

なった。この結果から、市場流通品と水耕栽培品の両者間におけるベルベリン含有割合に有意な差は認められなかった。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。

4-2. オウレン市場流通品・水耕栽培品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て行った今回の試験の結果、ポジティブコントロール群に対し、水耕栽培品・市場流通品オウレンエキス投与群の方で有意に腫脹の抑制が観察された。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。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 $37.7 \pm 6.2 \mu\text{m}$ となり、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 $35.7 \pm 10.0 \mu\text{m}$ であった。以上の結果から、ベルベリン塩化物投与群と同様に、オウレン水耕栽培品・市場流通品オウレンエキス投与群ともに、耳介腫脹を抑制することが示された。また、今回用いたオウレン水耕栽培品と市場流通品間の腫脹抑制効果に有意な差は認められなかった。

4-3. オウレン市場流通品・水耕栽培品の変異原性試験 (Ames 試験)

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 revertants/mg、水耕栽培品で 1017.5 revertants/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

revertants/mg、水耕栽培品で 181.5 revertants/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。

D. 考察

1. カンゾウ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、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。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。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考えられる。

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、 $156 \mu\text{g}/\text{plate}$ 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、その一方で油溶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。熱水抽出エキスを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。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 以下)とヒ素(5 µg/g 以下)の基準値が定められている。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値以下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性があ

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、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、カンゾウがあげられている。我々の分析結果でも、市場流通品のカンゾウからは、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、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、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. カンゾウ水溶性抽出分画の抗アレルギー活性評価系の構築

今回、ウラル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アレルギーモデルを構築し評価した。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。

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、水耕栽培品ともに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く、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、市場流通品カンゾウ、水耕栽培品カンゾウ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。

4. オウレン水耕栽培品・市場流通品の有効性及び安全性評価

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予想された。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と予想された。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する予定である。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。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

1. カンゾウ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

本研究で使用したカンゾウ、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、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)。いずれのカンゾウも、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。水銀についても定量下限以下で、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. カンゾウ熱水抽出エキスの抗アレルギー活性評価系の構築

我々は、水耕栽培品及びハイブリッド栽培品ウラルカンゾウ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エキスと同等の抗アレルギー活性を示した。接触性皮膚炎におけるカンゾウエキスの効果についての初めての報告である。

4. オウレンサンプルにおける有効性・安全性評価

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かった。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) 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)Akiyama, H., Ohtsuki, N. : 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).

8)Sugimoto, N., Akiyama, H. : コチニール色素とアレルギー, *公衆衛生* 77, 833-837 (2013)

9)Minegishi, Y., Mano, J., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R. : Development and evaluation of a novel DNA extraction

method suitable for processed foods, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 20, 114-118 (2013).

10)Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Teshima, R., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K. : Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya, *J. AOAC Int.*, 96, 1054-1058 (2013)

11)Ohmori, K., Nakamura, K, Akiyama, H., Hamaoka, S., Makiyama, H., Sakata, K., Kasahara, M., Kitta, K., Fujimaki, T., Teshima, R. : A DNA Extraction and Purification Method using an Ion-exchange Resin -type Kit for the Detection of Genetically Modified Papaya from Processed foods, *Food Control*, 32, 728-735 (2013).

12)Takabatake, R., Takashima, K., Kurashima, T., Mano, J., Furui, S., Kitta, K., Koiwa, T., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Minegishi, Y. : Interlaboratory Study of Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Maize Events MON810, Bt11 and GA21, and CaMV P35S, *J. AOAC Int.*, 96, 1-7 (2013)

13)Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Satoshi, F., Yasutaka, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurashima, Takeyo, . Mano, J., Furui, S., and Kitta, K. : aDevelopment and Interlaboratory Validation of Quantitative PCR Method for Screening Analysis of Genetically Modified Soybeans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36, 131-134 (2013)

14)Koizumi, D., Shiota, 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).

15) 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).

16) 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, 21, 155-162 (2014)

17) 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)

2. 学会発表

1) 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, 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、穠山浩, 第104回日本食品衛生学会学術講演会 (2012.10)

2) 人工水耕栽培により生産した甘草の安全性評価に関する研究, 大月典子、穠山浩、工藤善、杉山圭一、阿部裕、六鹿元雄、伊藤

裕才、多田敦子、杉本直樹、瀧野裕之、川原信夫、吉松嘉代, 第6回甘草に関するシンポジウム (2013.8)

3) THP-1由来樹状細胞のハプテン抗原を標的としたアレルギー性評価法の確立, 小俣洋奈、久木田卓弥、片山茂、大月典子、穠山浩、中村宗一郎, 第26回日本動物細胞工学会(2013.10)

4) 甘草油性抽出物の成分組成に基づく解析, 多田敦子、石附京子、末松孝子、有福和紀、伊藤裕才、大槻 崇、大月典子、吉松嘉代、川原信夫、山崎 壮、杉本直樹、穠山 浩, 日本食品化学学会第19回 総会・学術大会 (2013.8)

