

201407030A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物
総合情報データベースの拡充と情報整備に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

(H25-創薬-指定-006)

研究代表者 川原 信夫

平成27(2015)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの拡充と情報整備に関する研究	川原信夫	1
--	------	---

II. 分担・協力研究報告

1. データベース構築及び遺伝子鑑別情報に関する研究	河野徳昭	
ー薬用植物総合データベースのシステム拡充に関する研究ー	河野徳昭	61
ー生薬（キジツ、エンゴサク）の遺伝子情報についてー	河野徳昭	81
2. 成分分析データ情報、カテゴリー横断研究及びさく葉標本に関する研究	洵野裕之	
生薬の LCMS による成分分析データの構築に関する検討に関する研究	洵野裕之	95
HPTLC による国内流通生薬の成分比較	洵野裕之・天倉吉章	195
各種生薬エキスの一酸化窒素（NO）産生抑制活性並びに多変量解析によるバイオマーカー探索に関する研究	洵野浩之	219
3. 成分分析データ、遺伝子鑑別情報及び国際標準化情報に関する研究	袴塚高志	
LC-MS/MS を用いた成分分析プロファイルに基づく生薬の化学成分情報のデータベース化に関する研究	袴塚高志・鎌倉浩之	229
ーISO/TC249 における東アジア伝統医学の国際標準化ー ～工業製品分野の動向～	袴塚高志	279
4. 生物活性情報に関する研究	柴原直利	
TNF- α 刺激による NF- κ B 活性化に対する抑制効果	柴原直利・櫻井宏明	291
樹状細胞の生存に対する生薬エキスの効果	柴原直利・山本 武	309
Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制活性	柴原直利・東田千尋	331
低酸素応答による HIF-1 α の活性化に対する抑制効果	柴原直利・横山 悟	347
5. 生物活性情報に関する研究		
ー生薬抽出エキスの抗酸化機能に関する研究ー	大谷克城	363
6. 成分分析データ情報に関する研究		
ーTLC 写真情報の集積ー	木内文之	373
7. 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究		
ー漢方薬に使用される薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究ー	小松かつ子・丸山卓郎・河野徳昭	393

8. 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究		
ー生薬、カンキョウの遺伝子情報についてー	丸山卓郎	……433
ー生薬、キクカの遺伝子情報についてー	丸山卓郎	……437
9. トランスクリプトーム・ゲノミクス解析に関する研究		
ー薬用植物のトランスクリプトーム・ゲノミクスの情報の収集ー	斉藤和季	……447
10. 植物組織培養情報に関する研究	吉松嘉代	
ー組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備と組織培養物の資源化ー	吉松嘉代	……463
牛膝、山梔子の基原植物の組織培養に関する研究	吉松嘉代・岩本 嗣	……473
スペインカンゾウ及び黄耆の基原植物の組織培養に関する研究	吉松嘉代・松本敏一	……479
11. 植物体栽培情報に関する研究	菱田敦之	
ー植物体栽培および植物の効率的生産法に関する情報ー	菱田敦之	……485
7年間低温貯蔵した種子の発芽率について	菱田敦之・飯田 修	……503
12. 絶滅危惧薬用植物情報及び植物栽培に関する研究		
ー絶滅危惧薬用植物情報に関する研究ー	杉村康司	……513
13. 内部及び外部形態情報に関する研究	酒井英二	
ー内部形態写真及び植物体栽培情報に関する研究ー	酒井英二・寺林 進・山路誠一	……525
麦門冬の生薬の性状について	酒井英二・寺林 進・山路誠一	……533
ボウフウ、ボクソクの性状について	酒井英二・寺林 進・山路誠一	……539
14. 官能データ情報の集積に関する研究		
ー味認識装置並びに分光測色計を用いた 生薬熱水抽出エキスの味及び色の評価ー	安食菜穂子	……549
15. 副作用情報に関する研究	川原信夫	
漢方処方の副作用報告に関するデータベース構築	川原信夫・牧野利明	……575
16. ISO/TC249 国際標準化情報の集積に関する研究	川原信夫	
ー2012年以降継続中のWG1分野の国際標準案に関する進捗状況 及び第5回ISO/TC249WG1会議に関する報告ー	川原信夫・柴田敏郎	……579
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表		……591

薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報
データベースの拡充と情報整備に研究（H25-創薬-指定-006）

研究代表者 川原 信夫 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター センター長

本研究は、漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベースのさらなる拡充並びに情報整備を通じて、漢方薬の品質、有効性並びに安全性確保と国内における効率的増殖法の確立及びその情報公開による薬用植物栽培振興による行政支援並びに漢方製剤原料資源の確保と維持を目的とした生物資源に関する研究支援、産業振興に寄与することを目的とする。

（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターでは、希少資源を数多く含むこれらの膨大な資産のより積極的な活用並びに高度利用化を進めるため、保有資源に情報を付加し活用する基盤整備の一手法として、平成22年度より3年間遂行された「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究」において、データベースの基本骨格を構築すると共に日本薬局方収載の重要生薬約50品目について、約750種類の各種国内市場流通品を収集し、共通試料による各種データ集積を行い、「薬用植物総合情報データベース」として、2013年3月より一般公開を開始した。本研究では、上記薬用植物総合情報データベースのさらなる拡充並びに情報整備を目指し、情報量の充実を図ると共に国際標準化情報等、刻々と変化する世界情勢に対応した最新の情報を付加する。さらに資源管理システムの在庫管理を強化し、資源分譲管理システムに発展させ、薬用植物資源研究センターが保有する各種薬用植物資源の分譲にも対応したデータベースを完成させる。これらをホームページ上に公開し、公的機関による唯一の薬用植物総合情報データベースとして、各種情報、資源提供を通じて国内の薬用植物栽培及び関連産業振興に寄与する。

今年度は、薬用植物総合情報データベースの機能拡充の主軸であるカテゴリー横断検索システムについて、データの視認性の向上を目指し、遺伝子情報の多重整列表示や系統樹解析・表示機能を実装するなど、検索・表示機能の改良を進めた。希少薬用植物情報では、ミシマサイコとキキョウの2種に関し、福岡県の自生地において両種の生育地点、生育量、生育環境等の確認調査を実施した。国際化対応情報では、京都で開催された今年度のISO/TC249の会議内容に関する情報を集積した。薬用植物トランスクリプトミクス・ゲノミクス情報では、選抜した8種類の薬用植物のゲノムサイズを測定し、現在、シナニッケイの葉からゲノム抽出を実施し、ゲノム解読を試みている。更に、H25年度に実施した48植物種160サンプル由来のRNA-Seq解析に関して、配列アッセル及びBLAST検索を終了した。成分分析情報では、12種166品目の市場流通生薬を収集し、生薬の熱水抽出エキスの作成を完了した。成分分析と並行してイレイセン等5種についてNO産生抑制活性試験による評価を行った。生物活性情報では、オウゴン等25種のエキスについて、*in vitro*におけるNF- κ B活性化に対する抑制効果、Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する抑制活性、樹状細胞生存活性、低酸素応答によるHIF-1 α の活性化に対する抑制効果並びに抗酸化活性評価を実施した。遺伝子鑑別情報では、キョウカツ、ケイガイ等7種の生薬市場品の解析を行っており、キョウカツでは局方収載されている2種を含む同族植物3種の区別が可能となった。さらにカテゴリー横断的複合データの解析研究では、キクカについて、LCMS多変量解析を行い、活性化合物と示唆される化合物の単離、構造解析を行い、活性化合物はlinarinと同定された。

