

た。また、市場流通品と水耕栽培品+ハイブリッド栽培品間の腫脹抑制効率に有意な差は認められなかった (図 1)。

C-2. ベルベリン定量分析

分析の結果、標準品として用いたベルベリン塩化物のチャートにおいて RT5.69 付近に主要な単一ピークが見られた。また、市場流通品と水耕栽培品のクロマトにおいても RT5.68 付近に主要な単一ピークが見られた。また、ピークのスペクトルデータを確認した結果、ベルベリン塩化物と市場流通品・水耕栽培品オウレンエキスのスペクトルは類似していた。この結果から、オウレン水耕栽培品・市場流通品の主要ピークは、ベルベリンのピークであると判断した (図 2)。ベルベリン標準品濃度とピーク面積値から作製された検量線を用い、エキスサンプル 1 mg/ml 中に含まれるベルベリン濃度を計算した。ベルベリン濃度の平均は市場流通品では $23.62 \pm 1.04 \%$ 、水耕栽培品では $21.55 \pm 0.57 \%$ となった。この結果から、水耕栽培品と市場流通品間においてベルベリン含有量に有意な差は認められなかった (図 3)。以上の結果を踏まえた上で、今回マウスに投与するベルベリン 30 mg/kg 濃度のエキス量の算出を行った (Table 2)。

C-3. オウレンの抗アレルギー活性評価 (CHS 試験)

我々は予備的検討で、T 細胞依存的に炎症が誘発されるアレルギーマウスにおいて、30 mg/kg 濃度での経口投与実験を行った結果、アレルギー反応抑制効果を確認していた (data not shown)。予備検討の結果を踏まえ行った今回の試験の結果、ポジティブコントロール群の腫脹が 24 時間後に $120.3 \pm 7.1 \mu\text{m}$ 、48 時間後に $56.3 \pm 10.4 \mu\text{m}$ となった。これに対してベルベリン塩化物投与群の腫脹は 24 時間で $89.7 \pm 11.0 \mu\text{m}$ 、48 時間で $36.3 \pm 13.2 \mu\text{m}$ であった。ポジティブコントロール群に対し、ベルベリン塩化物投与群で有意に耳介腫脹の抑制が見られた。一方、市場流

通品のオウレンエキス投与群は 24 時間で $97.5 \pm 6.8 \mu\text{m}$ 、48 時間で $37.7 \pm 6.2 \mu\text{m}$ 、水耕栽培品のオウレンエキス投与群では 24 時間で $88.2 \pm 8.9 \mu\text{m}$ 、48 時間で $35.7 \pm 10.0 \mu\text{m}$ となり、水耕栽培品・市場流通品オウレンエキス投与群において、ベルベリン塩化物投与群と同様に腫脹が抑制された。また、市場流通品と水耕栽培品間の腫脹抑制効率に有意な差は認められなかった (図 4)。

C-4. オウレンの変異原性試験 (Ames 試験)

復帰コロニー数と被験物質用量をまとめた表を Table 3-7 にまとめた。Ames 試験では両サンプルとも TA98 株において陽性となったが、比活性値を比較したところ水耕栽培品の比活性値は市場流通品の値より低い値を示した。非代謝活性化条件の平均比活性値は市場流通品で 1982 rev./mg、水耕栽培品で 1017.5 rev./mg であり、一方、代謝活性化条件の平均比活性値は市場流通品では 336.5 rev./mg、水耕栽培品で 181.5 rev./mg であった。この結果から、水耕栽培品は、市場流通品の変異原性よりも低い傾向があると示唆された。

全サンプルの比活性値を算出し比較した結果、市場流通品 THS-88835 の比活性値が他のサンプルに比べ有意に高い値を示したことから、オウレンの主要成分であるベルベリンの濃度と、変異原性の相関を調べるため、それぞれのサンプル中のベルベリン濃度を測定した。その結果、NIB-0185 では 12.6%、THS-88835 では 20.5%、オウレン 1 では 18.0%、オウレン 4 では 20.5% であり、比活性値との相関は無い可能性が示唆された (図 5)。

D. 考察

D-1. カンゾウ

今回、カンゾウ熱水抽出画分の抗アレルギー活性の評価法として、T 細胞依存性アレルギー (IV 型アレルギー・遅延型アレルギー) の接触性皮膚炎モデルを用いた実験系を構築した。評価法は耳介の腫脹を測定する方法

であり、測定技術の安定により信頼性の高いデータを得ることができた。

カンゾウの接触性皮膚炎モデルでは、100 mg/kg相当のグリチルリチン酸を含むカンゾウエキスを、感作当日から惹起前日まで7日間反復投与することによる抗アレルギー効果が示された。今回の検討では市場流通品、水耕栽培品、ハイブリッド栽培品のいずれも、ほぼ同等の抑制効果が示されている。現在までに接触性皮膚炎におけるグリチルリチン酸あるいはカンゾウエキスの経口投与による抗アレルギー作用について評価している報告はなく、今回の結果は初めて示した結果である。

ヒトの場合、遅延型アレルギーである接触性皮膚炎は医薬品、化学物質、天然物、金属などの低分子物との接触により感作が成立することが多い。また即時型アレルギーには花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどがあげられる。しかしヒトは、常に複数の抗原にさらされており、連続した感作を受けている。また他の炎症と合併することも珍しくなく、マウスのように明確ではない。そのような理由から、有効性評価のためにいくつかのタイプのアレルギーモデルを検討する必要があると考えられた。

本研究で我々は、T細胞依存的に炎症誘導されるアレルギー性接触性皮膚炎モデルマウスに対して、カンゾウの市場流通品と水耕栽培品及びハイブリッド栽培品の熱水抽出エキスが、抗アレルギー効果を有することを示した。今後、さらなる検討を行うとともに、カンゾウエキスで病態の改善が報告されている、細菌性肝炎、アレルギー性喘息モデルなど、他のアレルギー性疾患についても検討を試みようと考えている。

D-2. オウレン

今回、オウレンについて有効性評価と安全性評価を行った。ベルベリン定量分析の結果、水耕栽培品と市場流通品熱水抽出エキスに含まれるベルベリン濃度は20%前後となり、有意な差はなかった。またCHS試験の結果、

水耕栽培品と市場流通品の抗アレルギー活性に差は見られず、同等の有効性が確認された。よって水耕栽培品と市場流通品は同等の薬理効果を持つことが示唆された。NIB-0042と水耕オウレン3を比較すると、オウレン3の方が、腫脹抑制効果が少し高かった。この結果を考慮すると、水耕栽培品の方が市場流通品よりも高い薬理効果がある可能性が予想された。水耕栽培品と市場流通品のベルベリン以外の含有成分を調査することで、アレルギー反応抑制効果の差について深い考察が可能になると考え、今後両サンプルの成分について、詳細な分析を行う予定である。また、今回はIV型アレルギー試験のみで評価をしたため、今後はI型など他のアレルギーにおける評価を行い、さらに詳細なアレルギー抑制効果の評価を行いたい。

Ames試験ではオウレン市場流通品・水耕栽培品の両サンプルとも、変異原性は陽性となった。しかし、比活性値を比較したところ水耕栽培品の比活性値は市場流通品の値より低い値を示した。このことから水耕栽培品は市場流通品よりも変異原性が低い傾向になることが示唆された。過去の文献で、ベルベリン自体に弱い変異原性があり、TA98株で陽性反応が認められたとの報告がある。また、ベルベリンがオウレンの主要成分であることから、オウレンエキスがTA98株において陽性を示す原因の一つがベルベリンであることが推測された。また、代謝活性化条件下においては、同比活性値は非代謝活性化条件下と比較して低い値を示したことから、水耕栽培品オウレンを経口服用した際には、体内での代謝を受けて弱毒化され、より変異原性が低くなることが予想された。また、市場流通品サンプルのTHS-88835の比活性値が他のサンプルに比べかなり高い数値を示したが、ベルベリン濃度との相関は見られなかったことから、ベルベリン以外の成分が、THS-88835が示した高い比活性値に寄与していることが考えられた。

CHS試験とAmes試験の結果を踏まえ、今後さらに深い検討を進めるためには、水耕栽培

培品と市場流通品オウレンの詳細な成分分析が必要になる。今回我々はCHS試験に用いたオウレンエキスのTLC分析を行ったところ、市場流通品サンプルにおいて、水耕栽培品には見られないスポットが確認された(図6)。このことから、オウレンの含有成分は、産地や栽培条件などの差により変化することが予想された。今後さらに詳細に成分分析に取り組みたい。