5) THP-1由来樹状細胞の抗原提示能を指標としたコチニール色素のアレルギー性評価, 片山 茂、小俣洋奈、大月典子、穠山浩、中村宗一郎, 日本食品化学学会第19回 総会・学術大会 (2013.8)

6) カルミン酸とタンパクの反応性に関する検討, 大月 典子、杉本 直樹、伊藤 裕才、建部 千絵、佐藤 恭子、梅本 尚之、深溝 慶、穠山 浩, 第106回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)

7) 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、穠山 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

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成24年度～26年度総合研究報告書

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：日本で生薬「芍薬」として使用でき、かつ赤芍の特徴を有した園芸品種を、成分組成の観点から選択した。当該品種が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して、「1株に8本の茎を残すように採花」する方法が適することを、切り花数、根の収量及び Paeoniflorin 含量等から示唆した。新鮮な根の低温貯蔵により Paeoniflorin 含量が安定して高値を示し、湯通し加工により Pentagalloylglucose が増加すること、さらに両処理を行った根では乾燥機で乾燥しても成分変化を示さないことを明らかにした。一方、皮去り加工により Albiflorin と Catechin の含量が減少し、このことをイメージング MS による 2 成分の局在部位の検出から裏付けた。

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で栽培可能であり、良質であることを示した。この 2 系統と系統 17 が成分的にも優れていることを、栽培 5 年目及び栽培 3 年目の株の根茎及び根における定量結果またはクロマトパターンから明らかにした。重合度 6 までの Procyanidin 類の分析法として、遠心式限外ろ過フィルターで分離し、分子量によって分けた上で HILIC カラムを用いて LC-MS 分析を行う方法を開発し、本法が品質評価に応用できる可能性を示唆した。Sennosides は、根茎では髄の異常維管束に局在し、根では皮層や師部に存在することをイメージング MS により明らかし、ダイオウの加工法に示唆を与えた。

エゾウコギ：種子の未熟胚を後熟させ、発芽に至るまでの期間を 1/3 に短縮させる方法を確立した。これらの種子 611 粒を養液栽培し、発根・発芽から育苗、屋内及び屋外馴化までを行い、88 株を植物体まで生育させ、圃場に定植することができた。「刺五加」の生産の目処が立った。養液栽培で育てた植物の葉の主要成分は 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 及び malonyl-3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid であり、養液栽培後屋外馴化を行った葉では hyperoside 及び 5-caffeoylquinic acid が増加した。これら以外に、オリゴ糖やサポニン成分も含有しており、葉を用いて健康食品を開発することは十分可能であると思われる。

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

足立理絵子 (株)ウチダ和漢薬製造部
品質管理課

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、漢方方剤の需要が伸びている。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。漢方医学の永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、作出物の品質保証を行い一定量の作出物を安定供給することができない限り、生薬関連企業は国産品を購入せず、栽培は広がらない。これを解決するためには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最良の方法であると考えた。

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 Senoside A の含量のみならず、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。

B. 研究方法

1. 実験材料

1) シャクヤク

1. 採花方法の検討: 2008年10月に植付けたシャクヤク(園芸品種エジュリスパーバ)36株。栽培4年目、5年目及び6年目(採花1年目、2年目及び3年目)の根

2. 栽培品種の品質評価: 園芸品種97品種及び薬用品種2品種の3年生~9年生の根、長野県菅平薬草栽培試験地へ移植した3品種の4年生の根

3. 加工調製法の検討：栽培4年目の薬用品種「梵天」の根

4. 化合物の組織内分布：栽培6年目の「エジュリスパーバ」及び栽培4年目の「梵天」の新鮮な根

5. 無機元素の含量と溶出量、組織内分布：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「梵天」の根、栽培8年目の「春の粧」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、断りのない限り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：
Ver. 1：富山大学で保有しているダイオウ18系統（*matK*遺伝子の塩基配列において5遺伝子型7タイプ）の種子を富山県薬用植物指導センターで育苗したもの。

Ver. 2：ダイオウ16系統（5遺伝子型6タイプ）の種子を薬用植物指導センターで育苗したもの。

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。北海道研究部で育苗するか若しくは富山県薬用植物指導センターで育苗した。

3. 品質評価：菅平薬草栽培試験地で2008年～2012年（Ver. 1）に栽培され、2～4年目に一部の株を、5年目にほぼすべての株（11系統）を採取して、根茎と根に分けて乾燥した。栽培2年目11系統、3年目14系統、5年目11系統の根茎及び根を用いた。さらに、2011年～2014年（Ver. 2）に栽培され、2013年に収穫された栽培3年目の2系統（29、38）の根茎及び根も実験に供した。その他、化合物の単離のために青海省産大黄（TMPW No. 27830）を用いた。

4. 網羅的成分分析：

網羅的成分分析に適する方法の検討：菅平で栽培された（Ver. 1）栽培5年目の11系統。

HILICカラムを用いた分析：菅平栽培 Ver. 1の系統29と42の栽培5年目の株、栽培 Ver. 2の系統D4の栽培3年目の株、中国採集品 GS158（D1-3、D1-4）、参照としてオオミサンザシの生果実（中国山東省産）。