研究分担者

菱田 敦之

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 北海道研究サブリーダー

杉村 康司

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 種子島研究サブリーダー

吉松 嘉代

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 室長

渕野 裕之

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 室長

河野 徳昭

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 主任研究員

安食 菜穂子

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 研究員

柴原 直利

富山大学和漢医薬学総合研究所 所長

袴塚 高志

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

丸山 卓郎

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

斉藤和季

千葉大学大学院薬学研究院 教授

木内 文之

慶應大学薬学部 教授

小松 かつ子

富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

酒井 英二

岐阜薬科大学 教授

大谷 克城

旭川医科大学 准教授

研究協力者

熊谷 健夫

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 主任研究員

林 茂樹

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 研究員

飯田 修

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 研究員

柴田 敏郎

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

乾 貴幸

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

山口真輝

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

菊池健太郎

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

蓮沼 タミ

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

岩本 嗣

神奈川工科大学大学院工学研究科 准教授

松本 敏一

島根大学生物資源科学部附属生物資源教育研究センター 准教授

合田 幸広

国立医薬品食品衛生研究所薬品部 部長

鎌倉 浩之

国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

朱 姝

富山大学和漢医薬学総合研究所 助教

佐々木 陽平

金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授

横山 悟

富山大学和漢医薬学総合研究所 助教

東田 千尋

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授

櫻井 宏明
富山大学大学院医学薬学研究部 教授
山本 武
富山大学和漢医薬学総合研究所 助教
山崎 真巳
千葉大学大学院 薬学研究院 准教授
高橋 弘喜
千葉大学大学院 真菌医学研究センター
准教授
櫻井 哲也
理化学研究所 ゲノム情報統合化研究ユ
ニット ユニットリーダー
持田 恵一
理化学研究所 バイオマス基盤研究チー
ム 副チームリーダー
福島 敦史
理化学研究所 統合メタボロミクス研究
グループ メタボローム情報研究チーム
研究員
村中 俊哉
大阪大学大学院工学研究科 教授
關 光
大阪大学大学院工学研究科 准教授
福島 エリ オデット
大阪大学大学院工学研究科 助教
野路 征昭
徳島文理大学 薬学部 准教授
兼目 裕充
徳島文理大学 生薬研究所 助教
岡田 岳人
徳島文理大学 香川薬学部 助教
鈴木 秀幸
かずさDNA研究所 産業基盤開発研究
部 主席研究員
金谷 重彦
奈良先端科学技術大学院大学 情報科学
研究科 教授
小野 直亮
奈良先端科学技術大学院大学 情報科学
研究科 助教

伊藤 美千穂
京都大学大学院薬学研究科 准教授
新井 一郎
日本薬科大学 教授
天倉 吉章
松山大学薬学部 教授
好村 守生
松山大学薬学部 講師
杉脇 秀美
松山大学薬学部 嘱託職員
寺林 進
横浜薬科大学 教授
山路 誠一
日本薬科大学 准教授
小林 みな
日本薬科大学
水上 昭吾
日本薬科大学
牧野 利明
名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授
成川 佑次
慶應義塾大学薬学部 専任講師
高橋 豊
エムエスソリューションズ株式会社
石崎 昌洋
三和生薬株式会社
山田 裕子
和光純薬株式会社試薬開発本部
佐藤 陽子
和光純薬株式会社試薬事業部
平川 尚子
和光純薬株式会社品質保証部
川崎 武志
株式会社ウチダ和漢薬研究開発部
神本 敏弘
株式会社ツムラ生産本部
菊地 祐一
株式会社ツムラ生産本部
近藤 誠三
小太郎漢方製薬株式会社研究所

杉本 智潮

救心製薬株式会社山梨工場技術研究部

日向野 太郎

大正製薬株式会社セルフメディケーション

開発研究所

玉木 智生

日本粉末薬品株式会社研究開発部

山本 豊

株式会社栃本天海堂品質管理部

真鍋 徹

北九州市立自然史・歴史博物館 自然史

課長

斉藤 政美

宮崎県立総合博物館 元副館長

A. 研究目的

近年、代替医療として漢方薬や生薬への関心が高まる中で、生薬の安全性確保、有効利用に関して生薬の正しい認識と理解が必須である。生薬は天然物のため、栽培環境や調製法が有効成分含量など品質を大きく左右する。漢方医療の現場で用いられる処方生薬の品質は薬効に大きく影響するため、高品質生薬の安定供給のためには生産、製造及び研究の各分野において生薬の十分な基礎データが求められる。我が国では、年間生産額 1 億円以上の医療用漢方エキス製剤が約 90 処方存在し、その生産量は平成 16 年現在、総計約 5400 トンに上る。これらの漢方処方薬は約 100 種の生薬より構成され、その殆どが日本薬局方収載生薬である。しかし原料生薬の約 9 割は中国等からの輸入に依存しており、特に近年、地球温暖化による生産地の砂漠化に加え、中国国内需要の増加により生薬の国内安定確保が厳しくなっている。本研究では、薬用植物総合データベースのさらなる拡充と情報整備を通じて、第一に漢方薬の品質、有効性並びに安全性確保と国内における効率的増殖法の確立及びその情報公開による薬用植

物栽培振興を通じた行政支援を行う。第二に漢方製剤原料となる貴重な遺伝資源の緊急的確保と維持を目的とした生物資源に関する研究支援、産業振興を行う。

独立行政法人 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター（以下、センター）は、筑波（茨城県つくば市）、北海道（北海道名寄市）、種子島（鹿児島県熊毛郡中種子町）の 3 研究部を擁し、植物体約 4,000 点、種子約 13,000 点に加え、生薬標本、さく葉標本、無菌培養物、遺伝子クローンなど様々な形態の種々の薬用植物資源を収集、保存している。また、優良な種苗の提供や、諸外国の研究機関との種子交換業務をはじめとする、保有資源の提供も積極的に行っている。

センターでは、希少資源を数多く含むこれらの膨大な資産のより積極的な活用並びに高度利用化を進めるため、保有資源に情報を付加し活用する基盤整備の一手法として、第一期 5 カ年の中期目標のひとつに「薬用植物等の積極的な収集、保存、確実な情報整備及び行政的要請への正確な対応を行う」という目標を掲げ、これを実現するため、「センター保有の重要な薬用植物等 100 種につき、その特性、成分、生物活性等の情報をデータベース化し公開する」という中期計画を設定した。2005 年より重要薬用植物約 100 種について、テキストデータ、写真データの収集ならびにデータベースシステムの構築を行い、2010 年 3 月 31 日よりインターネット上で一般公開を開始した。本データベースには、重要な薬用植物及び生薬の基本情報に加え、栽培指針に収載された情報をベースとした栽培法に関する情報、そして種子から植物の成長・収穫、生薬の調製に至る、のべ約 1,300 点の豊富な写真データが収載されている。これは、薬用植物、生薬、そして栽培に関する情報が相互参照可能な形式で収載された、初の

