

通りアクセスツールで登録する。

(3) 公開機能

3-1. バグ修正

3-1-1. 日本薬局方収載生薬一覧の生薬名リンクを修正した。

3-1-2. モデル試料の LC 情報一覧で、『名称』の入力の無いデータについて null と表示し、詳細画面へのリンクを付加した。

3-1-3. モデル試料の LC 情報→マススペクトル情報画面で、JCAMP ファイルへのリンクを修正した。

3-1-4. マススペクトル情報の JCAMP ファイルについている JCAMPViewer ダウンロードリンクを削除した。

3-2. ヘッダ・フッタ情報の追加

3-2-1. ブラウザのタイトル部に「薬用植物総合情報データベース」のクレジットを付加した。

3-2-2. フッタに医薬基盤研、薬用植物資源研究センターへのリンクを追加した。

3-3. データ一覧画面の改修

3-3-1. 植物一覧画面

- ・一般名カラムを削除し、植物（和）名の情報が無い場合（和名なし）と表示するように改修した。

3-3-2. 一覧画面共通

- ・すべての項目に並べ替え機能（▼▲ボタン）を追加し、昇順・降順のソートができるように改修した。

3-4. カテゴリー横断検索機能の改修

3-4-1. カテゴリー横断的一覧表示画面

- ・カラム選択ボタン「Columns」を「表示項目の選択」に変更した。
- ・当初、選択情報の保存は行わず画面が表示されるたびに初期状態（全て ON）に戻っているが、一定期間保持できるように改修した。

3-4-2. カテゴリー横断データ一覧テーブルの行と列を入れ替えるオプションを追加した。

3-4-3. モデル試料一覧について、カテゴリー横断データ一覧画面へのリンクを画面上部にも設置し、下方にスクロールした状態での操作性を改良した。

3-4-4. カテゴリー横断データ一覧画面に表示する生物活性情報に、対象のモデル試料管理番号の活性試験結果を表示し、活性試験情報へのリンクを設定した。

3-4-5. カテゴリー横断データ一覧画面に表示する LC の TIC サムネイル画像を (+) と (-) でカラムを分けて表示するように改修した。

3-4-6. カテゴリー横断データ一覧画面に表示する内部形態の情報を内部形態写真のサムネイルに変更した。

3-4-7. カテゴリー横断データ一覧画面に表示された遺伝子データを対象に、ClustalW による多重配列解析（アライメント）の結果と系統樹を描画する機能を開発した。

【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

生薬 20 g から得られたエキス量 (g) をグラフにして示した。イレイセンは 2~5g、エンゴサクは多くのロットにおいて約 4g 前後であった。カンキョウは 2g 前後、キクカは 7g、キジツは 3~8g 程度、キョウカツは 4g、ケイガイは 2.5g、コウジン は 8~10g、サンソウニン は 3.5g 程度であった。シコンは今回参考品として局方外である軟紫根とデンシフローラが含まれているが、それら局外品は多くて 1g 程度とエキス収量は低い、局方品は 4~9g であった。ショウマはロット間での差が大きく、低いものは 3g 程度であるが多いものは約 6.5g であった。シンイは 2.5~5g、ドクカツは 3g、ブシは 5~8g、ボクソクは 2g 程度であった。チョレイは全体的に収量が低く、多いものでも 0.5g 程度であった。

(2) 各種生薬の LC-MS 等の情報集積

1) ゴミシの LC-MS データ

保持時間約 9.8 分に観測されているピークに相当する成分は、正イオン検出による TIC クロマトグラムでは m/z 415.2112 $[M+H-H_2O]^+$ にメインピークが観測されている他、 m/z 433.2219 $[M+H]^+$, 450.2487 $[M+NH_4]^+$ にも顕著なピークが観測され、このことから、この成分は Schisandrin と推定された。また、約 10.4 分に観測されているピークに相当する成分は、正イオン検出による TIC クロマトグラムでは、 m/z 399.1805 にメインピークが観測されている他、 m/z 417.1907 $[M+H]^+$, 434.2181 $[M+NH_4]^+$, 439.1729 $[M+Na]^+$ にもピークが観測され、この成分は Gomisin A と推定された。