E. 結論

E-1. カンゾウ

我々は、カンゾウ水耕栽培品及びハイブリッド栽培品熱水抽出エキスの抗アレルギー活性の評価を行った。T細胞依存的アレルギーである接触性皮膚炎マウスモデルにカンゾウエキスを経口投与したところ、グリチルリチン酸単独、あるいは市場流通品カンゾウと同等の抗アレルギー活性を示した。

E-2. オウレン

本実験の結果から、有効性において水耕栽培品と市場流通品の両者間に有意な差はなく、さらに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が示唆された。

F. 研究業績

1. 論文発表

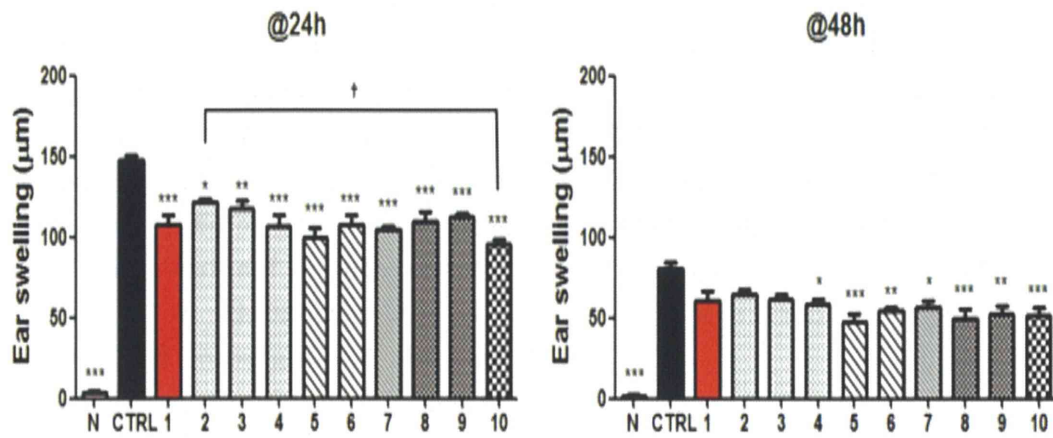
- 1) Koizumi, D., Shirota, K., Akita, R., Oda, H., Akiyama, H.: Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods, *Food Chem.*, 150, 348-352 (2014).

- 2) Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T.: Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1-5 (2014).
- 3) Ohtsuki, N., Sugimoto, R., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, T., Toyoda, M., Akiyama, H.: 化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析, *日本食品化学学会誌*, 21, 155-162 (2014)
- 4) Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T.: A novel trait-specific real-time PCR method enable quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize, *Eur Food Res Technol* (2014), in press.

2. 学会発表

- 1) 化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析について, 大月 典子、杉本 理恵、佐藤 恭子、杉本 直樹、秋山 卓美、豊田 正武、穂山 浩, *日本食品化学学会 第20回総会・学術大会* (2014.5)

- ## G. 知的財産権の出願, 登録状況
- なし。



Each column represents the Mean \pm S.E.M. of 5 mice.
 *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. the control group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.
 † $p < 0.05$ vs. the group 2 by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

図1 市場流通品(2-4)、水耕栽培品(5-7)及びハイブリッド栽培品(8-10)エキスの経口投与における耳介腫脹抑制

1.GL (standard) 2.NIB-003 3.NIB-074 (mix) 4.NIB-176 5.IV1-14LB 6.IV1-16LB 7.GuIV1-4B 8.IAIV1-HK1 + 2AIV1-HK2 (mix) 9.IBIV1-HK1 + 2B IV1-HK2 (mix) 10.3BIV1-HK3