遠心式限外ろ過を用いた分析：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）。

5. 化合物の組織内分布：昭和大学薬用植物園から入手した新鮮なダイオウ（*R. palmatum*）の根茎と根。

6. 無機元素の含量と組織内分布：
ICP発光分光分析：菅平で栽培された（Ver. 1）栽培5年目の11系統。

蛍光X線分析：栽培5年目の系統15と中国産大黄（TMPW No. 20244）

3) エゾウコギ

1. 種子の発芽処理—養液栽培—圃場栽培：2012年10月15日に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より供与された9系統の種子を発芽処理の研究に用いた。その内の5系統を播種し、養液栽培以降の研究に供した。

2. 挿し穂による栽培：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で栽培されているエゾウコギの当年枝を1株あたり5～7本採取した（2013年11月中旬）。この挿し穂85本を新聞紙に包んだまま冷蔵庫（5℃）で約3ヶ月間保管した。

3. 葉の成分探索：養液栽培で得られた葉、養液栽培後、屋外馴化を約2ヶ月行って得ら

れた葉、中国の野生のエゾウコギの葉、北海道の栽培エゾウコギの葉(挿し穂に付いていた葉)。

2. 研究方法

本研究では、学(富山大学和漢医薬学総合研究所、福井県立大学)と官(基盤研究所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及び品質評価法の確立を行う。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。

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。2013年10月29日及び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、2013年10月29日に採取した根(採花2年目、栽培5年目; 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. 栽培品種の品質評価: HPLC法で主要8成分を定量した。

3. 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。

4. 化合物の組織内分布: シャクヤクの根を凍結し、クライオミクロトームで試料切片

(厚さ50~90mm)を作製した。切片を導電性透明電極である酸化インジウム・スズ(ITO)スライドガラス上に載せ、表面にイオン化支援剤(DHB)をスプレーし、MALDI-TOF MSを用いて、Albiflorin、Paeoniflorin、Paeonol及びCatechinはポジティブモードで、Pentagalloylglucose (PGG)はネガティブモードで、イメージング質量分析を行った。

5. 無機元素の含量と溶出量、組織内分布: 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。また、12元素の根の横断面における組織内分布を、エネルギー分散型蛍光X線分析装置を用いてマッピングした。

2) ダイオウ

1. 栽培—菅平薬草栽培試験地:

Ver. 1: 2008年6月19日に18系統の苗を定植後、無肥料で栽培し、2009年11月6日、2010年11月13日、2011年11月3日、2012年10月22日に地下部を収穫した。2009年、2010年及び2011年は栽培中の一部の株のみ、2012年はほぼ全株を収穫した。

Ver. 2: 2011年6月12日に16系統の苗を定植後、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。

地下部の形態を観察した後、根茎と根に分け、約1ヶ月の自然乾燥後、乾燥機(30~35℃)で通風乾燥した。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4月19日にセルトレイに播種して温室内で育苗した。その後、富山県薬用植物指導センターで育苗したものと共に、6月28日に定植、施肥をして栽培した。毎年10月に各系統の一部を収穫し、4年生株は2014年10月8日に収穫した。収穫した地下部を水

洗して根茎と根に切り分け、自然乾燥し、通風乾燥機（35℃）で7日間仕上げ乾燥した。異物を除去して評価用サンプルとした。

3. 品質評価：長野県菅平で栽培されたダイオウの根茎及び根について、栽培5年目の株では18成分を、2～4年の株では11成分をHPLC分析により定量した（Ver. 1）。主として系統29に含有される化合物の同定を目的として、青海省産大黃の80%アセトン抽出エキスについて分画操作を行い、化合物を単離し、¹H-NMR及び¹³C-NMR、UVによる解析やLC/MS分析により同定した。Ver. 2の栽培で採取された2系統（29、38）については、HPLCクロマトグラムの比較とLindleyinの定量を行った。Ver. 1の栽培5年目の6系統について局方試験を行った。

4. 網羅的成分分析：網羅的成分分析に適した方法を探すため、複数のクロマトグラフシステムと種々の溶媒系、イオン化法を検討した。次に、Procyanidin類に特化した分析法を開発するため、分子ふるいクロマトグラフィー（size exclusion chromatography, SEC）及び親水性相互作用クロマトグラフィー（HILICカラム：Tosoh Amide-80）、シリカゲルクロマトグラフィーを行い、ESI-MSで分析した。さらに、高分子分画の解析を目的として、遠心式限外ろ過フィルターで順次分離した後、濃縮された分画をLC/MSやMALDI-TOF MSを用いて分析し、Procyanidin類の組成を調べた。