2) チモの LC-MS データ

今回の試料は NIB-410 の一種類を除き、残りの 15 種類は全て河北省産である。また等級についても一部を除き情報が少ないため、産地や等級による多変量解析によるクラス分けができなかった。また一部のモデル試料 (NIB-524, 525, 526, 527) において、クロマトグラム中のピーク (TIC) が小さく分裂するという現象が見られた。チモにはサポニンが多く含まれていることが知られているが、これらの分裂の原因はサポニン中の糖の異性体によるものと推定された。しかしながらその違いについて特定はできなかった。

3) サンシュユの LC-MS データ

各エキスにおいて、正負両イオン検出データ共に、PDA と TIC クロマトグラムに殆ど差異は見られなかった。PDA および TIC クロマトグラムにおいて、保持時間 6 分付近と 7 分付近に 2 本の顕著なピークが観測され、これらは観測精密質量から得られた推定組成から、それぞれ Morroniside, Loganin であると推測された。

4) サンヤクの LC-MS データ

各エキスの PDA および TIC クロマトグ

ラムにおいて、ピーク数・強度共に小さく、UV や ESI イオン化に対してシグナルレスポンスの高い成分は含まれてないことが示唆された。配糖体の特徴であるプロダクトイオンスペクトルにおける 162 Da の中性フラグメントを示した成分は一つのみであった。負イオン検出データにおいて、保持時間 9.17 分、9.47 分、9.77 分に観測された成分のプロダクトイオンスペクトルでは、それぞれ 81.9725Da, 81.9726Da, 81.9722Da の中性フラグメントの脱離が観測されており、この中性フラグメントの質量は、C, H, N, O などの元素から構成される通常の有機化合物ではあり得ない数値であり、特殊な元素によるものと考えられるが現在までのところ特定されていない。正イオン検出データにおいて、保持時間 14 分台に、プロダクトイオンスペクトルでリン脂質に特徴的な m/z 184 のフラグメントイオンを示す成分が観測された。

5) エンゴサクの LC-MS データ

正負両イオン極性で条件検討を行ったが、負イオン検出では殆どシグナルが得られなかった。各エキスにおいて、PDA クロマトグラムと TIC クロマトグラムに殆ど差異は見られなかった。PDA および TIC クロマトグラムにおいて顕著に観測されている 3 ピーク (保持時間 8.63 分、9.34 分、10.35 分) は、それぞれ Glaucine, Corydaline, Dehydro-corydaline であると推測された。

6) イレイセンの LC-MS データ

産地としては遼寧省、広西省、黒竜江省、内蒙古、東北の 5 つの産地があるが、主成分分析においては明確なグループ分けというものができなかった。TIC クロマトグラムの比較においては、広西省のみが得意なピークを 9 分付近に検出した。これはその MS クロマトグラムにより、高分子量でありかつ-162Da の違いのピークが混在していることから配糖体の混合ピークと推定さ

れた。それ以外の産地の試料間には極端に大きな差異は認められなかった。

7) キキョウの LC-MS データ

キキョウ (NIB-554) の全イオンクロマトグラム (TIC) において高い強度を示した成分を示した。また、測定データの例として、保持時間 18.69 分及び 22.39 分のピークについてのマススペクトルをそれぞれ示した。

8) タイソウの LC-MS データ

タイソウ (NIB-346) のクロマトグラムにおいて高い強度を示した成分を示した。また、測定データの例として、保持時間 13.07 分及び 21.54 分のピークについてのマススペクトルを示した。

9) コウボクの LC-MS データ

コウボク (NIB-639) の TIC を示した。これらのクロマトグラムにおいて高い強度を示した成分を示した。保持時間 8.70 分及び 9.61 分のピークについてのマススペクトルを示した。

(3) LCMS データによる多変量解析

ゴミシについて LCMS データ (negative mode) による主成分分析を行ったところ、黒竜江省産を決定づけるマーカー化合物としての候補に保持時間 10.94 分の m/z 532 および 402 のピークが考えられた。これらはフラグメントと考えられ、 m/z 531.22 は精密質量分析から $C_{28}H_{35}O_{10}$ と推定された。401 は 531 のプロダクトイオンであった。この分子式から基原植物であるチョウセンゴミシの成分として報告されているものとしては Wuweizidilactone H がある。よって、黒竜江省産のマーカー化合物は本化合物である可能性がある。

サンシュユにおける LCMS の主成分分析では PCA において、浙江省、陝西省、四川省、奈良、韓国産と比較的まとまる傾向を示した。そこで、陝西省産と浙江省産の OPLS-DA を試みたところ、信頼度は高くな