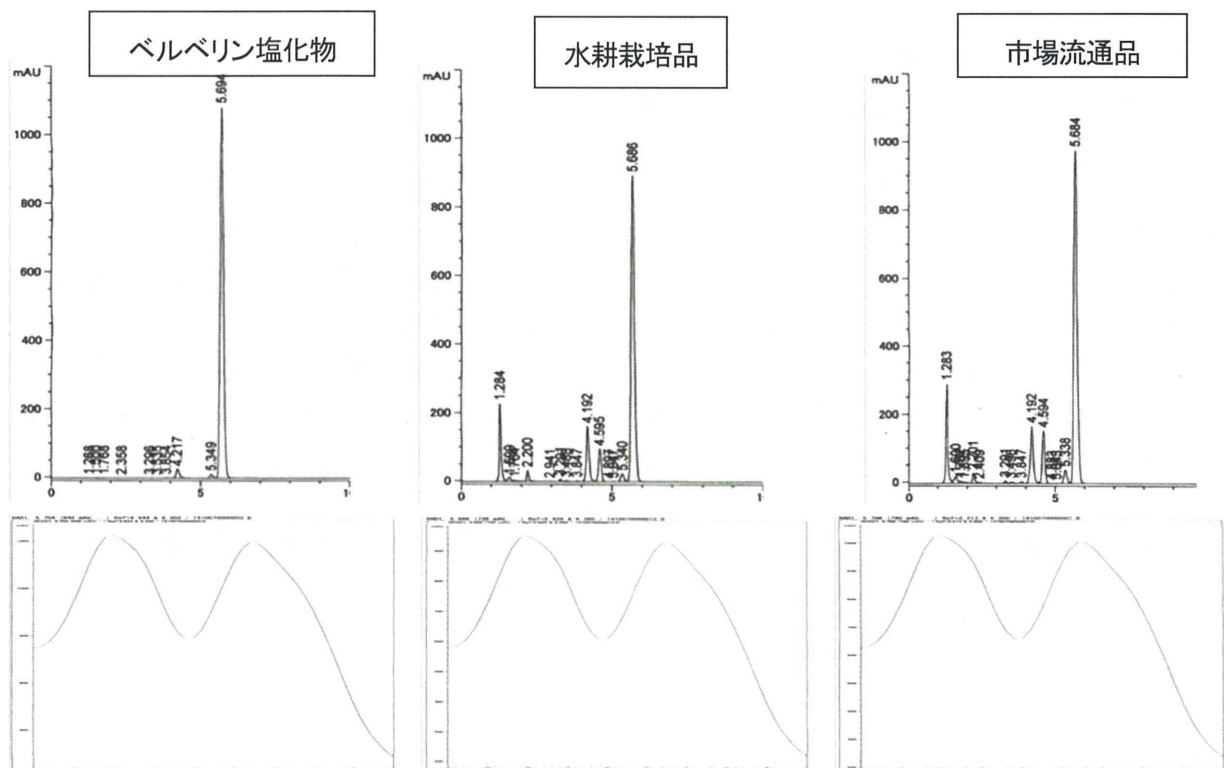


図2 ベルベリン塩化物、オウレンエキスサンプル HPLC チャートとスペクトルデータ
 上:HPLC チャート 下:主要ピークのピークスペクトルデータ

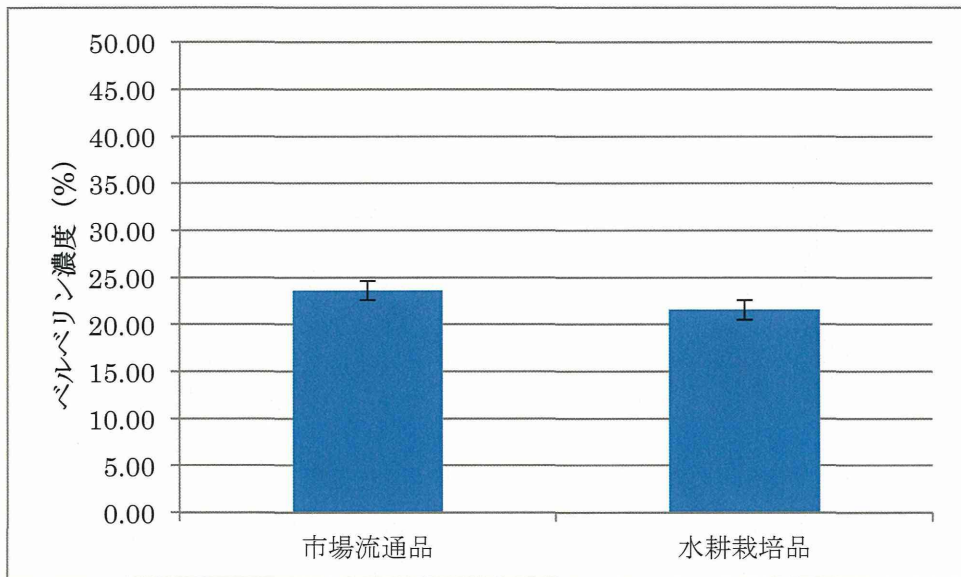
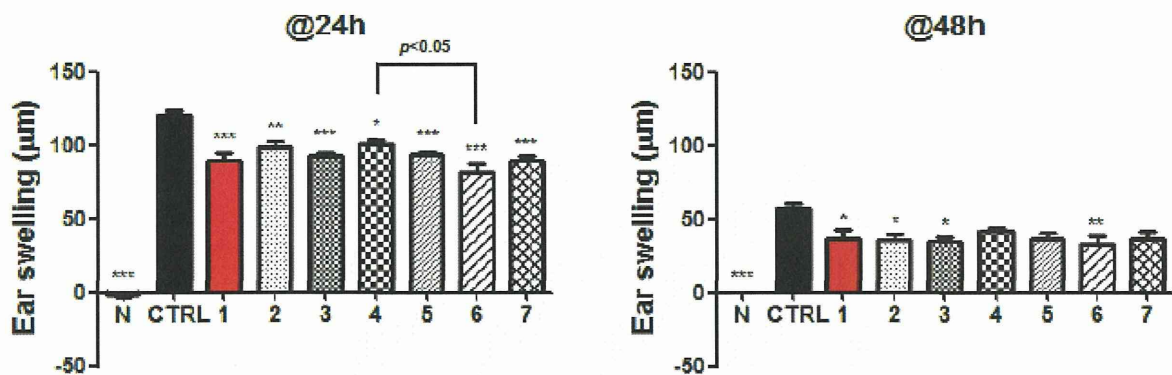


図3 市場流通品と水耕栽培品オウレンエキスに含まれるベルベリン濃度の比較



Each column represents the Mean \pm S.E.M. of 5 mice.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. the control group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

図4 接触性皮膚炎マウスモデルを用いた CHS 試験結果

24 時間後、48 時間後の耳介腫脹の大きさを測定し、アレルギー反応抑制効果を評価した。

左: 24 時間後の腫脹サイズ 右: 48 時間後の腫脹サイズ

N: ネガティブコントロール CTRL: ポジティブコントロール 1: ベルベリン塩化物 2: THS88830
 3: NIB-0150 4: NIB-0042 5: 水耕オウレン 2 6: 水耕オウレン 3 7: 水耕オウレン 4

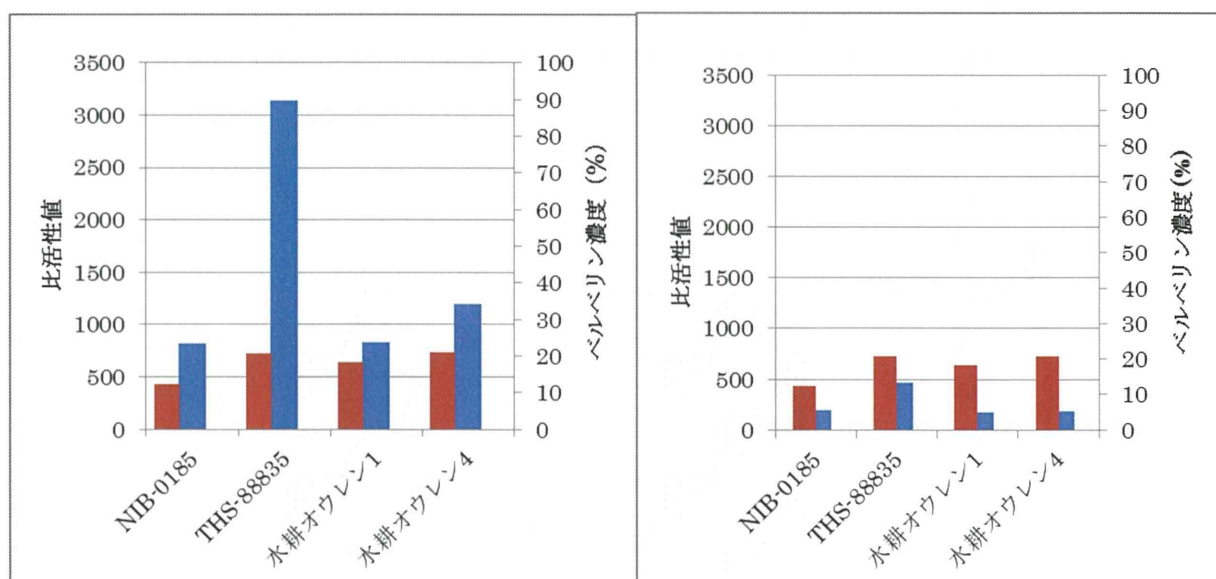


図5 比活性値とベルベリン濃度の比較
 青グラフ:比活性値 赤グラフ:ベルベリン濃度
 左:S9mix 非添加条件 右:S9mix 添加条件

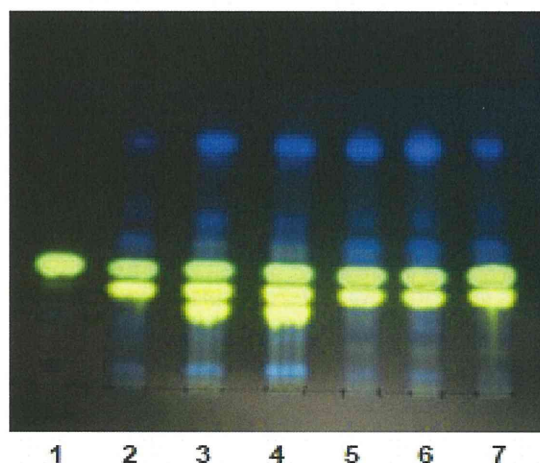


図6 水耕栽培品・市場流通品オウレンサンプル
 の TLC 分析結果

展開溶媒 *n*-ブタノール:水:酢酸=7:2:1

UV 検出波長 340nm

1:ベルベリン塩化物 2:THS88830

3:NIB-0150 4:NIB-0042 5:水耕オウレン 2

6:水耕オウレン 3 7:水耕オウレン 4

Sample concentration :1 mg/ml
Column 1-column 2 ODS (4.6×150 mm, 5μm, 12nm)
Mobile phase: 50 % Acetonitrile + KH ₂ PO ₄ 3.4 g + SDS 1.7 g
Injection: 10 μl
Flow :1.0 ml/min
Column temp: 40 °C
Detect: 340nm

Table 1 HPLC 分析条件

Sample	THS88830	NIB-0150	NIB-0042	copts2	copts3	copts4
berberine concentration (%) in extract 1 mg/ml	24.36	24.08	22.43	21.20	21.24	22.20
berberine 30 mg/kg						
extract for 7 days(mg)	172.40	174.45	187.27	198.11	197.77	189.19