5. 化合物の組織内分布：シャクヤクと同様にダイオウの根茎及び根の切片を作製し、これをITOスライドガラス上に載せ、表面にイオン化支援剤〔 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（CHCA）または酸化鉄ナノ微粒子〕をスプレーし、MALDI-TOF MSを用いて、Sennosidesの局在をネガティブモード（CHCA使用）で、その他の低分子化合物はポジティブモード（酸化鉄ナノ微粒子）で測定した。Sennosidesの部位による存在比の算出では、イメージングMSデータを画像解析ソフトで

2値化した後、単位面積当たりの強度の比として算出し、HPLC法による定量値から算出した値と比較した。

6. 無機元素の含量と組織内分布：栽培5年目の11系統のダイオウの根茎と根について、ICP発光分光分析により定量を行った。また、新鮮なダイオウ及び生薬「大黃」の横断面について、エネルギー分散型蛍光X線分析装置により12元素をマッピングした。

3) エゾウコギ

1. 種子の発芽処理－養液栽培－圃場栽培：
発芽処理：種子をジベレリン水溶液（100 ppm）で処理し、16℃で約4ヶ月間保存した（後熟促進処理）。その後、カイネチン水溶液（200 ppm）で処理し、5℃で約1ヶ月間保存した（休眠打破処理）。

養液栽培－圃場栽培：養液栽培のための装置をユニットハウス内に組み、播種（2013年4月26日）、低温恒温器での発芽・発根、養液中での緑化、養液循環式育苗棚での育苗までの工程を行い、植物体を育てた。その後、赤玉土の入ったポットに植えて、馴化棚に備え、養液を循環させた。約1ヶ月の屋内馴化を終えた植物体を富山県薬用植物指導センターに移動し（10月中旬～11月初旬）、屋外馴化を行った。ガラス温室内で越冬させ、再び屋外馴化させた植物体を、2014年5月下旬～6月中旬に圃場へ定植した。富山県では23株を圃場に、6株をユニットハウス内のプランタに定植した。

2. 挿し穂による栽培：調製した225本の挿し穂を3種類の土（硬質鹿沼土3：日向土1、硬質鹿沼土3：富士砂1、ハイドロボール）が入ったプラグに植えた（2014年2月26日）。それを養液栽培棚に移動し、給水時間、白色蛍光灯の照射時間、空調温度を調整しながら、ユニットハウス内で栽培した。挿し穂に発根が確認できた株を土から出して水耕の育苗棚に移動した。その後、再度、赤玉土に挿し穂を植え替え、養液栽培棚で育てた。

3. 葉の成分探索：葉の 50%メタノールエキスについて、0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液の系によるグラジェント溶出で LC/MS 分析を行った。含有化合物の同定は、HPLC における保持時間、UV スペクトル及び MS² または MS³ データを解析して行った。

C. 研究結果

1) シャクヤク

1. 採花方法の検討：採花 2 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 17.8 本、16.0 本及び 10.3 本となり、過剰採花群が有意に少なかった。採花 3 年目の採花前の茎数はそれぞれ 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 2 年目の乾燥根重について 2 群（径で分類）を合計すると、無採花群の 647.0 g に対して 8 本温存採花群では 362.2 g、過剰採花群では 317.3 g であり、いずれも有意に少なかった。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 635.1 g、665.0 g であった。一方、過剰採花群では合計値が 365.0 g で、有意に減少した。乾燥歩留まりは、採花 2 年目の過剰採花群で 48.8% と無採花群の 53.6% に対して有意に低かったが、採花 3 年目ではどの採花群でも 49~51% で同等であった。

採花 2 年目の根の成分含量については、Paeoniflorin 含量が 47.7~58.5 mg/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. 栽培品種の品質評価：99 品種のうち 83 品種が日本薬局方で規定される Paeoniflorin 含量 2.0% 以上を満足し、21~46 mg/g を示した。ITS 配列によりサブグループ I（白芍系）とサブグループ II（赤芍

系）に帰属させて成分含量を比較したが、中国産赤芍と中国産白芍に見られたような差異はなかった。赤芍系の 2 品種が Paeonol を他種より多く含んでいた。生育環境の違いによる成分含量の変化を 3 品種で調べた結果、長野県菅平で栽培したもので、Paeoniflorin、Albiflorin 及び Catechin の含量が高く、反対に PGG と Gallic acid の含量が低かった。

3. 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。

4. 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。

5. 無機元素の含量と溶出量、組織内分布：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

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。カルシウムは形成層のすぐ内側の木部に多く、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た。生薬「芍薬」では明らかに硫黄が検出される検体があり、漂白の目的で行われる硫黄薫製が判断できた。

2) ダイオウ

1. 栽培—菅平薬草栽培試験地：

Ver. 1: 18系統の内、*R. palmatum*のRPII型・Rp5タイプ (*matK*遺伝子の塩基配列による)の系統17、18、41、43は5年目までの生存率が45~63%を示した。RPI型・Rp4タイプの系統37は5年目の収穫時に地下部がほとんどなかった。歩留まりはRPII型・Rp5タイプの系統29が40.2%で最も高かった。同じ遺伝子タイプの系統では地下部の形態が類似し、RPII型・Rp5タイプの系統では根茎が短く、太い根が数本以上認められた。その内、系統29、43、45では根の断面が橙黄色を呈した。