データベースであり、年間約 2,600 件のアクセスがあり、検索サイトでも検索結果のトップに表示されるなど、薬用植物に関するデータベースとして一般へも広く認知されるようになっている。

本研究においては、前述の現行薬用植物データベースの構造を基本骨格とし、H22 年度から 3 ヶ年計画で、厚生労働科学研究費「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）」の一環として、漢方薬に使用される薬用植物、生薬に関連する種々の情報を統合してデータベース化する「薬用植物総合データベース」の構築を進めてきた。本データベースは H25 年 3 月に公開を開始したが、データベースに収載される情報の充実並びに、機能面の拡充を図ることを目的とし、さらなる情報の収集並びに、新規カテゴリーの追加、そしてカテゴリー間横断検索機能等の追加といったシステムの拡充・整備を進める、今年度より、実質的な 2 期目にあたる 3 ヶ年の研究を開始した。

本研究には、国内の主要な生薬及び薬用植物の研究機関、大学、企業団体等が参画しているが、薬用植物の国内唯一のリファレンスセンターである当センターが主導し、漢方薬に関連する幅広い領域の情報の総合的なデータベース化を行うことは、薬用植物資源の安定供給を確保し、関連する産業振興を指向する上で非常に意義深い。

本データベース研究は、薬用植物および生薬に関連する種々の情報の実データを収載する点を大きな特徴としており、具体的には、国内に実際に流通する生薬を、関連企業・団体の協力の下、モデル試料として収集し、それらについて、成分情報、遺伝子鑑別情報等の実データの収集を行い、データベースに収載する。初年度となる今期の研究課題においては、データ未収集生

薬について情報の収集を進め、データベース情報量の充実化を図るのみならず、薬用植物のトランスクリプトーム・ゲノミクス情報、稀少薬用植物情報、そして生薬の国際標準化に関する情報の 3 新カテゴリーについて情報収集を開始するとともに、カテゴリー横断的なデータベースの検索、データ比較機能について実装を行う。このように実測値を中心とする多種の情報を収載し、かつカテゴリー横断的にデータの比較が可能なデータベースは国内唯一のものになると期待される。

B. 研究方法

【薬用植物総合情報データベースの拡充に関する研究】（河野）

（1）薬用植物総合情報データベースのシステム拡充・改修の概要

厚生労働科学研究費「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）」（H22-H24）において構築した薬用植物総合データベースのデータ構造並びに、今期に追加予定の新規データカテゴリーの概要並びに今期のデータベースシステム拡充を主とするデータベース整備のスケジュール概要をまとめた。

本データベースの開発には高度な専門性が要求されるため、これらの開発は株式会社富士通九州システムズ（福岡県福岡市）に委託し、今年度は、開発方針の打ち合わせや、開発成果物の取り扱い説明等を含め、2 回のミーティングを行った。

データ入力担当者からの不具合の報告、操作上の疑問点等は逐次、富士通九州担当者に連絡し、今年度のシステム開発事項として追加対応することを確認、もしくは対処法をユーザに連絡する等の対応を行った。

（2）運用中の薬用植物総合情報データベースの機能追加、修正等

今年度は、H25 年 3 月より運用中の薬用植物総合情報データベースについて、表機能の追加及び、修正を行った。主な追加・改修点以下のとおりである。

- ・以前より要望のあった生物活性情報の一括登録システムの開発。
- ・昨年度開発し運用を開始したカテゴリー間横断検索機能に対する、データ表示機能等の改良・整備。
- ・遺伝子鑑別情報に登録される塩基配列情報の多重整列（アラインメント）解析機能及び系統樹描画機能の追加。

上記に加え、運用上に明らかになった不具合等について、改修・改良を行った。

【成分分析データの集積に関する研究】

（１）熱水抽出エキスの作成（渕野、蓮沼）

昨年度に引き続き生薬関連業界に協力のもと収集された、現在市場に流通している生薬について、昨年度と同様に粉碎後に熱水抽出を 2 時間行い、凍結乾燥 1 週間により、最終的に熱水抽出エキス（いずれもアモルファス状）を得た。

（２）各種 LC-MS 情報等の集積（渕野、袴塚、鎌倉、政田、高橋）

抽出された生薬エキスについて、国立医薬品食品衛生研究所、医薬基盤研究所の 2 機関において LC-MS の検討を行い、それらの情報を集積した。最終的に産地情報や加工条件方法などの情報をもとに多変量解析を行った。

（３）LCMS データによる多変量解析（渕野、高橋）

今回取得した生薬の熱水抽出エキスに関しては、Thermo Fisher Scientific 社製ソフトウェアである SIEVE2.1 によるアラインメントを行い、さらに Umetrics 社製多変量解析ソフトウェア SIMCAP+ 12.0 を用いて主成分分析（PCA）と一部については判別分析（OPLS）を行った。

（４）TLC 写真情報の集積（木内、川原、合田、袴塚、石崎、山田、佐藤、平川、川崎、神本、菊地、近藤、杉本、玉木、成川、日向野、山本）

生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者を中心とする研究班を組織し、TLC による確認試験が設定されていない生薬について、TLC による新たな確認試験を設定するために、設定品目の検討、指標成分の選定、試験法の構築を行い、試験法が確立できた品目については、そのクロマトグラムを画像データとして収集した。実験には、Merck 社と和光純薬工業から市販されている TLC プレートを用いた。なお、TLC による確認試験を迅速化するために、TLC の展開距離は 7 cm とした。また、クロマトグラムの色の再現性を確保するために、発色を伴う TLC 画像については日本色研の新配色カード 129a の vivid (Lot No. 00706) から 9 色 (3:yR, 8:Y, 12:G, 16:gB, 19:pB, 24:RP, W, Gy5.5, Bk) を選んで順番に並べた色見本を作成し、これを同一画面に入れて画像データを取り込んだ。

（５）HPTLC による国内流通生薬の成分比較（渕野、天倉、好村、杉脇、川原、合田）

１）試料、試薬および装置

試料とした国内流通品〔サイシン（18 試料）、チョウトウコウ（18 試料）、モクツウ（16 試料）、サンヤク（7 試料）、チモ（16 試料）、オンジ（9 試料）、キキョウ（18 試料）、エンゴサク（15 試料）、カンキョウ（17 試料）、キクカ（12 試料）、コウジン（12 試料）、シンイ（19 試料）〕は、日本漢方製剤協会、日本生薬連合及び東京生薬協会を通じて入手した。高性能薄層クロマトグラフィ（HPTLC）は、HPTLC Silica gel 60F₂₅₄ Glass plate (20×10 cm) を用いた。試料溶液注入には、TLC サンプルアプリーケーター リノマート V、TLC 画像の撮影には、TLC 撮影システム TLC ビジュアルライザーを使

用した。

検出は、紫外線(UV)照射(254, 366 nm)、希硫酸試液、4-ジメチルアミノシンナムアルデヒド・塩酸試液、ドラーゲンドルフ試液、亜硝酸ナトリウム試液、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液、1,3-ナフタレンジオール試液、塩化鉄(Ⅲ)・メタノール試液、バニリン・硫酸・エタノール試液(いずれも局方に準拠して調製)のいずれかにより行った。