Table 2 オウレンエキス中に含まれるベルベリン量と必要エキス総量

代謝活性化系の有無		試験実施期間: 2014年9月21日より2014年9月24日				代謝活性化系の有無		試験実施期間: 2014年9月21日より2014年9月24日			
		被験物質用量 (µg/plate)		復帰変異数 コロニー数/plate (平均)				被験物質用量 (µg/plate)		復帰変異数 コロニー数/plate (平均)	
				塩基対置換型						塩基対置換型	
				TA102						TA98	
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	390	421	15	19	390	421	15	19		
		(406)		(17)		(406)		(17)			
	4.88	344	358	24	19	354	348	17	23		
		(351)		(22)		(351)		(20)			
	9.77	398	373	22	18	347	383	26	21		
		(386)		(20)		(365)		(24)			
	19.5	383	399	22	13	355	341	22	24		
		(391)		(18)		(348)		(23)			
	39.1	461	440	38	26	352	397	34	29		
		(451)		(32)		(375)		(32)			
	78.1	627 *	510 *	88	76	490 *	473 *	99	122		
		(569)		(82)		(482)		(111)			
156	524 *	559 *	132	117	440 *	462 *	186	180			
	(542)		(125)		(451)		(183)				
313 †	517 *	535 *	107 *	112 *	544 *	457 *	113 *	105 *			
	(526)		(110)		(501)		(109)				
625 †	501 *	476 *	23 *	33 *	437 *	458 *	21 *	38 *			
	(489)		(28)		(448)		(30)				
1250 †	363 *	361 *	14 *	20 *	301 *	279 *	13 *	8 *			
	(362)		(17)		(290)		(11)				
2500 †	255 *	248 *	0 *	0 *	208 *	194 *	0 *	0 *			
	(252)		(0)		(201)		(0)				
5000 †	164 *	198 *	0 *	0 *	194 *	94 *	0 *	0 *			
	(181)		(0)		(144)		(0)				
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	483	430	18	18	483	430	18	18		
		(457)		(18)		(457)		(18)			
	39.1	482	456	36	30	466	450	31	31		
		(469)		(33)		(458)		(31)			
	78.1	494	447	28	36	484	529	35	34		
		(471)		(32)		(507)		(35)			
	156	499	402	40	35	501	535	36	37		
		(451)		(38)		(518)		(37)			
	313	579	550	59	87	597	538	72	82		
	(565)		(73)		(568)		(77)				
625	666	700	116	99	546	599	101	106			
	(683)		(108)		(573)		(104)				
1250	560 *	576 *	112 *	102 *	587 *	535 *	112 *	95 *			
	(568)		(107)		(561)		(104)				
2500 †	593 *	564 *	48 *	51 *	556 *	580 *	59 *	72 *			
	(579)		(50)		(568)		(66)				
5000 †	687 *	681 *	34 *	27 *	745 *	769 *	27 *	27 *			
	(684)		(31)		(757)		(27)				
隔性	S9 mixを必要としないもの	名称	MMC	AF-2	名称	MMC	AF-2	名称	MMC	AF-2	
	用量(µg/plate)	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.1	
対照	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/plate	3196	2848	365	430	3196	2848	365	430	
		(3022)		(398)		(398)		(3022)		(398)	
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA	名称	2AA	2AA	名称	2AA	2AA	
	用量(µg/plate)	5	0.5	5	0.5	5	0.5	5	0.5	0.5	
	コロニー数/plate	1532	1378	416	391	1532	1378	416	391	391	
		(1455)		(404)		(1455)		(404)		(404)	

陰性対照, ジメチルスルホキシド
MMC, Mitomycin C; AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene
†, 沈殿が認められた。
*, 生育阻害が認められた。

陰性対照, ジメチルスルホキシド
MMC, Mitomycin C; AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene
†, 沈殿が認められた。
*, 生育阻害が認められた。

Table 3 Ames 試験結果(水耕オウレン 1)

Table 4 Ames 試験結果(水耕オウレン 4)

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: 2014年9月16日より2014年9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		
		TA102		TA98		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	391 (386)	380 (28)	38 (28)	18	
	39.1	363 (346)	328	35 (32)	28	
	78.1	480 (449)	417	97 (92)	86	
	156	502 (508)	514	128 (142)	155	
	313 †	482 * (500)	517 *	67 * (76)	84 *	
	625 †	428 * (423)	417 *	23 * (27)	31 *	
	1250 †	394 * (378)	361 *	15 * (15)	15 *	
	2500 †	276 * (307)	338 *	1 * (2)	2 *	
	5000 †	188 * (239)	290 *	0 * (0)	0 *	
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	444 (437)	429	21 (25)	29	
	39.1	423 (441)	458	30 (30)	30	
	78.1	484 (485)	486	33 (33)	33	
	156	537 (504)	471	37 (35)	32	
	313	511 (502)	492	87 (88)	88	
	625	502 (518)	534	80 (77)	74	
	1250	619 (603)	587	100 (94)	87	
	2500	546 * (557)	568 *	61 * (77)	93 *	
	5000 †	606 * (595)	583 *	42 * (42)	41 *	
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称 MMC		AF-2		
		用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.05	0.1		
		コロニー数/plate	2801 (2762)	2723 (348)	334 (348)	362
	S9 mixを 必要とす るもの	名称 2AA		2AA		
	用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5	0.5			
	コロニー数/plate	1586 (1475)	1364 (452)	461 (452)	442	

陰性対照, ジメチルスルホキシド
MMC, Mitomycin C; AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene
†, 沈殿が認められた。
*, 生育阻害が認められた。

Table 5 Ames 試験結果(NIB-0185)

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: 2014年9月16日より2014年9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		
		TA102		TA98		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	391 (386)	380	38 (28)	18	
	39.1	428 (445)	462	171 (151)	131	
	78.1	552 * (558)	564 *	110 * (107)	104 *	
	156	567 * (579)	590 *	45 * (48)	50 *	
	313 †	601 * (635)	669 *	28 * (25)	22 *	
	625 †	325 * (332)	338 *	10 * (12)	13 *	
	1250 †	222 * (226)	230 *	2 * (2)	1 *	
	2500 †	183 * (193)	203 *	0 * (0)	0 *	
	5000 †	119 * (96)	72 *	0 * (0)	0 *	
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	444 (437)	429	21 (25)	29	
	39.1	454 (469)	483	35 (32)	28	
	78.1	510 (497)	484	30 (37)	43	
	156	509 (514)	518	87 (87)	86	
	313	653 (637)	620	184 (173)	161	
	625	600 (637)	674	120 * (140)	160 *	
	1250	662 * (691)	719 *	50 * (49)	48 *	
	2500 †	675 * (647)	619 *	19 * (19)	19 *	
	5000 †	761 * (759)	756 *	15 * (14)	12 *	
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称 MMC		AF-2		
		用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.05	0.1		
		コロニー数/plate	2801 (2762)	2723 (348)	334 (348)	362
	S9 mixを 必要とす るもの	名称 2AA		2AA		
	用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5	0.5			
	コロニー数/plate	1586 (1475)	1364 (452)	461 (452)	442	

陰性対照, ジメチルスルホキシド
MMC, Mitomycin C; AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene
†, 沈殿が認められた。
*, 生育阻害が認められた。

Table 6 Ames 試験結果(THS-88835)

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: 2014年9月21日より2014年9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	
			TA102		TA98	
S9 mix (-)		0 (陰性対照)	390 (406)	421	15 (17)	19
		1.22	293 (304)	315	18 (20)	22
		2.44	293 (319)	344	14 (15)	15
		4.88	341 (333)	324	20 (20)	19
		9.77	326 (321)	316	13 (17)	21
		19.5	313 (302)	290	17 (24)	30
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	MMC		AF-2	
		用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.05		0.1	
		コロニー数/plate	3196 (3022)	2848	365 (398)	430

陰性対照, ジメチルスルホキシド

MMC, Mitomycin C; AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

Table 7 Ames 試験結果 (THS-88835:本試験 II)

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：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

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 シャクヤク：切花収穫時に「1株に8本の茎を残すように採花」する方法は、園芸と薬用の双方で安定した生産を実現するための採花方法となり得ることを、根の収量と Paeoniflorin 含量から示唆した。根の低温貯蔵により Paeoniflorin 含量が安定して高値を示し、また湯通し加工により 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose、Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が増加したが、皮去り加工により Albiflorin と (+)-Catechin の含量が減少した。低温貯蔵と湯通し加工を行えば、乾燥機による乾燥でも成分に変化は見られなかった。

ダイオウ：*Rheum palmatum* 由来で RPII 型・Rp5 タイプの系統 29 及び RPI 型・Rp4 タイプの系統 38 は長野県菅平及び北海道北部の環境に適した系統であることが示された。この2系統が成分的に優れていることを、栽培5年目及び栽培3年目の根茎及び根における Lindleyin の含量から示した。タンニン類を遠心式限外ろ過フィルターで順次分離し、分子量の異なる分画を LC-MS 分析することにより、重合度が6までのプロシアニジン類を測定することが可能であった。濃縮される分画のパターンにサンプル間で差が見られたことから、本法を品質評価に応用できる可能性が示唆された。

エゾウコギ：屋外馴化させた88株のうち84株を越冬させ、圃場栽培に移行させた。富山市の高地で栽培した23株はほぼ良好な生長経過を辿った。挿し穂による養液栽培の結果、硬質鹿沼土と日向土の3:1の混合土が栽培に適することがわかったが、発根率は6%程度であった。葉の成分としてカフェオイルキナ酸類を中心に10化合物を同定した。またサポニン成分の含有を確認した。

研究協力者

朱 姝 富山大学和漢医薬学総合研究所
助教
数馬恒平 同 助教
葛 躍偉 同 研究員
伏見裕利 同 准教授
平 修 福井県立大学生物資源学部
准教授
川原信夫 （独）医薬基盤研究所薬用植物
資源研究センター センター長
菱田敦之 同 北海道研究部