かったが、loading s-plot においては positive mode では 0.79 分付近の m/z 198 の比較的早い保持時間のものが、また negative mode でも 0.75 付近の m/z 304 のものが陝西省産のマーカー化合物と推定されたが化合物は特定できていない。

サンヤクにおける多変量解析では主成分分析において、江蘇省、河南省、福建省と比較的明確にグループ分けされていた。また河南省と江蘇省において判別分析 (positive mode) においては高い信頼度で両者が分離され、loading s-plot からは河南省を決定づけるマーカー化合物として、保持時間 0.77-1.3 分付近の m/z 153.1 のピークが推定されたが、江蘇省の試料の MS でも同保持時間に m/z 153.1 のピークは認められ、江蘇省の試料中にも含有されていると思われた。ただ MS クロマトグラム上では、含量は江蘇省の方が低い可能性があり、含量の違いによる判別結果と思われた。

(4) TLC 写真情報の集積

日局 (16 局第 2 追補) 収載の生薬について、TLC による確認試験の設定状況を Table 1 に示す。日局収載の生薬のうち、22 品目に確認試験が設定されていない他、確認試験が設定されている生薬のうち 51 品目では呈色反応等の比較的特異性の低い試験法が設定されている。なお、日局収載の漢方処方エキスにおいて TLC による確認試験が設定されている生薬については、備考欄に指標成分を示した。生薬自体と処方エキスでは、確認試験の意味合いや対象とする成分の制約等がかなり異なっているが、TLC による新たな確認試験を設定するにあたっては、処方エキスで用いられている方法を、まず参考にすることとした。また、研究協力者の所属する各社で品質管理のために用いている試験法で適切なものがあれば提案してもらい、それをもとに検討することとした。

(1) アマチャ

昨年度検討を開始したフィロズルチンとヒドランゲノールを指標とする確認試験について、ヒドランゲノールが薄い試料の取扱いを検討した。抽出溶媒にメタノールを用いると、ヒドランゲノールが薄い試料でも2つの成分の確認が可能であることから、抽出溶媒をアセトンからメタノールに変更することとした。なお、メタノールで抽出するとヒドランゲノールの上にもう一つUV吸収のあるスポットが認められるが、この3つ目のスポットは4-ヒドロキシ安息香酸であった。

【TLC条件】

ジエチルエーテル／ヘキサン／ギ酸混液(5:5:1)を展開溶媒として約7cm展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線(主波長254nm)を照射する。

(2) カロコン

α -スピナステロールを指標とし、希硫酸を噴霧して加熱後365nmの紫外線を照射して検出する新規確認試験法が提案された。ステロールを多く含むニンジン、キキョウ、バイモ、カッコン、ビャクゴウ、サンヤク、バクモンドウ、テンモンドウ、ゴシツと比較検討した結果、 α -スピナステロールはキキョウに多く含まれ、ゴシツにも若干含まれていたが、これらの生薬とは形状が異なることから、判別は可能である。研究協力者が実施したTLCデータを比較すると R_f 値が0.5付近のものと0.35付近のものがあることから、その原因も調査する必要がある。

(3) キキョウ

昨年度検討を開始したアシル基を加水分解で除いたサポニンを1,3-ナフタレンジオールによって検出する方法について、継続して検討した。この試験法でプラチコジンDの下に検出されるスポットは、ポリガラシンD₂の可能性が高いが、さらに確認す

る必要がある。追試の結果プラチコジンDの下に2つスポットが見えるものがあった。スポットの確認には標品を同時に展開する方がよいことから、TLC用標準生薬を基盤研で作る方向で1年程度かけて検討することとした。市場品は皮去りであるが、皮の部分にサポニン含量が高いことから皮付きと皮去りの両方を輪切りで乾燥して、どちらが適しているかを検討することとした。

(4) ゴオウ

日局のゴオウの確認試験にはLiebermann-Burchard反応による胆汁酸の呈色反応とビリルビンの沈殿反応が設定されているが、ビリルビンについては成分含量の規定があることから、胆汁酸(デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、コール酸)を指標にし、増量の目的で使用される可能性のある豚胆汁に対する純度試験(指標物質:ヒオデオキシコール酸)を兼ねたTLCによる新規確認試験が提案された。提案された試験法案では展開溶媒にトルエンを使っているが、トルエンを使わない溶媒系に変更するとともに、指標成分を日局に規格があるコール酸のみとし、ゴオウ自体が高価であることから試料量をより少なくできるように再検討することとした。

