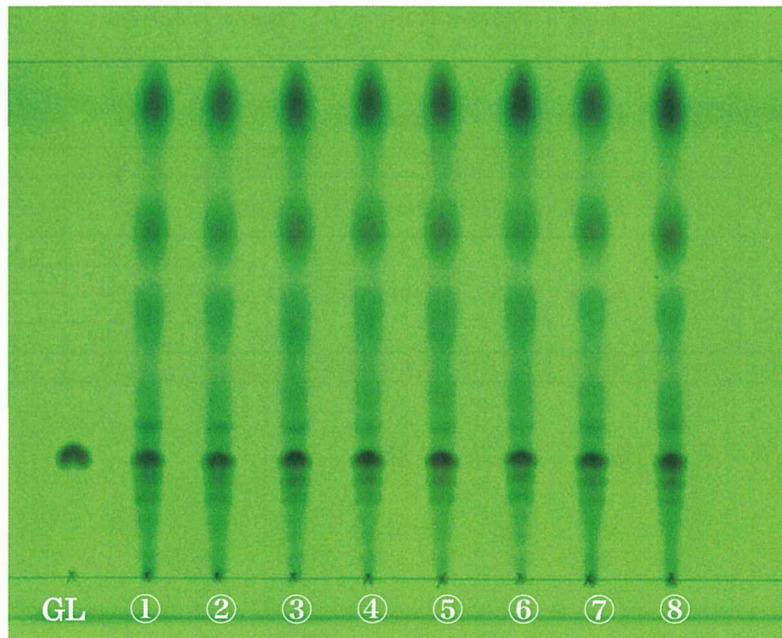
表 4. グリチルリチン酸含量

植物名称	栽培地	栽培法	苗種別	定植日	収穫日	栽培日数	クローン名	グリチルリチン酸含量 (%)			
								Φ0.5cm 以上	Φ0.5cm 未満		
14GuTS-2	茨城 （くば）	マルチ	地上茎	2013/9/6	2014/9/19	378 days	Gu71#12-7	1.56	1.97		
14GuTS-4							Gu71#28-2	1.41	1.96		
14GuTS-9					2014/9/24	383 days	Gu71#23-1	1.95	2.19		
14GuTS-11							Gu71#31-9	2.02	<b>2.65</b>		
14GuTS-12		短筒	地上茎	2013/9/6	2014/9/26	388 days	Gu#11-1-2	1.95	2.13		
14GuTS-13							Gu71#12-3	1.30	<b>2.52</b>		
14GuTS-16							Gu71#1-1	0.94	1.64		
14GuTS-18		ハウス筒	地上茎	2013/6/21	2014/10/8	474 days	Gu#11-1-2	1.53	1.57		
14GuTS-19								1.67	2.00		
14GuTS-21								2.00	1.43		
14GuTS-22								1.93	2.39		
14GuTS-23		筒	地上茎	2013/6/24	2014/10/1	464 days	GuM2	1.75	2.29		
14GuTS-24								2014/10/3	466 days	1.85	2.12
14GuTS-34			ストロン	2013/6/24	2014/10/20	483 days	GuM1S5	2.22	<b>3.22</b>		
14GuTS-35								2014/10/21	484 days	2.24	<b>2.76</b>
14GuTS-42								2014/10/31	494 days	1.64	<b>2.74</b>
14GuTS-48			地上茎	2013/9/6	2014/10/31	420 days	Gu71#23-1	<b>2.67</b>	<b>3.49</b>		
14GuTS-49		<b>2.54</b>						<b>3.55</b>			
14GuTS-50		2.39						<b>2.45</b>			
14GuHK-3		北海道 （名寄）	圃場	地上茎	2012/7/31	2014/10/27	818 days	GuM1	<b>3.26</b>	<b>3.53</b>	
14GuHK-6	<b>3.13</b>								<b>3.76</b>		
14GuHK-11	2012/8/10				808 days	GuM2	<b>2.94</b>	2.25			
14GuHK-18							<b>2.51</b>	<b>2.93</b>			
14GuTN-1	種子島	ハウス筒	地上茎	2012/10/23	2014/10/24	731 days	GuM2	1.35	1.57		
14GuTN-2								1.75	1.87		
14GuKU-2	北里大 （神奈川）	マルチ	地上茎	2013/7/19	2014/10/9	447 days	GuM1S10	<b>2.58</b>	<b>2.54</b>		
14GuKU-4							Gu#11-1-2	2.26	<b>3.24</b>		
14GuKU-5							Gu71#1-1	1.69	2.04		
14GuKU-7							Gu71#31-9	<b>2.51</b>	2.22		
14GuRU-1	琉球大（西表）	ポット	地上茎	2013/11/15	2014/11/4	354 days	GuM1S10	2.23	2.10		