研究サブリーダー

田村隆幸 富山県薬用植物指導センター
主任研究員
村上守一 同 元所長
児玉 容 長野県健康福祉部薬事管理課
主査薬剤師
磯田 進 昭和大学薬用植物園 講師
川本元裕 北陸機材株式会社 専務

A. 研究目的

漢方医学の科学的エビデンスが明らかに

なるに従い、漢方方剤の需要が延びている。一方、方剤に配合される生薬は約83%を中国に依存しており、今後、中国の自然環境の変化や国家政策によっては生薬の供給が滞る事態も危惧される。漢方医学の持続性を担保する意味から、日本で栽培可能な生薬は栽培化を図るべきである。

しかし、生薬の薬価の引き下げや栽培従事者の高齢化などから生薬を作り出す薬用植物の栽培面積は年々減少する傾向にある。一方、里山開発や休耕田の利用、中高齢者の副収入源として薬用植物の栽培を希望する地域も多い。矛盾する現象ではあるが、作出物の品質保証と一定量の作出物が安定供給できない限り、生薬関連企業は国産品を購入せず、栽培は広がらない。産学官が連携して薬用植物の栽培研究と品質保証を行い、地域住民に栽培・加工方法を指導して、最終的に作出物を産業界が利用するというサイクルを作り出すことが現在の緊急の課題である。

そこで本研究では、これまでの薬用植物の多様性解析研究を通じて優良系統または成分的に特徴を有する系統として明らかにしてきた3生薬（大黄、芍薬、刺五加）の基原植物について、栽培法を確立すること、作出物に含まれる成分の組成と含量及び組織内分布を明らかにして、栽培系統、栽培年数及び加工調製法を決定すること、さらに実際にブランド製品として開発することを目的とする。

シャクヤクについては、園芸用・薬用の双方に利用可能な品種を選択することにより収益率を向上させ、地域での栽培拡充を図る。また、鎮痙薬とされる芍薬（白芍）のみならず、婦人科疾患に有効な赤芍として使用可能な品種を栽培することで、芍薬の可能性を広げる。

ダイオウについては、瀉下活性のあるSennoside含量のみならず、他の成分をも広範に含有した新しい系統を選抜し、漢方的に虚証の患者にも適応可能な大黄を作出する。また、質量顕微鏡で主要成分の組織内分布を明らかにすることにより、作出物の加工調製を科学的根拠に基づいて行う。

エゾウコギについては、養液栽培と圃場での栽培を組み合わせた方法を開発する。また、生活習慣病や認知症の改善に効果が期待できることから、作出物から健康食品を開発し流通させることにより、中高年疾患の予防に貢献する。

以上の薬用植物から仕上げた加工品を、実際に生薬として流通させるためには、医薬品として国内規格を満たす品質であることが求められる。そこで、最終産物について、第十六改正日本薬局方（日局）に記載されている試験を実施し、品質を評価する。

平成26年度は以下の内容の研究を行った。

シャクヤクでは、園芸と薬用の双方で安定した生産を実現するための採花方法の確立を目的として、採花3年目の根の収量及び採花2年目のペオニフロリン含量などを検討した。また、昨年度に引き続き根の加工調製法の違いによる成分の変動を調べ、さらに根における主要4成分の組織内分布をイメージング質量分析で明らかにして、最適な加工調製法をほぼ確立した。また無機元素の含量と煎じ液とした場合の溶出量を調べた。

ダイオウでは、長野県上田市菅平と北海道名寄市における圃場栽培を継続し、栽培4年目の株の一部を収穫した。平成24年度に長野県菅平で収穫した栽培5年目の株のうち系統29について含有成分の同定を行った。また、Lindleyinを単離して、11系統における含量を調べた。さらに平成25年に収穫した栽培3年目の系統29と系統38についても同成分を定量し、含量を比較した。一方、タンニン類を多く含むことが判っている大黄市場品と栽培品の80%アセトンエキスを遠心式限外ろ過フィルターで順次分離し、分画をLC-MS分析することにより、高重合度のプロシアニジン類の検出を試みた。

エゾウコギでは、昨年度、閉鎖環境下で養液栽培を行い屋外馴化まで至った植物体について、圃場栽培を行った。さらに、挿し穂の養液栽培を試みた。葉の成分分析も継続した。

B. 研究方法

1. 実験材料

1) シャクヤク

1. 採花方法の検討：薬用利用可能な園芸品種「エジュリスパーバ」の栽培5年目及び6年目の根（昨年度から継続して採花処理を行っているもの）

2. 加工調製法の検討：栽培4年目の薬用品種「梵天」の根

3. 有機化合物の組織内分布：栽培6年目の「エジュリスパーバ」の根

4. 無機元素の含量と溶出量：栽培5年目の「エジュリスパーバ」の根、栽培4年目または8年目の薬用品種「梵天」の根、日本及び中国市場の日本産芍薬、中国産芍薬（白芍）と赤芍

（上記の園芸品種と薬用品種は、富山県薬用植物指導センターの栽培品）

2) ダイオウ

1. 栽培—長野県菅平薬草栽培試験地：富山大学で保有しているダイオウの種子から16系統（*matK*遺伝子の塩基配列において5遺伝子型6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日に菅平の圃場に定植した。

2. 栽培—北海道（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部：ダイオウ19系統の種子を北海道研究部で育苗するかまたは富山県薬用植物指導センターで育苗し、2011年6月28日に北海道研究部の圃場に定植した。

3. 品質評価：菅平薬草栽培試験地で2008年～2012年に栽培され（Ver. 1）、収穫された栽培5年目のダイオウ11系統の根茎及び根。2011年～2014年に栽培され（Ver. 2）、2013年に収穫された栽培3年目のダイオウ2系統（29、38）の根茎及び根

4. 網羅的成分分析：中国採集品 GS158 (D1-3、D1-4)、菅平栽培 Ver. 2 の系統 D4 の栽培 3 年目の株、北鮮大黄（TMPW No. 20580）、中国産箱黄（TMPW No. 19929）、中国産六成吉（TMPW No. 19927）

3) エゾウコギ

2012年に薬用植物資源研究センター北海道研究部より供与されたエゾウコギの5系統の種子を富山県薬用植物指導センター及び昭和大学薬学部薬用植物園で後熟処理し、休眠打破処理を行ったものを、2013年にユニットハウス内で養液栽培して植物体に育て、その後10月下旬から薬用植物指導センターで屋外馴化を行ったエゾウコギ88株。

2. 研究方法

本研究では、学（富山大学和漢研、福井県立大学）と官（基盤研薬用植物資源研究センター、富山県、長野県）が連携し、付加価値のある薬用植物の選抜、栽培方法の確立、作出物の加工調製方法の確立を行う。さらに、養液栽培については富山県内企業が参画する。各々の過程で各種機器分析を駆使して科学的根拠を得る。研究計画を図1に示す。

1) シャクヤク

1. 採花方法の検討：36株を3群に分け、各群の採花方法を「無採花」、「1株に8本の茎を残すように採花」及び「過剰採花（茎数の半数を採花または6本を残して採花）」と設定した。2012年は6月、2013年と2014年は5月に茎を地際で切り取った。2014年12月1日に根を掘り取り、根の径により2群に分けてそれぞれ乾燥前・後の重量を測定した。さらに、採花2年目の根（栽培5年目、2013年10月29日に採取し、11月8日まで30℃で送風乾燥）について8成分を定量した。

2. 加工調製法の検討：直径2.0cm前後の根を選別し、それらを均等に15グループに分けた（各8個体）。15グループの根に対してそれぞれ15通りの加工・乾燥法（低温処理の有無、周皮の有無、湯通しの有無、室内乾

乾燥、室外乾燥または機械乾燥)を行った。終了後、各グループ中5個体の根についてそれぞれ8成分を定量した。また、分光色差計を用いて根の横断面の色を評価した。

3. 有機化合物の組織内分布：根の切片の表面にイオン化支援剤(DHB)をスプレーし、MALDI-TOF MSを用い、Pentagalloylglucose (PGG)はネガティブモードで、Albiflorin、Paeoniflorin、Paeonol及びCatechinはポジティブモードでイメージング質量分析測定を行った。