Ver. 2: 16系統の内、RPI型・Rp4タイプの系統38が4年目までの生存率87.5%を示し、同タイプの系統42、RPII型・Rp5タイプの系統41、43及びRPIV型・Rp21タイプのA1が43~57%を示した。系統29は30.0%であった。RPII型・Rp5タイプの系統に共通する形態的特徴は今回も観察された。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：19系統の内5系統が4年目まで生存し、生存率は系統38が30.0%、系統45が20.0%、系統29が16.7%であった。1株当たりの地下部の収量は系統29が340.0~370.7g、系統45が113.2~290.2g、系統38が201.0gであり、歩留まりは系統45

が26.1~37.3%、系統29が19.6~29.6%、系統38が25.4%であった。

3. 品質評価：青海省産大黃から Procyanidin 類を始めとする 30 化合物を単離、同定し、系統29の根の80%アセトンエキスのHPLCクロマトグラムに表れる主要なピークの成分を明らかにすることができた。栽培5年目(Ver.1)の11系統の根茎及び根について18成分を定量した結果、同じ遺伝子タイプの系統では、類似したHPLCクロマトグラムと成分組成を示した。また、根茎と根のクロマトグラムはほぼ同様であった。定量結果を比較すると、RPII型・Rp5タイプの系統17、29、43、45のいずれも根において Sennoside A (9)の含量が0.25%以上を示した。これらに同じ遺伝子タイプをもつ系統18を加えた5系統では、Anthraquinone 配糖体の中で Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside の占める割合が他の系統より高いという特徴が見られた。(-)-Epicatechin gallate (3)の含量は系統17、29、18、43、45の順に低くなり、Resveratrol-4'-*O*-(6', 3'-*O*-galloyl)-glucopyranoside (8)の含量は系統29と42、Isolindleyin (5)の含量は系統29で高かった。Lindleyin (28)の含量は系統17、18、29、43、45の順に低くなった。以上から、薬効成分の含量が高い、品質良好な系統として、系統17、18及び29が見出された。3系統の内、系統29は化合物8、5、4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone 4'-*O*- β -D-2', 6'-*O*-galloyl-6'-*O*-cinnamoyl)-glucopyranoside (27)を、系統17は化合物9、3、28を他の系統より多く含んでいた。28は2回目の栽培実験(Ver.2)で収穫した栽培3年目の系統29、38でも高含量であった。系統38のクロマトグラムは系統29に類似し、さらに9の含量が高いことが推測された。

次に栽培5年目の6系統(15、17、18、29、43、45)について日局試験を行った結果、9の含量に関して、系統17は5検体中4検体で規定の0.25%以上を満足したが、系

統 29 では 3 検体中 1 検体のみが満足したのみであった。

成分含量の経年変化を調べた結果から、ダイオウの地下部の収穫は、栽培 3 年目から可能であると考えられたが、Ver. 2 の栽培 3 年目の系統 29、38 の HPLC クロマトグラムでは、Ver. 1 の栽培 5 年目の系統 29 に比べて検出される成分のピークが少なかった。5 年目までの栽培の必要性が示唆された。

4. 網羅的成分分析：LC-MS による網羅的成分分析として、0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液の系によるグラジェント溶出で、PDA と Orbitrap-MS 同時検出による条件で分析することにより、比較的良好なクロマトグラムが得られた。MS 検出では分子量特異的に解析できるため、重合度の異なる Procyanidin 類が比較的容易に検出できることが明らかとなった。次に、Procyanidin 類に特化した分析法を開発する目的で、SEC カラムや親水性ゲルカラムを検討したが結果はよくなく、最終的に、HILIC カラム (Tosoh Amide-80) が分離パターン、使用溶媒とイオン化法との適切な組み合わせ等を鑑みたとき、最も優れた方法であり、重合度が 4 までの Procyanidin 類の検出は比較的容易であった。さらに、高分子分画の解析を目的として、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 と異なる遠心式限外ろ過フィルターに逐次通過させたところ、縮合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。得られた分画の PDA 検出逆層 HPLC 分析では、縮合タンニン類の濃縮の様子と濃縮された縮合タンニン類の性質の違いが明確になった。また、HILIC カラムを用いた LC-MS 分析法で抽出液を含むすべての分画を分析したところ、重合度が最大で 6 まで抽出マスクロマトグラム (EIC) のピークとして検出することができた。

5. 化合物の組織内分布：根茎の切片表面から Sennosides (A, B) に対応する質量 m/z 861 ($[M-H]^-$) と m/z 430.5 ($[M-2H]^{2-}$) の 2 つの

シグナルが検出された。Sennosides は髄の異常維管束周辺に特異的に局在していることがわかった。異常維管束周辺を高解像度 (25 mm) でイメージングしたところ、Sennosides は異常維管束の師管またはその周辺に存在していると考えられた。維管束部位と髄 (異常維管束部位) での存在比はほぼ 1:2 であり、HPLC の定量結果とも一致した。根では、周皮や皮層から師部付近に Sennosides が局在していた。