(5) シャゼンシ

日局の薄層クロマトグラフィー用シャゼンシの規格に用いられている試験法を準用し、標品として薄層クロマトグラフ用シャゼンシを用いることとした。追試した結果、色調がJPTIに掲載されているカラー写真と異なる例が報告されたが、加熱時間によって色調が変化する。プラントゴグアニジン酸は安定して青系統に発色するが時間によってくすんでくる。薄層クロマトグラフィー用シャゼンシを同時に展開することにし、確認スポットは R_f 値0.25付近の濃青色のスポットとすることとし、この確認試験の画像データを収集した。

【TLC 条件】

アセトン／酢酸エチル／水／酢酸（100）混液（10：10：3：1）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105℃で 10 分間加熱する。

（6）シュクシャ

昨年度の検討結果に基づいて酢酸ボルニルを標品としてスポットし、酢酸ボルニルとボルネオールのスポートを確認する試験法を設定し、その画像データを収集した。

【TLC 条件】

ヘキサン／ジエチルエーテル／メタノール混液（15：5：1）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105℃で 5 分間加熱する。

（7）タクシャ

昨年度検討を開始した試験法について、市場品を集めて検討した結果、現在流通している生薬は、アリソール B とそのモノアセテートを含むものが主流であった。以上の点をふまえ、3 つのスポートのうちのどれか 1 つを確認することにし、アリソール A、B 並びに B モノアセテートの混合物を標品としてスポットする試験法を設定し、その画像データを収集した。

また、20%酢酸を用いて 60 分間還流抽出すると、アリソール B モノアセテートはアリソール A モノアセテートへ、アリソール B はアリソール A へ変化することが報告された。別途検討が進んでいる処方中のタクシャの確認試験ではアリソール A を確認することとなっていることから、この結果は処方での確認試験に応用可能である。

【TLC 条件】

酢酸エチル／ヘキサン／酢酸混液（10：10：3）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を均等に噴霧し、

105℃で 5 分間加熱する。

（8）チンピ

ミカン科植物の果皮を基原とする代表的生薬にはチンピの他にトウヒなどがある。ミカン科を基原とする日局収載生薬について検討した結果、チンピに特有と思われる青色蛍光を持つ 3 つのスポートを見出し、シネンセチン、ノビレチン、3,3',4',5,6,7,8-ヘプタメトキシフラボンと同定した。これらの化合物を確認するための TLC 分析条件を設定し、基盤研提供のチンピ 18 サンプルについて分析した結果が報告された。この分析法を追試した結果、*Citrus reticulata* 基原のもので主要 3 つのスポート以外にもスポートがでるサンプルがあることが報告された。市場品は *C. unshiu* がほとんどであるので *C. reticulata* 基原のものを採るのは難しいが、遺伝子鑑別で *C. unshiu* と *C. reticulata* の区別は可能であることから、鑑別済みの *C. reticulata* を分析して、明瞭な 3 つのスポートのみが認められるかをチェックすることとした。

（9）バクモンドウ

生薬品質集談会での検討結果を基にした方法が提案された。この方法だとヤブラン類（*Liriope*）を基原とするものが区別できる。また、麦門冬エキスのバクモンドウの確認試験に用いられている、イヌリン様粘液多糖類を検出する方法の提案があった。この 2 つの方法を追試した結果、麦門冬湯エキスの確認試験をもとにしたイヌリン様粘液質多糖類を検出する方法では和光純薬の既存 TLC プレートではスポートが確認出来なかったが、新製品の試作品では Merck 社プレートに近いパターンを示すことが報告された。糖類と思われるスポートが大きく出ているため、抽出溶媒を 1-ブタノールからエーテルなどに変えるなど更なる条件検討が必要である。

（10）ハッカ

昨年度の検討結果を基に、メントールを同時に展開し、検出試薬に 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液を用いる確認試験法を設定し、その画像データを収集した。

【TLC 条件】

ヘキサン／アセトン混液（7：3）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を十分に風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液を均等に噴霧し、105℃で 5 分間加熱する。

（11）ボウフウ

ボウフウに特異的な成分と考えられる 4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノールを確認する試験法が提案されたが、1'-*O*-グルコシルシミフギンとの分離が十分ではなかった。1'-*O*-グルコシルシミフギンの方が含量が多いが、こちらはボウフウに特異的ではない。展開溶媒を酢酸エチルからギ酸エチルに変更し、2-ブタノンの割合を増やしてギ酸エチル/2-ブタノン/ギ酸/水混液（20：5：5：1）にすることにより分離は改善された。この試験法案では、指標成分の 4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノールとその下のスポットである 1'-*O*-グルコシルシミフギンが、スポット量を増やすあるいは濃度を濃くすることにより分離しなくなる可能性があることから、試料濃度についてさらに検討することとした。