4. 無機元素の含量と溶出量：シャクヤクの根または生薬本体、及び煎じ液中に溶出される無機元素の種類と含量を、ICP発光分析装置を用いて測定した。

2) ダイオウ

1. 栽培—菅平薬草栽培試験地：2011年6月12日定植後、無肥料で栽培し、2012年6月28日、2013年6月27日、8月8日及び9月11日、2014年6月17日、7月15日及び9月18日に生育調査を実施した。2013年11月5日に10系統、2014年11月6日に11系統のそれぞれ一部の株を収穫した。形態観察した後、地下部を根茎と根に分け、それぞれ自然乾燥後、通風乾燥した。新鮮時と乾燥後にそれぞれ重量を測定した。

2. 栽培—薬用植物資源研究センター北海道研究部：2011年6月28日定植後、施肥をして栽培し、2012年8月14日、2013年8月16日及び10月22日、2014年10月8日に生育調査を実施した。10月8日に収穫して地下部の形態を調べ、また根茎と根の重量を測定した。その後、根茎と根を自然乾燥した後、通風乾燥し、異物を除去して評価用サンプルとした。

3. 品質評価：HPLC分析によりLindleyinを定量した。LC/MS分析及び単離した化合物との比較などにより、系統29などの含有成分を同定した。

4. 網羅的成分分析：試料の80%アセトンエ

キスを遠心式限外ろ過フィルターで順次分離した。濃縮された分画をLC/MSやMALDI-TOF MSを用いて分析し、プロシアニジン類の組成を調べた。

3) エゾウコギ

1. 栽培：昨年度、播種による養液栽培で育て、屋外馴化まで進んだ植物体を、圃場栽培に移行させた。また予備実験として、2013年11月中旬に採取した若い枝を冷蔵保存し、翌年2月26日に枝を調製した後、3種類の土に挿した。その後、養液栽培を実施した。
2. 葉の成分分析：昨年度に継続して葉のLC/MS分析を行い、含有成分を同定した。

C. 研究結果

1) シャクヤク

1. 栽培：採花3年目の採花前の茎数は、無採花群、8本温存採花群及び過剰採花群でそれぞれ15.7本、13.4本及び12.1本となり、各群間に有意差は認められなかった。採花3年目の乾燥根重については、根の径に係わらず無採花群と8本温存採花群は同等で、2群の合計値ではそれぞれ635.1g、665.0gであった。一方、過剰採花群では合計値が365.0gで、有意に収量が減少した。

採花2年目の根の成分含量については、Paeoniflorin含量が47.7~58.5mg/gであり、採花群によって大差はなかったが、過剰採花群が最も高く、次いで8本温存採花群であった。Albiflorin、(+)-Catechinでも同様の含量順位となった。また、PGG、Paeonol、Gallic acid及びBenzoic acidはいずれも8本温存採花群で最も高く、次いで過剰採花群という結果であった。

2. 加工調製法の検討：約1ヶ月間の低温貯蔵を経た6グループではPaeoniflorin含量が安定しており、高い値を示した。これらの内、湯通し加工を行っていない4グループでは最も高いL*値を示し、ほぼ白色であった。一方、低温貯蔵を行わず、また湯通しをせずに周皮を除いて乾燥した3グループ及び周皮をつけたまま熱風乾燥した1グループで

は Paeoniflorin 含量が低下し、反対に Benzoic acid 含量が増加した。これら 4 グループでは顕著な変色が認められ、L*値が低かった。また、湯通し加工を行った 5 グループでは、PGG、Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が増加した。これらのグループでは安定した L*値を示し、さらに澱粉が糊化されたことにより内部が淡黄色を呈して、b*値が比較的高い傾向にあった。なお、皮去り加工により Albiflorin 及び (+)-Catechin の含量の減少が見られた。

3. 有機化合物の組織内分布：Albiflorin はプロトン付加体 m/z 481 とフラグメントイオン m/z 197、Paeonol はプロトン付加体 m/z 167、Catechin はプロトン付加体 m/z 291、PGG は脱プロトン体 (m/z 939) でそれぞれイメージングすることにより、根の切片表面における各化合物の局在を確認できることが判明した。Albiflorin、Paeonol 及び Catechin はシャクヤクの根の皮層周辺に存在し、一方 PGG は根の全体に分布し、特に木部に多い傾向が見られた。

4. 無機元素の含量と溶出量：ICP 発光分析により 11 種類の無機元素の含量を測定した結果、シャクヤクの根にはカルシウムが多く、次いでカリウム、マグネシウム、ナトリウムの順であった。根を煎じた場合の水溶液中にもこれら 4 種類の元素が溶出していたが、特にカリウムが多かった。生薬「赤芍」では他の芍薬に比して 2.1-2.6 倍のカルシウム含量を示した。

2) ダイオウ

1. 栽培—菅平薬草栽培試験地：定植した 16 系統の内、系統 38 が 4 年目までの生存率 87.5%を示し、系統 41、42、43、A1 が 43~57%を示した。高い生存率を示した系統は、*R. palmatum* の RPII 型・Rp5 タイプに属するものが多かったが、同タイプの系統 29 は 30.0%であった。また、系統 38 は RPI 型・Rp4 タイプで、これまで (Ver. 1 の栽培) 生育が難しい系統であった。RPII 型・Rp5 タイプを示す

系統では、根茎が短く、太い根が数本以上付くという共通した特徴が見られた。系統 38 では根茎の発達が良好であった。さらに、系統 29 と系統 38 は根の断面が橙黄色でかつ粘液の分泌が顕著であった。

2. 栽培—薬用植物資源研究センター北海道研究部：定植した 19 系統の内、3 年目 (2013 年 10 月) まで生存した系統は 8 系統であった。その内、4 年生株として収穫できた系統は、5 系統であった (系統 18、29、38、41、45)。生存率は系統 38 が 30.0%、系統 45 が 20.0%、系統 29 が 16.7%であり、1 株当たりの地下部の収量は系統 29 が 340.0~370.7 g、系統 45 が 113.2~290.2 g、系統 38 が 201.0 g であり、これら 3 系統が土壌湿害に適応性があり、収量も高かった。

3. 品質評価：*R. palmatum* の系統 29 の検体 2 の根の成分として新たに 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose、Procyanidin B-2 3-*O*-gallate、Procyanidin B-5 3-*O*-gallate、Resveratrol 4'-*O*- β -D-glucopyranoside、Procyanidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate、Resveratrol 4'-*O*- β -D-(2',6'-*O*-galloyl) glucopyranoside、1-*O*-galloyl-2-*O*-cinnamoyl-glucopyranoside を同定した。

Lindleyin は、2012 年に収穫した (Ver. 1) 栽培 5 年目の 11 系統のうちで、系統 17、18、29、43、45 において比較的高含量であった。これらの系統はすべて RPII 型・Rp5 タイプに属した。2013 年に収穫した (Ver. 2) 栽培 3 年目の系統 29、38 でも高含量であった。HPLC クロマトグラムの比較では、これら 2 系統ともに栽培 5 年目 (Ver. 1) の系統 29 に比べて検出される化合物が少なかった。系統 38 は 29 に類似するが、Sennoside A、1-*O*-galloyl- β -D-glucose、6-*O*-galloyl- β -D-glucose は系統 38 で、Resveratrol 4'-*O*- β -D-(6',7'-*O*-galloyl) glucopyranoside は系統 29 で多そうであった。

4. 網羅的成分分析：80%アセトンエキスを分画分子量がそれぞれ 30 kDa、10 kDa、5 kDa、

2 kDaと異なるフィルターに逐次通過させたところ、タンニン類が濃縮される分画のパターンにサンプル間で差が見られた。これらの分画のLC/MS分析では重合度が最大で6までのプロシアニジン類と考えられる質量数を観測した。

3) エゾウコギ

1. 栽培：屋外馴化させたエゾウコギの植物体88株のうち84株をガラス温室で越冬させ、2014年5月に富山県などの圃場に定植させた。富山市粟巣野及び大長谷で圃場栽培した23株の生長経過はほぼ良好であった。挿し穂による養液栽培では、挿し穂に適した土壌として硬質鹿沼土と日向土の3:1の混合土を選択することができたが、発根率は6%程度であった。

2. 葉の成分：カフェオイルキナ酸類を中心に10種類の化合物を同定できた。またサポニン成分の含有を確認した。

D. 考察

1) シャクヤク

1. 採花方法の検討栽培：平成25年度までに2回（1回/年）の採花を実施し、その翌年である今年度（採花3年目）に茎数を調査したところ、8本温存採花群では採花前の茎数が13.4本で無採花群の85%の茎数が確保された。3回目の採花を実施した株の根の収量を調査した結果、8本温存採花群では、これまでの採花の合計で平均18.1本を切り取ったにも関わらず、無採花群と同等の収量であり、特に外観も問題なく、単位長さ当たりの重量でも同等であった。