2) TLC 条件

すべての試料溶液および標準溶液は HPTLC ガラスプレートにスポットし、約 7 cm 展開した。各スポットのバンド幅は 8 mm、バンド間隔 2 mm とした。

【遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究】

(1) キョウカツ (小松、朱)

1) 実験材料

キョウカツ 10 市場品につき各 1 検体を取り、試料とした。また対照として、四川省理県で収集した *N. incisum* に由来する羌活市場品 1 検体を加えた。

2) 実験方法

試料の一部を削り、約 100 mg を steal beads 数粒とともに 2 ml チューブに入れ、-80℃で 1 時間冷凍した。Tissuelyser で 30/秒、2.5 分間振動させ、試料を粉末にした。Steal beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液の一部について 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、PCR 法で ITS1-5.8S-ITS2 の全領域をプライマーセット ITS-1F と 18S-25S-3'R を用いて増幅した。PCR 反応には KOD-FX-Neo DNA polymerase を用いた。得られた PCR 産物のうち一部について 1%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した後、

その残りを Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System で精製した。この PCR 産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit でシーケンシング反応を行った。反応終了後、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。塩基配列データの収集には 3100-Avant Data Collection Software を使用し、その後、Sequencing Analysis Software を使用して配列の解析を行った。次に、得られた配列について、Software multalin program を用いて配列間の比較を行った。

(2) ケイガイ (小松、朱)

1) 実験材料

ケイガイ 10 市場品につき、各 1 検体を取り、試料とした。

2) 実験方法

試料の一部を削り、約 100 mg を steal beads 数粒とともに 2 ml チューブに入れ、-80℃で 1 時間冷凍した。Tissuelyser で 30/秒、2.5 分間振動させ、試料を粉末にした。Steal beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液の一部について 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、プライマーセット ITS-1F と 18S-25S-3'R を用いて ITS-5.8S-ITS2 の全領域を PCR 法で増幅した。PCR 反応には KOD-FX-Neo DNA polymerase を用いた。PCR 反応は Takara PCR Thermal Cycler TP600/650 で行った。得られた PCR 産物のうち一部について 1%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した後、その残りを Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System で精製した。この PCR 産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit でシーケンシング反応を行った。プライマーは PCR 法による増幅で用いたものの他、In-18S-25S-3'R と In 18S-25S-5'F を使

用した。反応終了後、BigDye XTerminator™ Purification Kit を用いて精製し、上澄み液を MicroAmp Optical 96Well Reaction Plate に移し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。塩基配列データの収集には 3100-Avant Data Collection Software を使用し、その後、Sequencing Analysis Software を使用して配列の解析を行った。次に、得られた配列について、Software multalin program を用いて配列間の比較を行った。

(3) イレイセン (佐々木)

1) 実験材料

イレイセン 15 市場品につき、各 1 検体を取り、試料とした。

2) 実験方法

試料の一部を削り、約 100 mg を液体窒素で凍結、粉砕し、1.5 mL チューブに入れた。この粉末に対し DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。抽出液の一部をとり、分光光度計により濃度を測定した。抽出した全 DNA のうち、一部は Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) を使用してタンパク質を沈殿させた後、エタノール沈殿を行って DNA を精製した。次に PCR 法により核 ITS 領域を増幅した。使用したプライマーは、ITS1 領域についてはプライマーセット Akebi-F (GCT CCT ACC GAT TGA ATG GT) と Akebi-26SR (GTA AGT TTC TTC TCC TCC GC) である。得られた PCR 産物のうち一部について 1.5% アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した後、その残りを Fast Gene Gel/PCR Extraction kit で精製した。この PCR 産物について BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit でシーケンシング反応を行った。反応終了後、エタノール沈澱法によって精製し、ABI PRISM 310-Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。塩基配列の解析、比較にはソフトウェア DONASIS

Mac v.3.0 を使用した。

(4) カンキョウ (丸山)

1) 実験材料

カンキョウ 17 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料を、MM-300 により粉砕し、試料の粉末、約 20 mg を TE buffer 200 µL に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit に加え、自動核酸抽出装置により、genomic DNA を抽出、精製した。

このものを鋳型とし、葉緑体 DNA の *trnL* 領域の exon 1, 2 及び *trnF* 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域を含む DNA 断片をそれぞれ別々に増幅した。PCR は、酵素に、BIOTAQ Hot Start DNA Polymerase を、PCR 試薬として Ampdirect plus を用いて行った。得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification Kit により精製した後、ダイレクトシーケンセスにより塩基配列を決定した。塩基配列解析は、fasmac 社の受託解析により行われた。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

(5) キクカ (丸山)

1) 実験材料

キクカ 12 市場品を試料とした。

2) 実験方法

各試料を、MM-300 により粉砕し、試料の粉末、約 20 mg を TE buffer 200 µL に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit に加え、自動核酸抽出装置により、genomic DNA を抽出、精製した。

このものを鋳型とし、植物の核 rDNA 領域及び葉緑体 DNA の *trnH*, *psbA* 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする

核 rDNA ITS 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、KOD FX DNA Polymerase を用いて行った。得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification Kit により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。PCR による目的遺伝子領域の増幅、塩基配列解析のプロセスは、各個体、2 回行い、PCR 酵素による塩基の取り込みミスが疑われた試料については、3 回目の解析を行った。塩基配列解析は、fasmac 社の受託解析により行われた。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

(6) キジツ (河野)

1) 実験材料

本研究に供した生薬キジツの市場流通品モデル試料は 24 品目である。なお、NIB-0830 については試料が少量であったため、遺伝子情報の取得には供試しなかった。

2) 実験方法

1. 生薬キジツからのゲノム DNA 調製及び PCR 増幅

DNA 調製には DNeasy Plant Mini Kit を使用した。上記のように調製した生薬検体を個別に直径 4.8 mm のステンレスボールと共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に 5 分間浸漬したのち、MS-100 にセットし 2,500 rpm で 1 分間破碎した。破碎粉末に 1 mL の DNeasy Plant Mini Kit AP1 バッファー及び 2 μ L の RNase を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。最終的にゲノム DNA は 50 μ L の AE バッファーで溶出し、その 1 μ L を PCR に使用した。

2. 核 DNA ITS 領域の増幅・塩基配列解析

PCR 産物は、アガロース電気泳動で増幅パターンの解析を行った。

クローニングを行う場合は、PCR 増幅産物を Wizard® SV Gel and PCR Cleanup

System でゲル精製し、末端 A 付加ののち、T-vector にクローニングし、各検体について 8 クローンの塩基配列の解析を行った。

ダイレクトシーケンシングの場合は、Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System を使用し、未反応のプライマー及び、プライマーダイマー等のサイズの小さな非特異的増幅産物を除き、サイクルシーケンシング反応の鋳型として用いた。

サイクルシーケンシング反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用い、塩基配列解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer, 80 cm キャピラリー、POP-7 ポリマーを用い、データ解析には DNASIS-Mac v3.7, Finch TV を使用した。

(7) エンゴサク (河野)