太字：グリチルリチン酸日局規格（2.5%以上）適合

表 5. 理化学試験結果

栽培地	植物名称	確認試験TLC (グリチルリチン酸)	灰分 (%)	酸不溶性灰分 (%)	エキス含量 (%)
	日局規格	スポットを確認	7.0%以下	2.0%以下	25.0%以上
茨城 白くば)	14GuTS-48	確認	3.35	0.11	31.01
	14GuTS-49	確認	3.41	0.18	31.89
北海道 名寄)	14GuHK-3	確認	5.01	0.41	37.33
	14GuHK-6	確認	5.13	0.50	37.84
	14GuHK-11	確認	5.32	0.50	36.68
	14GuHK-18	確認	5.43	0.47	38.24
北里大 神奈川)	14GuKU-2	確認	3.21	0.13	29.40
	14GuKU-7	確認	3.84	0.15	32.09



GL : グリチルリチン酸 標準溶液  
 ① 14GuTS-48      ⑤ 14GuHK-11  
 ② 14GuTS-49      ⑥ 14GuHK-18  
 ③ 14GuHK-3        ⑦ 14GuKU-2  
 ④ 14GuHK-6        ⑧ 14GuKU-7

図 3. 確認試験 TLC

表 6. 個別元素分析

栽培地	植物名称	As	Cd	Hg	Pb
茨城 (つくば)	14GuTS-48	<LOQ	0.02	<LOD	0.34
	14GuTS-49	<LOQ	0.02	<LOD	0.08
北海道 (名寄)	14GuHK-3	0.11	0.03	<LOD	0.12
	14GuHK-6	0.13	0.03	<LOD	0.13
	14GuHK-11	0.12	0.03	<LOD	0.11
	14GuHK-18	0.14	0.04	<LOD	0.12
北里大 (神奈川)	14GuKU-2	<LOQ	0.01	<LOD	0.02
	14GuKU-7	<LOQ	0.01	<LOD	0.05

<LOD 検出限界未満 As:0.01 Cd:0.002 Hg:0.02 Pb:0.02

<LOQ 定量下限未満 As:0.05 Cd:0.007 Hg:0.05 Pb:0.05

平成26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：人工水耕栽培システムにより生産した生薬・食品添加物の性能、均質  
性及び安全性試験に関する研究

—水耕栽培により生産したカンゾウ・オウレンの生薬・食品添加物としての安全性  
及び有効性評価—

研究分担者 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 本研究では、新規技術で生産したカンゾウ（人工水耕栽培、又は人工水耕—圃場ハイブリッド栽培）及びオウレン（人工水耕栽培）と市場流通品の科学的比較評価を目的として、両者の有効性評価検証を行った。2種の生薬の熱水抽出エキスにより示された接触性皮膚炎モデルマウスに対するT細胞依存型アレルギー反応抑制効果について検証を行った。その結果、カンゾウにおいては、水耕栽培品及びハイブリッド栽培品と市場流通品の間の抗アレルギー活性に有意な差は見られず、いずれも同等の抗アレルギー活性を示すことが示唆された。また、オウレンにおいては、市場流通品・水耕栽培品の間の抗アレルギー活性に有意な差は見られず、市場流通品・水耕栽培品ともに同等の抗アレルギー活性を示すことが示唆された。オウレンについてAmes試験による変異原性の測定を行った。市場流通品・水耕栽培品ともに陽性となったが、両サンプルの比活性値を比較すると、水耕栽培品の比活性値は市場流通品よりも低い傾向にあると示唆された。この結果から、オウレン水耕栽培品は、市場流通品よりも変異原性が低くなる傾向にあることが示唆された。