6. 無機元素の含量と組織内分布：ナトリウムは 45~349 ppm (平均 191 ppm)、鉄は 42~103 ppm (平均 77 ppm) であった。これまで生薬「大黄」には、ナトリウムが 175 ppm、鉄が 180 ppm 含有される報告があるが、今回栽培したダイオウではやや鉄の含量が少ない傾向にあった。組織内分布の検討では、カリウムは、根茎では周皮、皮層の最外部及び髄に多く存在し、根では木部の中央部に多く存在した。カルシウムは、根茎では周皮、皮層の最外部、維管束に多く存在した。

3) エゾウコギ

1. 種子の発芽処理—養液栽培—圃場栽培：本研究で行った後熟促進処理と休眠打破処理により、約 3800 粒の種子の内約 13%の種子が成熟し播種可能になった。播種した種子は、発根・発芽—緑化—本葉形成—育苗までの工程を経て、茎の高さ 30 cm に達するまでの植物体になった。播種した 611 粒の内、育苗まで至ったものは 100 個体であり、その割合は 16.4%であった。屋内馴化の期間でさらに茎が伸長した。88 個体が屋外馴化まで至り、ガラス温室で越冬後、84 個体を定植まで繋げることができた。富山県では 2014 年 5 月に富山市粟巣野及び大長谷の圃場に 23 株を定植させたが、ほぼ良好に生育した。一方、ユニットハウス内のプランタに定植した 6 個体は生育不良で、1 株は葉が枯れた。

2. 挿し穂による栽培：挿し穂による養液栽培において、発根率は 6%程度であった。挿し穂には硬質鹿沼土と日向土の 3:1 の混合

土が適していた。

3. 葉の成分探索：カフェオイルキナ酸類 8 化合物、フラボノイド 2 化合物を同定した。養液栽培で育苗した植物体の葉の主要成分は、3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 及び malonyl-3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid であった。また、養液栽培後、屋外で馴化のための栽培を行った場合、hyperoside 及び 5-caffeoylquinic acid が増加した。さらに、オリゴ糖やサポニン成分の含有が確認できた。

D. 考察

1) シャクヤク

1. 採花方法の検討：採花した翌年の茎数を確保することは、切花生産による収入を得る意味でも、根の収量を増加させる意味でも重要である。そこで、採花2年目における茎数及び根の収量を調査したところ、過剰採花群では翌年の茎数が激減し、根の収量も49%になったのに対し、8本温存採花群では根の収量減少（無採花群の56%）は避けられないものの、翌年の茎数が無採花群の90%も得られたことから、有効な採花方法となることが期待された。切花生産は一般に、株分け4年目頃から毎年、5から7年間程度実施されるため、継続して採花し、その生育への影響を調査する必要がある。そのため、採花を2回実施した翌年の茎数を調査したところ、8本温存採花群では無採花群の85%の茎数が確保された。前年に1株あたり8本の茎（全茎数の半分の茎数）を採花したことを考えると、この85%は高い数値であると判断できる。

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。

2. 栽培品種の品質評価：園芸品種の多くが日局に規定される Paeoniflorin 含量を満足した。ITS 配列では赤芍系に属する品種が多かったが、中国産赤芍に見られる特徴（Paeoniflorin 含量が高く、Paeonol 含量も白芍より高い傾向にある）を持つ品種は少なかった。一方、生育環境の違いによる成分含量の変化を調べた結果、赤芍系及び白芍系の品種ともに同じ傾向を示し、長野県菅平で栽培したものが Paeoniflorin、Albiflorin 及び Catechin の含量が高く、一方富山県上市で栽培したものは PGG の含量が高かった。両地域では平均気温に 10℃以上の差があり、また湿度もかなり異なることから、シャクヤクの生育環境が成分に及ぼす影響は大きいものと考えられる。

3. 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。そこで、太さの揃った「梵天」の根を120本用いて15通りの加工・乾燥法を行い、成分含量の変化を調べた。

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、良好であった。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含量が低下し、反対にBenzoic acid含量が増加していたことから、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、周皮を除くことにより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た。Paeonolも皮層付近に局在していたことから、この成分に特徴がある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。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型を示す*R. palmatum*は、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。しかし、Ver. 1の栽培では、RPI型・Rp4タイプの系統37の栽培に失敗した。そこで、Ver. 2の栽培では、同タイプの系統38を、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に定植した。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。この系統の株では根茎が発達し、断面は橙黄色で粘液があり、品質が良さそうであった。以上から、ダイオウの生育には地温の制御が重要であると考えられた。一方、RPII型・Rp5タイプの系統は菅平の気候によく順応しており、特