1) 実験材料

エンゴサク 15 市場品を試料とした。

2) 実験方法

エンゴサク植物体については、塊茎 1 個体を 1 検体として、各植物種より 2 検体のゲノム DNA 調製用試料を調製した。

DNA 調製キットは DNeasy Plant Mini Kit を標準的に使用した。上記のように調製した生薬片約 20-50 mg を個別に直径 4.8 mm のステンレスボールと共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に 5 分間浸漬したのち、2,500 rpm で 1 分間破碎した。破碎粉末に 1 mL の DNeasy Plant Mini Kit AP1 バッファー及び 2 μ L の RNase を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。最終的にゲノム DNA は 50 μ L の AE バッファーで溶出し、その 1 μ L を PCR に使用した。

葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域の PCR 増幅には基本的に KOD-plus を使用し、アニール 58°C、35 サイクルで行った。

【薬用植物のトランスクリプトーム・ゲノ

ミクス情報の収集】(斉藤、山崎、高橋、川原、吉松、河野、櫻井、持田、福島(敦)、村中、關、福島(エリ)、野路、兼目、岡田、鈴木、金谷、小野)

(1) H25 年度に実施した 48 植物種 160 サンプル由来の RNA-Seq 分析データのトランスクリプトーム解析 (かずさ DNA 研究所)

昨年度、実施した 48 植物種 160 サンプル由来の RNA-Seq 分析データは千葉大学、大阪大学、医薬基盤研究所から提供された RNA サンプルから取得している。今年度、得られた生データを用いて、同一植物頃に、配列アッセンブルを行い、得られた contig 配列に対して、BLASTX 検索を実行した。また、同ソフトにて、植物器官・組織毎に遺伝子発現量を RPKM (Reads Per Killobases per Million) 値にて、出力した。昨年度、構築した薬用植物の EST 情報のサイト (メンバー限定) に配列情報を登録し、RNA サンプルを提供した各研究機関 (千葉大学、大阪大学、医薬基盤研究所) に解析全データを情報提供した。

(2) 薬用成分生合成経路への投影などのインフォマティクス解析 (千葉大学・理研・医薬基盤研究所・かずさ DNA 研究所)

昨年度、RNA-Seq データを獲得したクズ、クララ、シソ、ケシなどを中心として、それぞれの薬用成分生合成に関する遺伝子 contig の推定、発現解析、生合成経路への投影などのインフォマティクス解析を進めた。ケシに関しては、今年度から、奈良先端科学技術大学院大学の協力により、モルヒン生合成経路のインフォマティクス解析に着手した。クズ、クララに関しては、千葉大学医薬薬学府大学院生と真菌医学研究センター、シソに関しては、理研メタボローム情報研究チームがインフォマティクス解析を担当した。

(3) 重要薬用植物のゲノムサイズの測定

(医薬基盤研究所・千葉大学・かずさ DNA 研究所)

第 4 回、第 5 回薬用植物ゲノミクス連絡会 (H26 年 6 月 2 日、H26 年 9 月 3 日) をポリコムおよび電話会議なども利用して開催し、ゲノムサイズを測定する薬用植物 (8 種類) 選抜し、フローサイトメーターによるゲノムサイズ推定した。以下にフローサイトメーターによるゲノムサイズ推定における測定原理及び解析手法を示す。

測定原理：核内 DNA を PI (Propidium Iodide) で染色し、フローサイトメーターで裸核 1 個あたりの蛍光強度を測定する。ゲノムサイズ既知の植物サンプルと比較してサンプル植物のゲノムサイズを推定する。

CyStain PI absolute P キットを使用、染色プロトコールは付属の説明書に従う。フローサイトメーターは CyFlow SL 型を使用、488nm (青) 50 mW レーザーで励起し、赤蛍光を検出する。蛍光強度はゲノムサイズに比例するので、予めサイズ既知のゲノムを用いて検量線を作成し、出現頻度の山の部分の蛍光強度から回帰を行う。「arabi+pasly」の解析結果から、パセリのゲノムサイズは 3208Mbase (2n) と計算され、それぞれの薬用植物のゲノムサイズを示した。その結果、ゲノムサイズの比較的小さいシナニッケイのゲノム解読 (n = ca.767.0Mb) するため、現在、シナニッケイの葉からゲノム抽出を実施し、Miseq (Paired-End 300bp X 3run) で、データ量約 45Gb のゲノムデータを取得する予定である。

(4) 新規 RNA-Seq 分析 (Paired-End 100bp) の取得 (千葉大学・大阪大学・医薬基盤研究所・かずさ DNA 研究所)

今年度新たに千葉大学、大阪大学、医薬基盤研究所から提供された 26 植物種 121 サンプル由来の RNA-Seq 分析を HiSeq1500Rapid mode (Paired-End 100bp)

で行い、既に、一部のデータ取得が完了した。

【組織培養物及び効率的増殖法に関する情報に関する研究】(吉松、河野、乾、岩本、松本)

(1) 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献調査

「薬用植物総合情報データベース」に収載の生薬の基原植物について、植物組織培養による増殖法に関する文献調査を行い、新規情報のデータベースへの入力及び既存データの更新を行った。

(2) オリジナルデータ取得及び資源化のための、植物組織培養物の育成

データベースオリジナルデータ取得用の植物組織培養系誘導のための材料が入手できた植物について、常法による殺菌後、各種培地への植付け及び恒温室での培養を行い、培養系の誘導、増殖法の検討を行った。また、培養植物体の作成及び継代培養法が未確立の植物については、培養条件の検討を行った。

さらに、継代培養により維持してきた対象植物種の培養物については、培養条件及び増殖率等の調査を行った。

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターから分譲を受けたスペインカンゾウ北農試 No.2711、スペインカンゾウ富山大系 No.12851、ナイモウオウギ及びキバナオウギの種子を常法により殺菌、洗浄後、ホルモンフリーの 1/2MS 固形培地上で無菌発芽させた。得られた植物体の腋芽をゼアチン 0, 0.5, 1.0, 5.0 mg/L 添加の 1/2MS 固形培地に置床し、28 日後に生存率、再生率、株数、草丈を調査した。各区 8-10 個体で 3 反復とした。

牛膝の基原植物 *Achyranthes bidentata* と *A. fauriei* の多芽集塊による大量増殖を目的に、*A. bidentata* 無菌培養植物体より、節を

含む茎切片を 5mm 長に切り出し、0.1~10.0 mg L⁻¹ の 5 種類のサイトカニンと 0.1 mg L⁻¹ の Naphthaleneacetic acid を組合せ添加した合計 25 試験区の Murashige and Skoog 寒天培地に置床した。24℃、2,000 lx、16 時間日長条件の恒温室内で培養し、多芽集塊の誘導条件を検討した。

山梔子の基原植物 *Gardenia jasminoides* の無菌培養植物体は、節間が短く、節を含む茎切片の摘出が困難であった。そこで、節間伸長効果の報告があるジベレリン (GA₃) を用いて、*G. jasminoides* の節間伸長に最適な GA₃ 濃度を検討した。