採花2年目の10月に収穫した根をサンプルとして主要な8成分を定量したところ、全ての採花群でPaeoniflorin含量が日局の規格（2.0%）を大きく上回った（4.8%~5.9%）。採花により減少する成分はなく、反対に8本温存採花群ではPGG及びPaeonolの上昇傾向が見られた。成分含量が上昇する原因として、採花とともに葉が減少したことで光合成量が減り、デンプンの合成及び根への転流が減

少し、最終的に根の重量の大半を占めるデンプンや糖類が減ることによって、他の成分含量は上昇して見えるものと考えられる。これは、主にデンプン含量の影響を受ける乾燥歩留まりの値とペオニフロリン等の含量が反比例していることから推測される。

2. 加工調製法の検討：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。今年度は昨年度の結果を踏まえ、太さの揃った根を用い、さらに個体数を増やすことにより、個体間の成分含量のばらつきが補正され、加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化が明確に現れるようになった。

根を低温貯蔵し（Paeoniflorin含量の安定化）、湯通し加工を行い（PGG含量等の増加）、周皮を除いて乾燥した場合、乾燥機による30℃での熱風乾燥でも自然乾燥とほぼ同様の成分含量が得られた。ただし、周皮を去ることにより、Albiflorin含量と(+)-Catechin含量が減少していたことから、今後、低温貯蔵し、湯通し加工をした根をそのまま熱風乾燥した場合の成分含量を検討する必要がある。

低温貯蔵も湯通しもしておらず、根の周皮を除いて乾燥した場合、及び周皮をつけたまま熱風乾燥した場合には根の横断面が明らかに変色していた。これらの検体ではPaeoniflorin含量の低下とBenzoic acid含量の増加を示したことから、断面の色は品質を類推するための指標となり得ると考える。新鮮なシャクヤクの根にはポリフェノールオキシダーゼが存在し、根を傷つけることにより酵素が働き、褐変することが知られている。低温貯蔵及び湯通し処理はこの酵素の失活と関連があるものと考えられる。

なお、周皮を去ることによりAlbiflorin

及び(+)-Catechinの含量が減少することについては、イメージングMSの結果、2成分が根の皮層から周皮にかけて分布していたことから裏付けられる。Paeonolも皮層付近に局在していたことから、赤芍系の園芸品種を薬用に供する場合には皮去り加工は行うべきでないと考ええる。今後、赤芍系の園芸品種を材料にして、加工調製法の違いによる成分含量の変化を検討する予定である。

2) ダイオウ

1. 栽培: *matK*遺伝子の塩基配列がRPI型・Rp4タイプを示す*R. palmatum*は、優良系統として報告してきたものである。系統38もこの遺伝子タイプであったが、これまで菅平薬草栽培試験地では生育が難しい系統として認識していた。そこで、系統38を2011年に定植するにあたり、栽培場所として圃場の中でも林(自然園)に面し、西日を遮ることができる場所を選定した。2013年は猛暑で生育率の低下がみられたが、2014年には生存率87.5%を示した。ダイオウの生育には地温の制御が必要であると考えられた。

北海道名寄の薬用植物資源研究センター北海道研究部における栽培では、2013年度8系統が生存したものが、今年度は5月下旬から7月までの干ばつと、8月5日の豪雨により、5系統に減少した。この中で生存率及び地下部の収量を総合的に判断して、系統29と系統38が選択された。これら2系統は北海道北部の気候に適した系統であると判断できた。

2. 品質評価: 昨年度までの栽培5年目のダイオウの成分研究で、日本で栽培可能でかつ品質良好なダイオウの系統として、*R. palmatum*に由来し、RPII型・Rp5タイプに属する系統17、18、29及び43が有望で、そのうち特に系統29が成分的に優れていると結論づけてきた。今回Lindleyinを定量した結果では、系統29の優位性は特に示されなかった。多成分を含んでいるという点では系統29が、Sennoside Aの含量からは系統17が推薦されるであろう。一方、今回新たに、菅平で栽培に成功したRPI型・Rp4タイ

プの系統38の栽培3年目の株の根茎及び根についてHPLC分析し、またLindleyinを定量した。その結果、系統29に匹敵する品質であることがわかった。系統38については、現在Lindleyin以外の17成分を定量中であるが、Sennoside Aの含量は系統29より高い可能性がある。

大黃のタンニン類は分析が難しい。そこで、重合度の高いプロシアニジン類を分析する方法として、遠心式限外ろ過フィルターで分離し、分子量によって粗く分けた上でLC/MS分析する方法を検討した。重合度が最大で6までのプロシアニジン類は分析できたが、この程度の検出重合度では30 kDa、10 kDa分画で検出されるUVクロマトグラムを説明することはできなかった。

3) エゾウコギ

富山市粟巣野及び大長谷の圃場に定植した23株はほぼ順調に生育させることができたが、ユニットハウスで栽培した6株では生育が悪かった。エゾウコギの栽培には太陽光が必要であることが示唆された。また、挿し穂による養液栽培では発根率が6%程度であった。給水・排水の時間帯、白色蛍光灯の照射時間、温度管理など、今後検討することが多い。

エゾウコギの葉にはカフェオイルキナ酸類やフラボノイドの他に、サポニン成分も含まれていた。今後、サポニン成分の同定を行うとともに、これらの成分を含む葉のエキスの生理活性を検討していく予定である。

E. 結論

1) シャクヤク

シャクヤク園芸品種(エジュリスパーバ)の切花収穫時に「1株に8本の茎を残すように採花」する方法で、株分け栽培4年目から3年間採花した結果、3年間の合計で1株から約18本の切花生産が可能であり、かつ採花3年目の生薬の収量にも影響を及ぼさなかった。採花2年目の生薬の収量は減少したものの、ペオニフロリンの含量は日本薬局方の規格(2.0%)を上回る5.4%であり、その他の7

成分の含量にも大きな影響は認められなかった。よって、この採花方法は、園芸と薬用の双方で安定した生産を可能にすることが期待できる。

薬用品種「梵天」の太さの揃った根（直径 1.5～2.0 cm）を用いて、貯蔵法、加工法及び乾燥法の異なる計 15 通りの加工調製法を検討した。その結果、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、乾燥機（30℃）で乾燥する方法が最もよい成分含量を示した。低温貯蔵により、Paeoniflorin 含量が安定し、結果として高含量に繋がった。湯通し加工により、PGG、Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が顕著に増加した。一方、皮去り加工により Albiflorin 及び (+)-Catechin の含量の減少が見られた。このことは、イメージング質量分析による 2 成分の局在部位からも裏付けられた。イメージング質量分析では、PGG の脱プロトン体 (m/z 939) でイメージングすることにより、PGG が皮層より木部に多いことが新たに示された。また、シャクヤクの根にはカルシウムが多く含まれているが、煎じ液にした場合はカリウムが多く溶出していることが明らかになった。

2) ダイオウ

2011 年から 4 年間の圃場栽培において、長野県菅平薬草栽培試験地では 16 系統中特に *R. palmatum* の RPI 型・Rp4 タイプである系統 38 が高い生存率を示した。また、根茎の発達及び断面の色や粘液の存在からも品質が高いことがうかがわれた。RPII 型・Rp5 タイプの系統 29 は太い根が数本付くという特徴があり、これが系統 38 に準じた。北海道名寄の栽培研究においては 19 系統中 5 系統のみが生存したが、上記 2 系統は生存率及び地下部の収量の点で北海道北部の気候に最も適した栽培系統であった。

2008 年から栽培した 5 年目の地下部を用いた成分研究で、品質良好な系統として RPII 型・Rp5 タイプの系統 17、18、29 及び 43 を見出ししてきたが、Lindleyin の含量からもこれらが優良であることを明らかにした。さ

らに、2011 年から栽培した 3 年目の系統 29 でもほぼ同様の成分組成であることが推測された。さらに、RPI 型・Rp4 タイプの系統 38 は成分的に系統 29 に匹敵することが明らかになった。

ダイオウのタンニン類を遠心式限外ろ過フィルターで順次分離したところ、濃縮される分画のパターンに遺伝子型の異なるサンプル間で差が見られた。これらの分画の LC-MS 分析では重合度が最大で 6 までのプロシアニジン類が観測可能であった。

3) エゾウコギ

屋外馴化させたエゾウコギの植物体 88 株のうち 84 株をガラス温室で越冬させ、5 月に富山県などの圃場に定植させた。富山市粟巣野及び大長谷で圃場栽培した 23 株の生長経過はほぼ良好であった。また、挿し穂による養液栽培を試みたところ、硬質鹿沼土と日向土の 3:1 の混合土が栽培に適していたが、発根率は 6% 程度であった。葉の成分研究では、カフェオイルキナ酸類を中心に 10 種類の化合物を同定できた。またサポニン成分の含有を確認した。

以上、平成 26 年度の目標をほぼ達成できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhu, S., Yu, X. L., Wu, Y. Q., Shiraishi, F., Kawahara, N., Komatsu, K.: Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from *Paeonia lactiflora*, J. Nat. Med., 69(1), 35-45 (2015).