に系統29では太い根の断面が橙黄色で粘液も認められた。系統38や29は花茎をほとんど上げないことから、これも品質に寄与しているものと考えられた。

北海道名寄（薬用植物資源研究センター北海道研究部）において、2013年は夏期に長期間の降雨が続き、2014年は5月下旬から7月まで干ばつ、さらに8月5日に豪雨等の気象災害が発生した。これにより、定植時には19系統312株あったものが、4年目には5系統17株に減少した。ダイオウは土壤の湿害に弱いのが、生存率が高かった3系統は土壤湿害に適応性があると思われた。生存率及び地下部の収量を総合的に判断すると、北海道北部の気候に適した栽培系統は第一に系統29及び系統38、次に系統45であると思われた。

2. 品質評価：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及び29が有望であった。その内特に系統29は多成分を含み、系統17、18より優れていると考えられたが、Sennoside A含量が日局の定量試験で0.25%を下回る場合があるという問題があった。試料のサンプリング方法にもよると考えられるが、確実にSennoside A含量を満足させるためには系統17がよい。一方、菅平において2回目の栽培で成功したRPI型・Rp4タイプの系統38の栽培3年目の根茎及び根では成分的に系統29に匹敵し、おそらくSennoside A含量は系統29より高い可能性があった。ダイオウが自家不和合成であることを考えると、系統29、系統38及び系統17の3系統ともに増殖を図っていきたいと考えている。今後、これらの系統間の交配も実現したい。

3. 網羅的成分分析：ダイオウの網羅的成分分析手法を開発するため、定法として用いられる逆層クロマトグラフィー分析をはじめ、様々な高速液体クロマトグラフィー用カラムを用いて条件検討を行った。定法どおり成分をバランス良く同定する場合には逆層クロマトグラフィーは第一の選択肢である。一

方、Procyanidin類の分離には Amide カラムによる親水性クロマトグラフィー (HILIC) が再現性も良く、ESI-MS との連携もよいので第一の選択肢となった。しかし MS 検出器で直接検出できる Procyanidin 類は分子量が m/z 2000 以下であった。現在のところ高分子量 Procyanidin 類は重合度 1 の差を持って分ける方法は無く、化学的方法で混合物の平均分子量を求めるしかない。本研究では Procyanidin類の分析に遠心式限外ろ過を導入し、遠心限外ろ過による各分画の濃縮パターンや HILIC LC-MS プロファイルが異なることが明らかになった。このことは、ダイオウのサンプル間で蓄積している Procyanidin 類の構造が異なることを示している。この新しい視点の導入は、本研究の成果の一つである。ただし、この方法では重合度が 6 までの Procyanidin 類が分析できたのみであり、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。この領域で溶出している縮合タンニンにはさらに大きな重合度を持っていると考えられる。

4. 化合物の組織内分布：イメージング MS により、Sennosides は根茎の髄の異常維管束に局在していることが視覚的に明らかになった。「異常維管束が認められることが、大黃の正品である証しである」とする鑑定上の見解は、暗に Sennosides の存在を指していたとも考えられる。髄のみから加工される生薬である「錦紋大黃」の加工方法の根拠が示された。

3) エゾウコギ

薬用植物指導センターで後熟処理及び休眠打破処理を行った種子では、発根率や育苗まで至った個体数に系統間差が見られ、少なかった。一方、昭和大学薬用植物園で同処理を行った種子では育苗まで至った個体数が多かった。両機関の方法を比べた場合、後熟処理の期間、休眠打破処理の期間がともに後者の方が長かった。発根率を高め、種苗数を増やすためにはこの段階が重要であること

が示唆された。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。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、今後検討する課題が多い。

養液栽培したエゾウコギの葉に、カフェオイルキナ酸類やフラボノイドが含まれていることが明らかになった。カフェオイルキナ酸類には神経保護作用、抗酸化作用など、フラボノイドのrutinやhyperosideには抗酸化作用、抗炎症作用などが報告されており、健康食品として十分開発できる可能性がある。さらにサポニン成分の含有も確認されたことから、今後、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

シャクヤクの園芸品種 (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年目の根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局の規格 (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。したがって、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。

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、薬理作用が報告されている8成分の定量分析を4~8年生の根について行った。すでに定量済みの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含め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

種を選び出した。また、3品種の種苗を富山県上市及び長野県菅平で4年間栽培し、根の成分含量を両地域で比較した結果、Paeoniflorin 含量は後者で、一方 PGG 含量は前者で高いことが判明した。

薬用品種「梵天」の根を用いて、貯蔵法、加工法及び乾燥法の異なる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、周皮を除き、乾燥機(30℃)で乾燥する方法が4成分に関して最もよい含量を示した。低温貯蔵により Paeoniflorin 含量が安定し、高含量に繋がった。湯通し加工により特に PGG 含量が増加した。一方、皮去り加工により Albiflorin と Catechin の含量の減少が見られ、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。