G. jasminoides の無菌培養植物体より、3 mm 長の頂芽を切り出し、GA₃ を 4 濃度で添加した区とホルモンフリー区の合計 5 試験区の MS ゲルライト固形培地に置床した。24℃、2,000 lx、16 時間日長条件の恒温室内で培養し、8 週間後に草丈、節数、正常成育率について調査した。

【植物体栽培及び効率的生産法に関する研究】(菱田、大谷、河野、杉村、林、渕野、飯田、熊谷、山口、菊池)

(1) 生薬、薬用植物における無機成分の多元素一斉測定法の検討

供試材料：データベース研究で収集された市場品。黄耆 (10 系統)、葛根 (18 系統)、沢瀉 (27 系統)、釣藤鈎 (18 系統) および麦門冬 (20 系統) の 5 品目 (93 系統)。

試料溶液の調製：80℃で乾燥した試料 250 mg を精秤し、60 mL 容テフロン製分解チューブに入れ、6 mL の濃硝酸を加えて試料に浸透するまで放置した。次に 1.5 mL 濃塩酸を加えた後、120℃に設定したカーボン製ブロックヒーターで 30 分間加熱した。次に分解チューブの蓋を閉め、ブロックヒーターの設定温度を 155℃に上昇して 30 分間加熱した。分解して得られた溶液は、0.1 N 希硝酸を用いて 50 mL に定容し、PTFE

製ろ過フィルターを用いてろ過して濾液を測定溶液とした。

測定:iCAP-6300 を用い、検量線の作成は、汎用混合標準溶液を用いた。

測定元素と測定波長：標準試料を用いた予備試験から、Ag (測定波長：328.0), Al (396.1), B (249.6), Ba (493.4), Cd (226.5), Co (237.8), Cr (284.3), Cu (324.7), Fe (239.5), Ga (417.2), Ge (265.1), Li (670.7), Mn (257.6), Mo (281.6), Na (588.9), Ni (231.6), Pb (220.3), Sb (217.5), Se (203.9), Si (251.6), Sn (189.9), Sr (346.4), Ti (336.1), V (311.0), W (239.7), Zn (202.5), Zr (343.8), Ca (317.9), K (766.4), Mg (279.5), P (178.2) とした。

(2) 薬用植物の病害虫の調査

調査植物：カノコソウ *Valeriana fauriei* Briquet およびトウキ *Angelica actiloba* Kitagawa

調査方法：調査は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の試験圃場で行った。カノコソウは2014年7月30日、トウキは2014年6月25日に調査した。

(3) 7年間低温貯蔵した種子の発芽率

実験材料は、2006年に種子島研究部で採取、封印、低温貯蔵した28種類の種子を用いた。ラミジップアルミチャック袋に種子および処理A：エージレス(3g)、処理B：エージレス+シリカゲル(6g)を入れ、袋内を脱気後封印し、5℃条件下で貯蔵した。貯蔵前の発芽試験と貯蔵は種子島研究部で行い、貯蔵7年後の発芽試験は筑波研究部で行った。発芽条件は発芽チャンバー以外、両研究部共通で行った。発芽の確認は、出根時および出葉時の2段階で確認し、それぞれが完了するまで調査を行った。出根の確認は、根の出現が認められた時、出葉の確認は、双子葉植物では子葉の展開時、単子葉植物ではハトムギ本葉2葉目、キビ本葉1葉目、ゲットウ本葉2葉目の展開時と

した。

【絶滅危惧薬用植物情報に関する研究】(杉村、河野、真鍋、斉藤、須田)

調査対象種：環境省のレッドデータブックにより絶滅危惧Ⅱ類に選定されているミシマサイコとキキョウ。これらの種は、草地開発と遷移進行などの影響を受けて、自生地となる良好な草地の全国的な減少に伴い野生種の生育個体数が激減している。

調査地域：種子島研究部が属する南西諸島および九州地域。

標本確認調査：九州地域の代表的な植物標本庫のうち昨年調査を行っていない熊本県の松橋収蔵庫において、標本ラベル情報(採集地、採集日、採集者など)のデータ入力と整理し、標本写真の撮影を行った。

ミシマサイコの初期生育試験：宮崎県産ミシマサイコの野生株から採取した種子(2013.12.1 採取1株)を用いて、種子のサイズを計測し、大きいものから順にAランクからDランクに区分し、60粒ずつ黒ポリポットに赤玉、ボラ土、腐葉土を配合した用土に播種した。種子ランク別に発芽率、発芽開始日、盛期、終了日を記録する発芽調査を行った。また、発芽完了後に毎月草丈を計測する生育調査と生存状況を記録した。

ミシマサイコの現地調査：福岡県北九州市小倉南区のミシマサイコの生育地3点、各地点3個体、計9個体において、地上部の形質として草丈、葉長、葉幅、葉色、葉の光沢、葉厚さ、地下部の形質として根の最大長と最大径、根色、直根性と側根性について記録した。さらに、調査範囲における出現頻度の違いを記録した。

キキョウの現地調査：福岡県北九州市小倉南区のキキョウの生育地3点、各地点2個体、計6個体において、地上部の形質として草丈、葉長、葉幅、葉色、葉の光沢、葉

厚さ、地下部の形質として根の最大長と最大径、根色、直根性と側根性について記録した。さらに、調査範囲における出現頻度の違いを記録した。

【漢方薬に用いられる薬用植物の内部及び外部形態情報に関する研究】(酒井、寺林、山路、小林、水上)

(1) 粉末生薬の観察方法

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター(NIB)が収集した市場流通品を鉄鉢を用いて粉末とし、生薬試験法(5.01)に従って、粉末プレパラートを作成し顕微鏡で観察を行った。また、植物研究雑誌、生薬学雑誌、薬学雑誌などを調査し、粉末生薬に関する論文の図を収集した。

(2) 麦門冬、防風、撲楸の生薬の性状

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター(NIB)が収集した市場流通品の麦門冬、防風、撲楸について、外観、内部形態、におい、味を調べた。外観は肉眼で、内部形態は、サンプルを凍結ミクロトームで10~20 µmの厚さにスライスし切片を顕微鏡下で観察した。鏡検用の切片は、酢酸メチルグリーンで染色、抱水クロラル等で適宜処理した。においと味は五感によった。

【生物活性情報に関する研究】

(1) 樹状細胞に対する生薬エキスの効果 (柴原、山本)

1) 実験材料

本研究に使用された25種の生薬エキス試料(オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ、ハンゲ、サイシン、キョウニン、タクシャ、ボウイ)は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料のなかから提供された。

2) 実験方法

雄4-8週令のBALB/cマウスの両足の大腿骨と脛骨より、クリーンベンチ内で無菌的に骨髓細胞を採取した。この骨髓細胞を、10% Fetal bovine serum, 55 µM 2-mercaptoethanol, 100 units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 292 µg/ml Glutamine, 10 ng/ml GM-CSFを添加したRPMI-1640培養液で分化・培養し、6日後に未成熟樹状細胞を得た。未成熟樹状細胞を1.0 x 10⁵ cell/wellで96 well plateに播種し、0.1 µg/mL Lipopolysaccharide (LPS)により24時間刺激を行ない、樹状細胞の成熟化を誘導した。成熟した樹状細胞に、100 µg/mlの濃度で各生薬エキスを添加し48時間処置した。その後、MTT試薬を添加し、樹状細胞の代謝活性に伴いMTTより分解生成されたフォルマザン結晶を可溶化し、570 nmの吸光度にて測定した。また、690 nmの吸光度をリファレンスとした。MTT活性値は生薬エキス未処理群のMTT活性値を基準として計算した。