研究協力者

能勢充彦 名城大学薬学部 教授  
大月典子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 協力研究員  
滝口 肇 同 協力研究員  
杉本直樹 同 第二室長  
多田敦子 同 主任研究官  
淵野裕之（独）医薬基盤研究所  
薬用植物資源研究センター  
筑波研究部 栽培研究室長  
吉松嘉代 同 筑波研究部  
育種生理研究室長

乾 貴幸 同 筑波研究部 特任研究員  
河野徳昭 同 筑波研究部 主任研究員  
菱田敦之 同 北海道研究部  
研究サブリーダー  
林 茂樹 同 北海道研究部 研究員  
川原信夫 同 センター長  
工藤 善 鹿島建設株式会社  
上席研究員

A. 研究目的

現在国内における生薬の供給は、外国からの輸入品に依存しており、近年、主要輸入先



国の中国国内での輸出制限や天候による不作、世界的な生薬需要量の増加に伴い、輸入額が高騰している。これを受けて国内において、効率的な生薬供給を目的とした、生薬水耕栽培システムの確立を目指した取り組みが行われている。本システムの確立に向け、水耕栽培で栽培した生薬の安全性・有効性と従来の生薬のデータを比較し、生薬あるいは食品添加物としての価値を維持した機能的クローンを同定し、品質の安定化と確実な国内供給を目的とする。

我々は以前、カンゾウに関し、安全性評価として市場流通品（従来生薬）と人工水耕栽培品における遺伝子突然変異誘発性の評価と有毒微量元素（ヒ素および重金属類）の定量を行い、市場流通品と水耕栽培品との同等性を報告した。次年度は同じくカンゾウの有効性評価として、異なる要因から惹起される2種類のアレルギー炎症について、2つの実験系を構築し、それぞれの系における市場流通品と水耕栽培品の同等性を報告した。今回は、前回実施した有効性評価に加えて、カンゾウ水耕栽培品の検体数を増やし薬理効果について再現性を検討するとともに、さらに人工水耕・圃場ハイブリッド栽培品の薬理効果を検討した。また、栽培方法の異なる同クローン株間（異なる条件での水耕栽培、ハイブリッド栽培：水耕挿し木苗→圃場栽培）での薬理効果の比較検討を行い、それぞれ株と市場流通品との同等性を検証した。また、カンゾウの他にさらに、オウレンについて同様の実験を行い、有効性と安全性の評価を行った。市場流通品オウレンと水耕栽培品オウレンのエキスを用いて、接触性皮膚炎モデルマウスに対する抗アレルギー効果について検討を行った。マウス1検体当たりベルベリン30 mg/kgの割合で投与する際のエキス量を決定するために、各エキス中におけるベルベリン含有率を、HPLCで定量し算出した。そして、算出されたエキス量に基づいて、各サンプルのエキスをマウスに投与し、発生させた耳介腫脹の大きさを観察し水耕栽培品・

市場流通品における腫脹抑制効果を評価した。また、安全性評価として変異原性を試験するためAmes試験を行い、水耕栽培品オウレンと市場流通品との比較評価を行った。過去の文献において、ベルベリンは弱い変異毒性があり、トポイソメラーゼ活性阻害を引き起こし、フレームシフト変異を誘発することが知られている。トポイソメラーゼ活性阻害の変異原性試験において、高い効果を発揮する菌株として、今回はTA102株を用い、フレームシフト型変異の確認にはTA98株を使用し試験を行った。