2. 学会発表

- 1) 葛躍偉、村上守一、田村隆幸、川本元裕、磯田進、朱姝、吉松嘉代、小松かつ子: Chemical constituents analysis of the leaf of *Eleutherococcus senticosus* cultivated in different environment. 第 31 回和漢医薬学会学術大会 (2014, 8.31、千葉).

- 2) Zhu, S., Shirakawa, A., Shi, Y. H., Yu, X. L., Tamura, T., Yoshimatsu, K., Komatsu, K.: Comparing the contents of main components in the roots of Bonten, a medicinal cultivar of *Paeonia lactiflora* after different post-harvest processing. The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (2014, 9.13, Fukuoka, Japan).
- 3) Zhu, S., Yu, X. L., Komatsu, K.: Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from *Paeonia lactiflora*. The 28th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 8th International Conference on Biodiversity (ISCNP28 & ICOB8) (2014, 10.19-24, Shanghai, China)
- 4) 越村佳奈、平修、朱姝、植松宏平、片野肇、小松かつ子: 生薬原料(大黄)の2次代

- 謝物のイメージング質量分析による局在解析. 第14回日本食品工学年次大会(2014, 8.8-9、つくば).
- 5) Ge, Y. W., Kazuma, K., Zhu, S., Yoshimatsu, K., Komatsu, K.: Comprehensive Analysis of Sequencing Proanthocyanidin Oligomers in Rhubarb by HPLC-ESI-MSⁿ. The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (2014, 9.13, Fukuoka, Japan).
- 6) 数馬恒平、葛躍偉、紺野勝弘、小松かつ子: LC-MSによる大黄の縮合タンニン類の分析. 日本薬学会第135回年会 (2015, 3.27、神戸)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

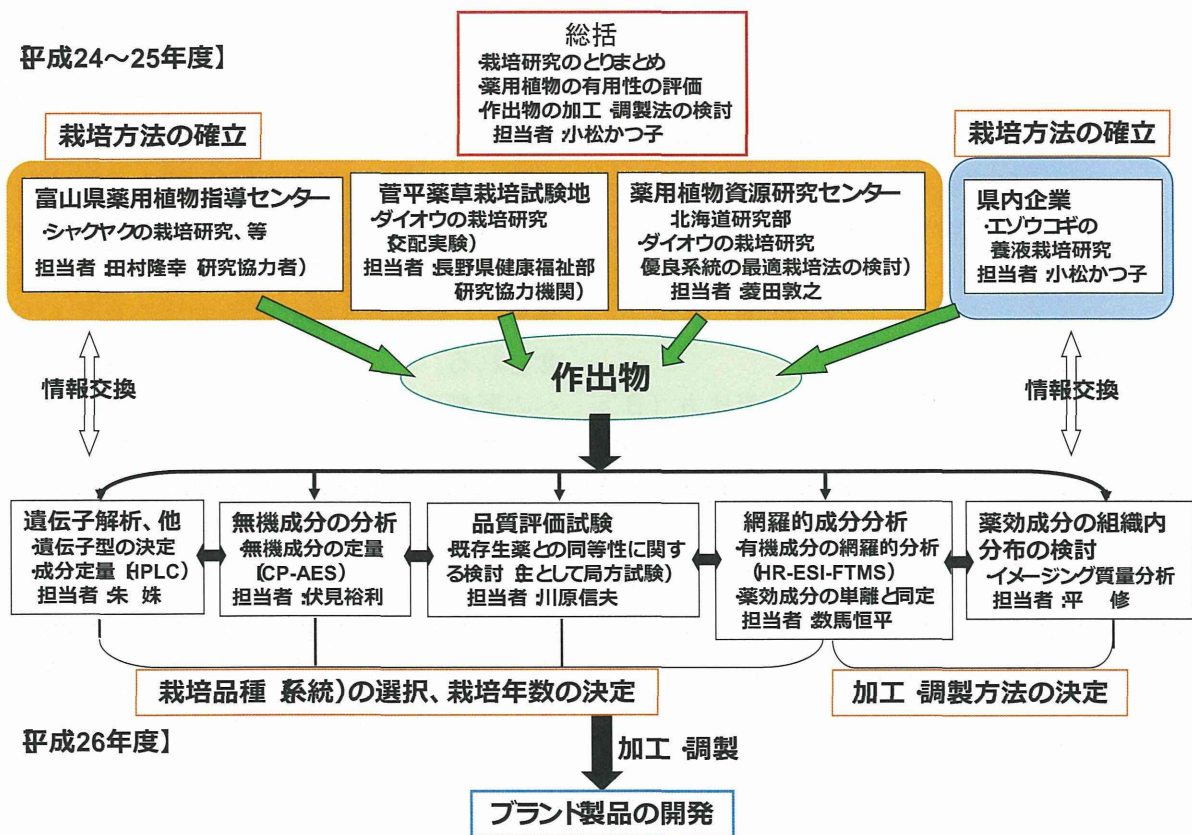


図1 「地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究」の研究計画

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：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

一切花及び生薬の安定生産を目指したシャクヤク園芸品種の採花方法の検討

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 薬用利用可能な園芸品種（品種名：エジュリスパーバ）を用い、株分け栽培4年目から6年目まで切花生産のための採花（着蕾茎の採取）を3年間実施し、植物体へ及ぼす影響について調査した。採花方法を「1株に8本の茎を残すよう採花」とした場合、3年間の合計で1株から約18本の切花生産が可能で、かつ採花3年目の生薬の収量にも影響を及ぼさなかった。また、採花2年目の10月に掘り上げて乾燥調製した生薬中のペオニフロリンの含量は日本薬局方の規格（2.0%）を上回る5.4%であり、その他の7成分の含量にも大きな影響は認められなかった。よって、この採花方法は、園芸と薬用の双方で安定した生産を実現するための方法として期待できる。

研究協力者

田村隆幸 富山県薬用植物指導センター
主任研究員

朱 姝 富山大学和漢医薬学総合研究所
助教

A. 研究目的

生薬「芍薬」は、第16改正日本薬局方（日局）において、「シャクヤク *Paonia lactiflora* Pallas の根である」と規定され、鎮痛、鎮痙、活血等の作用を期待して漢方処方に配合されるほか、婦人薬や胃腸鎮痛痙薬等の製剤にも配合される。これまでの国内生産では奈良県を中心に薬用品種が栽培されてきたが、近年では薬用品種に加えて、園芸品種（*P. lactiflora*）の根も日局の規格に適合したものが薬用に出荷されている。園芸品種については、園芸（切花）と薬用の双方の生産ができることから、高い収益性が期待でき、国内栽培の拡大に貢献し得る。そのた

めには薬用として成分的に有用な品種の選定とともに、切花生産時の採花方法が重要となる。つまり、1株から出た数十本の花茎を切り取り過ぎると、残された茎（葉）が少なくなり、その後の根の収量及び翌年の茎数が減少し、生薬の品質も不安定になることが懸念される。しかしながら、生薬の品質や収量への影響を考慮した採花方法（採花後に残すべき茎数）については、情報が不足している。

これまで富山県薬用植物指導センターにおいて、採花方法を「着蕾茎数の半数を採花」として無採花区と比較した調査の結果、採花により残りの茎数が5本以下となった株において、その年以降の根の収量の減少が特に大きく、翌年の着蕾茎数も減少する傾向が見られた。

この結果を踏まえて、園芸と薬用の双方で安定した生産を実現するためには、「1株に8本の茎を残すように採花」する方法が有効であると考え、これを検証することを目的とし