(2) Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する作用(柴原、東田)

1) 実験材料

本研究に使用された生薬試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料である。

今年度は、オウゴン、カンゾウ、ボウイ、オウレン、ブクリョウ、ビャクジュツ、ダイオウ、サンシシ、サイシン、サイコ、トウキ、ニンジン、マオウ、キョウニン、ケイヒ、ジオウ、ハンゲ、ゴシツ、ショウキョウ、シャゼンシ、ソヨウ、タクシャ、シャクヤク、ソウジュツ、センキュウの25種について活性を検討した。

2) 実験方法

動物の取り扱いには富山大学動物実験指針に従った。胎生 14 日齢の ddY マウスから取り出した胎児を PBS で洗浄後、断頭し、初代培養用に作成した培地に入れた。培地中で、実体顕微鏡下で大脳皮質のみを単離した。大脳皮質を安全キャビネット内で約 1 mm 角に切断した。700 rpm で 3 分間遠心した後、上清を除去し、沈殿物に 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA solution を 2 ml 加え、懸濁した。37℃で 15 分間、5 分置きに攪拌しながらインキュベーションし、培地を 4 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心して上清を除去し、沈殿に 0.004% DNase I-0.03% trypsin inhibitor-PBS 溶液を 2 ml 加え、懸濁した。さらに、37℃で 15 分間、5 分置きに攪拌しながらインキュベーションし、培地を 4 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心し、次に HBSS バッファーを 4 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心した。沈殿に培地を 4 ml 加え、先端を炙りなめしたパスツールピペットで細胞塊が見えなくなるまで穏やかに懸濁した後、70 μ m nylon cell strainer で濾過し細胞液とした。前日にコーティングした及び白色 96-well 細胞培養用マイクロテストプレートに、 2×10^4 cells / well になるよう播種した。37℃、10% CO₂、飽和水蒸気下で培養を開始し、翌日に培地を全量、馬血清の代わりに B-27 supplement を含む新しい培地で交換した。その際、10 μ M A β (25-35) 及び生薬エキスを同時処置し、2 日後に cell viability を測定した。A β (25-35) はあらかじめ滅菌蒸留水に溶解後、37℃で 4 日間インキュベーションし線維化させたものを用いた。Cell viability は、A β (25-35) とエキスとの同時処置期間終了後、96-well マイクロテストプレートに、CellTiter- Glo 試薬を 50 μ l / well ずつ加え、2 分間攪拌し、室温で 10 分間静置した。その後、FilterMax F5 マルチプレートリーダーを用いて、発光シグナルを測定した。A β (25-35) 無処置細

胞での細胞生存率を 100%として表示した。

(3) 転写因子 NF- κ B 活性化に対する効果 (柴原、櫻井)

1) 実験材料

研究に使用された生薬試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料である。本年度は、オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴジツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ、ハンゲ、サイシン、キョウニン、タクシャ、ボウイの 25 種について活性を検討した。

2) 実験方法

1. 細胞培養

ルシフェラーゼアッセイには、NF- κ B 結合配列を 4 つタンデムに持つレポータープラスミドを安定発現する HeLa- κ B6 細胞を用い、親株の HeLa 細胞と同様の方法で培養した。

2. NF- κ B 活性化試験

HeLa- κ B6 細胞を 96 ウェルプレートに播種し (1.5×10^4 cells/well)、翌日に最終濃度 100 μ g/ml で生薬エキスを添加した。その 30 分後に TNF- α を最終濃度 10 ng/ml となるように添加し、さらに 6 時間培養した。培養上清を取り除き、細胞溶解液を調製し、ピッカジーンを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) HIF1 の転写活性化能に対する効果 (柴原、横山)

1) 実験材料

本研究に使用された生薬試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料である。被検生薬が各アッセイ系で活性を示すのかを検証

する目的で、各ロットのアッセイを行い、ロット差を検討することにした。本年度は、オウゴン、カンゾウ、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ、ハンゲ、サイシン、キョウニン、タクシャ、およびボウイの 25 種の生薬について検討を行った。

2) 実験方法

1. 細胞培養

レポータープラスミド pGL4.26-HRE を安定発現する HeLa/HRE-Luc2 細胞を DMEM+10% FCS 培地で培養した。

2. HIF-1 α 転写活性化能の比較試験

HeLa/HRE-Luc2 細胞を 96 ウェルプレートに播種し (1 x 10⁴ cells/well)、翌日に最終濃度 100 μ g/ml で生薬エキスを添加した。その 30 分後に CoCl₂ を最終濃度 200 μ M となるように添加し、さらに 8 時間培養した。培養上清を取り除き、One-Glo を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(5) 生薬抽出エキスの抗酸化機能(大谷、菱田、瀏野)

1) 実験材料

モデル試料生薬の抽出エキス 6 種、118 サンプル [オウギ (11)、チンピ (18)、ボタンピ (21)、ハンゲ (21)、サイシン (20)、キョウニン (27)] を試料とした。

2) ORAC 分析

機器：蛍光プレートリーダー

方法：

1. 96well マイクロプレートに Trolox (35 μ L) とサンプル希釈溶液 (35 μ L) をマイクロプレートに分注し、Blank には Assay buffer (35 μ L) を分注した。

2. FL 溶液 (115 μ L) を分注し、振とう攪拌後、蛍光プレートリーダーにて蛍光強度を測定した。

3. AAPH 溶液 (50 μ L) を加えて振とう攪拌後、直ちに測定を開始した。

4. 蛍光強度の測定は下記条件にて行った。

測定間隔：2 分間

測定回数：45 回 (90 分間)

励起波長：485nm

検出波長：520nm

5. 解析処理

得られた各ウェルでの蛍光強度測定結果より、各サンプルの AUC を算出した。

各 Trolox 溶液の net AUC を X 軸に、各 Trolox 溶液の濃度 (μ M) を Y 軸にとったグラフより、二次回帰式 ($y = ax^2 + bx + c$) を算出した。この回帰式より、以下の計算方法から ORAC 値を算出した。

(6) 一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性並びに多変量解析によるバイオマーカー探索 (瀏野、高橋、蓮沼)

1) 実験材料

本研究に使用した試料は、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターがデータベース構築のために作製した国内市場品の熱水抽出エキスをを用いた。また、細胞は、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 をを用いた。

2) 実験方法

1. 細胞培養

培地は F-12 Ham 培地に FBS を 10%、L-glutamine を 2 mM になるように加えた。RAW264.7 は、インキュベーターにて培養し、コンフルエントになり次第、継代した。継代はおおよそ週 2 回行ない、必要に応じてアッセイに用いた。

2. NO 産生抑制試験法

RAW264.7 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、インキュベーターにて 2 時間培養し、接着させた。mouse recombinant interferon (IFN)- γ および lipopolysaccharide (LPS) をそれぞれ、最終濃度が 0.3 ng/mL、100 ng/mL になるように加え、さらに DMSO に溶解し