## B. 研究方法

### B-1. カンゾウ

市場流通品および水耕栽培品のカンゾウは（独）医薬基盤研究所より提供を受けた。

市場流通品3品、NIB-003、NIB-074、NIB-176および、水耕栽培品5品、GuIV1 #7、GuIV1 #10（鹿島水耕カンゾウ）、GuIV1-4B、GuIV2-7A、GuIV2-9A（医薬基盤研支持体水耕カンゾウ）、ハイブリッド栽培品5品（水耕栽培で育成した苗を北海道野外圃場で栽培）1A IV1-HK1、1B IV1-HK1、2A IV1-HK2、2B IV1-HK2、3B IV1-HK3の計13品のカンゾウ根由来熱水抽出エキスを試料として検討に用いた。各カンゾウ個体についての詳細は以下に示す。

#### カンゾウ市場流通品

名称	GL*
NIB-003	3.10%
NIB-074	2.50%
NIB-176	7.10%

カンゾウ水耕栽培品及びハイブリッド栽培品

名称	GL*	根径	備考
鹿島水耕甘草			
GuIV1 #7	2.65	< 5 mm	IV1-14LB (14L/min)
GuIV1 #10	2.54	< 5 mm	IV1-16LB (16L/min)
-----			
医薬基盤研支持体水耕甘草			
GuIV1-4B	3.81	< 5 mm	GuIV1-4B/-5B/-6B
GuIV2-7A	3.65	≥ 5 mm	
GuIV2-9A	3.27	≥ 5 mm	
-----			
ハイブリッド栽培甘草(北海道研究部圃場)			
1A IV1-HK1	3.66	≥ 5 mm	
1B IV1-HK1	3.43	< 5 mm	
2A IV1-HK2	3.54	≥ 5 mm	
2B IV1-HK2	3.3	< 5 mm	
3B IV1-HK3	3.88	< 5 mm	

\*GL…カンゾウ根に含まれるグリチルリチン酸含量(%)

B-2. エキスの調製法

カンゾウ根の粉碎物に 10 倍量の超純水を抽出溶媒として加え、100°C で 2 時間煮沸した。カンゾウエキスは煮沸液を吸引ろ過、得られたエキスに 96-144 時間の凍結乾燥処理を施し、非晶質の形態で試料とした。試料は -80 °C に保存した。

B-3. 動物および細胞、抗体、抗原等

マウスは、6 週令、雌の BALB/c マウスを購入した。アレルギーを感作、惹起する際に用いた抗原は TNCB (2, 4, 6-trinitro-chlorobenzene) (東京化成, 東京)を用いた。

B-4. グリチルリチン酸モノアンモニウム塩の精製

グリチルリチン酸モノアンモニウム塩は丸善製薬株式会社(尾道, 広島)より純度 70%の粗結晶を購入した。グリチルリチン酸モノアンモニウム塩の粗結晶を少量の 70%酢酸に過剰に溶解し、水浴で加熱した。完全に溶解させ、ろ紙 (JIS5 種 A, アドバンテック東洋株式会社, 東京)でろ過した。ろ液を冷暗所に静置し、結晶を析出させた後、再度、

70%酢酸に溶解し、再結晶化した。この過程を数回繰り返して、純度 95%のグリチルリチン酸モノアンモニウム塩を得た。

純度は HPLC で分析した。分析の条件は以下に示す。

装置	Shimadzu LC-10AD Shimadzu SPD-10A
カラム	Inertsil ODS-3 (5 μm, 4.6 mm I.D x 150 mm)
移動相	CH <sub>3</sub> CN: 2.0% CH <sub>3</sub> COOH/DDW= 40:60
溶媒	DDW
流速	1.0 mL/min
検出	254 nm
カラム温度	40°C

B-5. 試料の純度測定

精製グリチルリチン酸、市場流通品、および水耕栽培品について HPLC によるグリチルリチン酸含量の分析を行った。分析条件は以下に示す。

装置	JASCO PU-2089 plus JASCO MD-2018 plus
分析・解析 制御システム	ChromNAV
カラム	TSKgel ODS-100V (5 μm, 4.6 mm I.D x 150 mm)
移動相	(A) 0.1%TFA : (B) CH <sub>3</sub> CN (B) 10% 0-5min,
濃度勾配	10-90% 5-50 min, 90% 50-60 min
溶媒	DDW
流速	1.0 mL/min
検出	200-600 nm
カラム温度	room temperature