2) ダイオウ

長野県菅平薬草栽培試験地では、2回の栽培研究により、*R. palmatum* の RPII 型・Rp5 タイプの系統の生存率が高いことがわかった。この系統では短い根茎に太い根が数本付くという特徴があり、さらに系統 29 では根の断面が橙黄色で粘液が認められた。2回目の栽培では RPI 型・Rp4 タイプの系統 38 が生育できるように、地温上昇が少ないと思われる圃場に定植した。その結果、4年目で87.5%の生存率を示した。この系統の株では根茎の発達が見られ、系統 29 と同様に断面が橙黄色で粘液が存在し、品質がよいものと考えられた。一方、北海道名寄の栽培研究においても、生存率及び地下部の収量の成績が良好であった系統 29 と系統 38 が、土壤湿害に適応性があり、北海道上川北部の気候に適した栽培系統であると結論づけられた。

2008年～2012年の栽培で収穫された11系統の5年目のダイオウ地下部に関する成分研究により、日本で栽培可能でかつ品質良好な系統として、RPII 型・Rp5 タイプの系統 17、18 及び 29 を見出した。これらの内、系統 29 は Resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside、Isolindleyin を、系統 17 は Sennoside A、(-)-Epicatechin

gallate を他の2系統より多く含んでいた。多成分を含んでいるという点では系統 29 が良質であるが、Sennoside A 含量が日局規定に満たない検体があった。続けて2011年～2014年に栽培を行い、栽培3年目の系統 29 と RPI 型・Rp4 タイプの系統 38 を比較した結果、系統 38 は系統 29 とほぼ同様なクロマトグラムを示し、Sennoside A 含量は系統 29 より高いことが推測された。以上の結果から、今後、系統 29、38 及び 17 の増殖を図ることとした。

大黃の薬効には上記の成分の他に、重合度の高い Procyanidin 類(縮合タンニン類)が関与することから、これらの分析法を種々検討した。抽出エキスを遠心式限外ろ過フィルターで分離し、分子量によって分けた上で HILIC カラムを用いた LC-MS 分析法を行うことにより、重合度が6までの Procyanidin 類を比較的容易に検出することが可能になった。また、遠心限外ろ過による各分画の濃縮パターンや HILIC LC-MS プロファイルがサンプル間で異なることが明らかになり、ダイオウの系統間または個体間で蓄積している Procyanidin 類の構造が異なることが示唆された。

ダイオウ根茎の横断切片について Sennosides の脱プロトン化分子(m/z 861)でイメージング質量分析を行うことにより、Sennosides は髄の異常維管束に局在することが明らかになった。一方、根では周皮や皮層から師部にかけて局在が見られた。

3) エゾウコギ

後熟促進処理及び休眠打破処理を行うことにより、発芽までに要する期間を1/3に短縮させた。この種子を閉鎖環境下で養液栽培し、発根・発芽から育苗、屋内馴化、屋外馴化までを行い、種子611粒中84個体を植物体まで生育させ、圃場に定植した。発芽率は約13%、育苗に至るまでの成功率は16.4%であり、今後改良の余地があるが、一連の栽培法は確立できた。

葉について LC/MS 分析を行い、カフェオイルキナ酸類8化合物、フラボノイド2化合物

を同定した。養液栽培で育苗した植物体の葉の主要成分は、3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 及び malonyl-3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid であった。養液栽培後屋外で馴化した場合、hyperoside 及び 5-caffeoylquinic acid が増加した。他にオリゴ糖やサポニン成分も含有していたことから、養液栽培したエゾウコギの葉から健康食品を開発することは可能であると考えられる。

シャクヤクについては、選択した品種の新鮮な根について、本研究で確立した加工調製法を行い、生薬「芍薬」として仕上げている。今後、富山県のプロジェクとして臨床研究が行われる予定である。ダイオウについては、選択した3系統の増殖を行い、Sennoside A 含量が「大黃」の日局基準を満たす系統を作り上げていく計画である。エゾウコギについては、圃場栽培を継続し、地下部の成分組成を調べて、「刺五加」生産を達成する予定である。葉については生物活性を検討中であり、健康食品の開発にさらに近づきたい。

以上、本研究により、ブランド生薬を開発する基盤はほぼできあがったと考える。

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) Zhu, S., Yu, X. L., Shiraishi, F., Komatsu, K., Murakami, M., Tamura, T.: Genetic characterization of White/Red Peony roots and the horticultural varieties of *Paeonia lactiflora*. The 7th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy (2012.8.23-25, Seoul, Korea).
- 2) Zhu, S.: Genetic and chemical

characterization of white/red peony roots and the horticultural cultivars of *Paeonia lactiflora*. The 5th International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine – Basic and Clinical Research on Traditional Medicine, Hokuriku Innovation Cluster for Health Science (2012.10.13, Toyama).

- 3) 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)
- 4) 于曉麗、朱姝、吳焜秋、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)
- 5) 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、中曾根亨、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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 越村佳奈、平修、朱姝、植松宏平、片野肇、小松かつ子: 生薬原料(大黃)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).
- 11) 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)
- 12) 数馬恒平、葛躍偉、紺野勝弘、小松かつ子: LC-MSによる大黃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。