た生薬エキス (100 µg/mL) を添加し、インキュベーターにて 16 時間培養した。ポジティブコントロールとして、 N^G -monomethyl-L-arginine acetate (100 µM) を用いた。試験は 3 回行ない、結果は Mean ± S.E. で示した。

3. 多変量解析

解析は、多変量解析ソフトウェア SIMCA P+ ver. 12.0.1 を用いた。

【官能データ情報の集積に関する研究】

味認識装置及び分光測色計を用いた生薬エキスの味覚及び色彩評価 (安食)

1) 実験材料

生薬関連業界の協力の元、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターによって収集、抽出、凍結乾燥された生薬熱水抽出エキスを検討対象として用いた。今年度は、収集された生薬のうちの 10 品目 (113 検体)、オウギ (11 検体)、オウバク (15 検体)、カッコン (15 検体)、センキュウ (9 検体)、ソヨウ (5 検体)、チンピ (15 検体)、ビャクジュツ (8 検体)、ブクリョウ (9 検体)、ボタンピ (15 検体)、マオウ (11 検体) について検討した。

2) 装置

味測定には味認識装置 SA402B を用いた。各味要素を検出するための脂質膜センサは、C00, AE1, AN0, BT0, AAE, CT0 及び CA0 の 7 種類のセンサを用いた。色の測定には分光測色計 CM-5 を用いた。溶液モードで透過光を測定し、 $L^*a^*b^*$ 表色系を用いて表現した。

3) 試料の調製

10 品目の生薬熱水抽出エキスそれぞれ 1 検体について、0.01 – 30 mg/mL の間で 8 段階に濃度を振って測定を行い、各生薬熱水抽出エキスサンプルの至適測定濃度を検討した。その結果、オウギ、センキュウ、チンピ、ビャクジュツ、ブクリョウ、ボタン

ピ、マオウの 7 生薬は 5 mg/mL、カッコン及びソヨウは 1 mg/mL、オウバクは 0.01 mg/mL もしくは 0.1 mg/mL と設定した。その後、10 品目全 113 検体について下記のよう調製し、味及び色測定に供した。

精密に秤量した生薬熱水抽出エキスを水 180 mL へ懸濁し、マグネチックスターラーを用いて室温、約 600 rpm で 10 分間攪拌した後、あらかじめ塩化カリウム (1 M) 2 mL 並びに酒石酸 (100 mM) 0.2 mL を添加した 200 mL メスフラスコへ移し、水で 200 mL にメスアップした。室温、1,660 x g にて遠心分離後、分取した上清を味測定に供した。また、塩化カリウムと酒石酸を各 10 mM と 0.1 mM になるように添加した水溶液をブランクコントロールとした。

4) 測定方法

味の測定：味認識装置を用いて味の測定を行った。塩化カリウム (10 mM) と酒石酸 (0.1 mM) を溶解した水溶液を出力値コントロールとした。試料液の出力値について、ヒトが感じる味強度の違いを推定し、得られた推定値を各味要素の数値とした。今回、本装置を用いて推定した味の要素は、酸性苦味、酸性苦味後味、渋味、渋味後味、塩基性苦味後味、塩酸塩苦味後味、旨味及び塩味であるが、チンピ及びブクリョウについては、これらに加え酸味についての評価も行った。

色の測定：上記のように調製された試料液を分光測色計 CM-5 にて溶液モードで透過光を測定し、 $L^*a^*b^*$ 表色系を用いて表現した。

また、本測定に用いた試料液について、試験者 1 名で官能試験も同時に行った。

【副作用情報に関する研究】(川原、牧野)

厚生労働省医薬食品局が発行する医薬品・医療機器等安全性情報からは、漢方製剤に関する副作用情報について、2013 年 12

月～2014 年 11 月に発表されたものについて、収集、整理した。また、NPO 医学中央雑誌刊行会が発行する医中誌 Web データベースに登録されている抄録のある学術論文を、「漢方」と「副作用」をかけて検索した。さらに、米国立医学図書館が提供する医学・生物文献データベース、Medline の Web 一般公開版 PubMed に登録されている学術論文を、“kampo” OR “kanpo” OR “traditional Chinese” OR “TCM” と “adverse effect” OR “adverse effects” OR “side effect” OR “side effects”をかけて検索した。得られた論文について、情報を整理し、データベースに登録するための Excel フォーマットに入力した。

【国際標準化情報に関する研究】(袴塚、伊藤、新井、川原、柴田)

(1) 第 5 回 ISO TC249 WG1 会議

本会議は平成 26 年 5 月 27 日、日本・京都において開催された。日本からの参加者は川原信夫、柴田敏郎(医薬基盤研薬用植物資源研究センター筑波研究部)、袴塚高志(国立医薬食品衛生研究所)、伊藤美千穂(京都大学大学院薬学研究科)、新井一郎(日本漢方生薬製剤協会)はじめ 14 名で、合計 10 ケ国・40 名以上で行われた。

(3) 第 7 回 ISO TC249 WG2 会議

本会議は、第 5 回 ISO TC249 全体会議の会期中の平成 26 年 5 月 28 日に同じホテルにて開催された。日本側からは総会と同様のメンバーが参加した。

(4) ISO TC249 WG2 web 会議

本会議は、平成 26 年 11 月 26 日に開催され、日本は FUKURACIA 東京ステーションにて対応した。日本側の参加者は、新井、池田、塩本、富塚、佐々木の 5 名であった。

(5) 第 8 回 ISO TC249 WG2 会議

本会議は、平成 27 年 2 月 12 日～13 日にベルリン DIN にて開催された。日本側の参

加者は、袴塚、伊藤、新井、池田、富塚、佐々木、田中(日本東洋医学サミット会議)の 7 名であった。

C. 研究結果

【薬用植物総合情報データベースの拡充に関する研究】

今年度第 1 回目の開発会議を 2014 年 6 月 5 日に行い、新規開発機能、改修事項等についてヒアリング及び打ち合わせを行った。第 2 回開発会議 2015 年 1 月 22 日において今年度の開発項目についてサーバへの導入を行った。

(1) データベースシステム

1-1. ハードウェア、ネットワーク、データベースシステムについて、サーバ構成を改修し、より堅牢でセキュリティレベルの高いシステムへ改修を行った。

(2) 登録機能

2-1. 登録機能全般

「非公開」がデフォルトであった公開設定を、デフォルトを「公開」に変更した。

2-2. 生物活性情報の一括登録システムの構築

「活性試験結果情報」単位で、一括で「活性試験結果」を登録する機能を開発した。

- ・対象は新規登録のみとする。
- ・基本情報、活性試験結果情報(測定データ種別、動物種、濃度単位、備考)はあらかじめ Web の新規登録画面にてフォーム入力しておく必要がある。
- ・エクセルで一括入力できるのは、文字情報のみ。

2-3. モデル試料外形写真登録システムの改修

モデル試料の外形写真を登録システムで登録できるように改修した。

- ・本機能は、これまでの登録システムとは分離し、医薬基盤研内用とする。なお、外形写真以外の登録についてはこれまで