B-6. 接触性皮膚炎モデルマウスによる遅延型アレルギーの病態誘導

BALB/c (7 週令、雌)の側腹部の体毛を感作開始二日前に眼科用はさみと電気シェーバーで剃毛した(day -2 とする)。感作開始日を day 0 とし、アセトンに溶解した 5%TNCB

溶液を 100  $\mu$ L 側腹部に塗布した(感作日を day 0 とする)。Day 7 に 1% TNCB アセトン溶液を右耳介の表裏に 10  $\mu$ L ずつ塗布し(惹起日を day 7 とする)、day 8 (24 時間後)、day 9 (48 時間後)の耳介の腫脹を測定した。耳介の腫脹の測定にはダイアル・シックネス・ゲージ (G-1A、株式会社尾崎製作所) を用い、1 匹につき 3 回測定し、その平均値を実測値とした。肥厚の変化は下記の式により算出した。

D Ear swelling ( $\mu$ m)

= [各測定時の実測値 ( $\mu$ m)] - [初回測定時 (day 0) の実測値 ( $\mu$ m)]

カンゾウエキス経口投与群は、グリチルリチン酸量に換算し 100 mg/kg を設定した。経口投与量の体積は 1 匹当たり最大 200  $\mu$ L 以内になるよう、グリチルリチン酸に精製水(大塚蒸留水、大塚製薬、東京)で調製し、day 0 より惹起 1 日前の day 6 まで計 7 回反復投与した。

#### B-7. オウレンエキス調製

オウレン根の粉碎物に 10 倍量の超純水を抽出溶媒として加え、100  $^{\circ}$ C で 2 時間煮沸した。煮沸液を遠心分離し、上清を回収した後、得られたエキスに 96-144 時間の凍結乾燥処理を施し、非晶質の形態で試料とした。試料は -80  $^{\circ}$ C に保存した。

#### B-8. 標準溶液の調製

標準品としてベルベリン塩化物(シグマアルドリッチ)を用いた。1 mg/ml の濃度になるようミリ Q 水を加え、60  $^{\circ}$ C のウォーターバスで加温しつつ攪拌し溶解した。これを母液とし、段階的に希釈を行い、1.0 mg/ml、0.75 mg/ml、0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0 mg/ml それぞれの濃度の溶液を作製後、0.45  $\mu$ m のシリンジフィルターでフィルトレーションし HPLC サンプルとした。

#### B-9. サンプル溶液の調製

サンプルはオウレンエキス 9 種類 (THS-88830、THS-88835、NIB-0185、NIB-0150、NIB-0042、オウレン 1、オウレン 2、オウレン 3、オウレン 4) を使用した。THS-88830、NIB-0150、NIB-0042、オウレン 2、オウレン 3、オウレン 4 は有効性評価実験に使用し、THS-88835、NIB-0185、オウレン 1、オウレン 4 は安全性評価試験に使用した。それぞれのサンプル中のベルベリンを定量し、有効性評価に用いたサンプルは 1 mg/ml、Ames 試験に用いたサンプルは 0.1 mg/ml の濃度になるようミリ Q 水を加え、60  $^{\circ}$ C の温浴で加温しつつ攪拌し溶解し、0.45  $\mu$ m のシリンジフィルターでフィルトレーションすることで HPLC サンプルとした。

#### B-10. HPLC 分析

HPLC は Agilent 1100 シリーズの HPLC を使用した。Table 1 の条件でベルベリン塩化物とオウレンエキスサンプルの定量分析を行った。得られたベルベリン塩化物のピーク面積とサンプル濃度の相関から検量線を作製し、オウレンエキスサンプルのベルベリンピーク面積から、エキス 1 mg 中に含まれるベルベリンの濃度を計算し、マウスへのエキス投与量を決定した。

#### B-11. 接触性皮膚炎モデルマウスによる遅延型アレルギーの病態誘導と抗アレルギー作用の評価 [Contact hypersensitivity reaction (CHS) 試験]

BALB/c (7 週令、雌) の側腹部の体毛を、感作開始 2 日前に眼科用はさみと電気シェーバーで剃毛した (day -2 とする)。感作開始日を day 0 とし、アセトンに溶解した 5% TNCB (2, 4, 6-trinitrochlorobenzene) 溶液を 100  $\mu$ L 側腹部に塗布した。Day 7 に 1% TNCB アセトン溶液を右耳介の表裏に 10  $\mu$ L ずつ塗布し、24 時間後、48 時間後の耳介腫脹を測定した。耳介腫脹の測定にはダイアルシックネスゲージを使用し、1 匹につき 3 回測定し平均値を実測値として用いた。肥厚の変化は以下の式 (A) を用いて算出した。

$\Delta$ Ear swelling ( $\mu\text{m}$ )

=[各測定時の実測値( $\mu\text{m}$ ) - 初回測定時の実測値( $\mu\text{m}$ )] . . . . . (A)

オウレンエキス経口投与群は、ベルベリン量に換算し 30 mg/kg を設定した。経口投与量の体積は 1 匹当たり最大 200  $\mu\text{L}$  以内になるように、ベルベリン 10 mg/ml に精製水で調製し、day 0 より惹起 1 日前の day 6 まで計 7 回反復投与した。

#### B-12. Ames 試験

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: 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) 使用細菌株は、ヒスチジン要求性細菌株として *Salmonella typhunurium* TA102 (一塩基変異検出)、TA98 (フレームシフト型変異検出) を用いた。

培地は 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) は、キッコーマン株式会社 (千葉) より購入した。

試験前日に種菌株懸濁液を溶解し、ニュートリエントブイヨン培地 10mL に接種した。

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、用事調製したエキスの希釈液各 100  $\mu\text{L}$  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 分のプ

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。

5000、2500、1250、625、313、156、78.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、本試験 II: 625、156、78.1、39.1、19.5、9.77  $\mu\text{g}/\text{plate}$

陰性対照にはエキス調製液の希釈媒体 (DMSO) を 100  $\mu\text{L}$  加え、陽性対照については変異誘導物質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。サンプルにおける変異コロニー数の値が、陰性対照値の倍以上となっているものを陽性、それ以外のものを陰性とした。なお、陰性対照値および陽性対照値は同時に実施した 4 試験は共通に用いた。

#### C. 研究結果

##### C-1. カンゾウ市場流通品、水耕栽培品及びハイブリッド栽培品の有効性評価

CHS 試験でカンゾウ市場流通品、水耕栽培品及びハイブリッド栽培品の有効性評価を行った結果、耳介の腫脹はポジティブコントロール群は、24 時間後で  $147.7 \pm 6.3 \mu\text{m}$ 、48 時間後で  $80.3 \pm 8.6 \mu\text{m}$  だった。これに対して精製グリチルリチン酸投与群は 24 時間後で  $108.0 \pm 11.9 \mu\text{m}$ 、48 時間後で  $61.0 \pm 12.8 \mu\text{m}$  と、グリチルリチン酸投与により腫脹が有意に抑制された。一方、市場流通品エキスでは、平均で 24 時間後に  $105.1 \pm 9.6 \mu\text{m}$ 、48 時間後に  $52.3 \pm 9.7 \mu\text{m}$  となった。水耕栽培品及びハイブリッド栽培品エキスでは、水耕栽培品において平均で 24 時間後に  $109.4 \pm 10.5 \mu\text{m}$ 、48 時間後に  $57.9 \pm 8.24 \mu\text{m}$  となり、ハイブリッド栽培品において平均で 24 時間後に  $106.1 \pm 8.80 \mu\text{m}$ 、48 時間後に  $51.5 \pm 11.1 \mu\text{m}$  となったことから、市場流通品・水耕栽培品・ハイブリッド栽培品カンゾウエキス投与群において、精製グリチルリチン酸投与群と同様に腫脹が抑制され