（12）モクツウ

3,4-ジヒドロキシフェネチルアルコールグルコシドを指標とした新規試験法が提案された。この指標成分は他のアケビ科植物からも報告があり、特異性が劣り、多くのスポットの中の一つのスポットなので標品を同時に展開する必要がある。形態が類似するアオツヅラフジやムベとの区別が可能か比較検討し、よりよい条件を探すこととした。

（13）モッコウ

昨年度の検討を基に、デヒドロコスツスラク톤を指標成分とする確認試験法を設定し、その画像データを収集した。デヒドロコスツスラク톤の発色には希硫酸を採用し、スポットの表現を「 R_f 値 0.5 付近に赤紫色のスポットを認め、その直下に灰青色～灰褐色のスポットを認める」とすることとした。

【TLC 条件】

ヘキサン／アセトン混液（7：3）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに希硫酸を均等に噴霧し、105℃で 5 分間加熱後、放冷する。

（14）レンギョウ

レンギョウに特異的な成分と考えられるレンギョールを指標成分とする試験法が提案された。追試の結果問題なく実施できたことから、レンギョールを指標成分とする確認試験法を設定し、その画像データを収集した。

【TLC 条件】

酢酸エチル／メタノール／水混液（20：3：1）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105℃で 5 分間加熱する。

（5）HPTLC による国内流通生薬の成分比較

1）各生薬の HPTLC 分析

各生薬国内流通サンプルについて、それぞれ試料溶液を調製し、研究方法に記した方法で HPTLC 分析を行った。試料溶液のスポットには、ばらつきをなくす目的で TLC サンプルアプリケーションを用い、TLC 画像の撮影には専用機である TLC ビジュアライザーを用いた。各生薬の結果を以下に記す。

サイシン：局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで、本研究班平成 25 年度報告書に記載の方法に準じて

HPTLC 分析を行った。サイシンの国内市场品 18 試料について、紫外線照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液噴霧後、加熱により検出した結果、数個の共通スポットと共に標準品 asarinin の褐色スポットが確認された。

チョウトウコウ: 局方に TLC による確認試験法が収載されていないので、同様に報告書記載の方法に準じて HPTLC 分析を行った。チョウトウコウの国内市场品 18 試料について、紫外線照射 (254 nm) により検出した結果、標準品 hirstine 及び rhynchophlline のいずれのスポットも確認された。

モクツウ: 局方に TLC による確認試験法が収載されていないため、同様に報告書記載の方法に準じて HPTLC 分析を行った。モクツウの国内市场品 16 試料について、紫外線照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液噴霧によりスポットを確認した結果、サポニン由来と思われる多くのスポットが観察された。

サンヤク: 局方に TLC による確認試験法が収載されていないため、同様に報告書記載の方法に準じて HPTLC 分析を行った。サンヤクの国内市场品 7 試料について、紫外線照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液噴霧後、加熱により検出した結果、すべての試料に標準品 allantoin の赤色スポットが確認された。

チモ: 局方に TLC による確認試験法が収載されていないため、同様に報告書記載の方法に準じて HPTLC 分析を行った。チモの国内市场品 16 試料について、紫外線照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液噴霧後、加熱により検出した結果、数個のスポットとともに標準品 sarsasapogenin の紫色のスポットがすべての試料において確認された。

オンジ: 局方に TLC による確認試験法が収載されていない。そこで分析条件を検討し、国内市场品 9 試料について HPTLC 分析した。検討の結果、紫外線照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液噴霧後、加熱により検出するこ

とで、多くのスポットが観察された。R_f 値 0.5 付近のスポットを分取し、NMR 等により構造解析した結果、フェニルプロパノイド配糖体 β -D-(3-*O*-sinapoyl)-fructofranyloside と同定した。

キキョウ: 局方に TLC による確認試験法が収載されていないため、同様に報告書記載の方法に準じて HPTLC 分析を行った。キキョウの国内市场品 18 試料について、希硫酸試液噴霧後、加熱により検出した結果、すべての試料に多数スポットが観察された。そのうちの1スポットが標準品 platycodin D の褐色のスポットと一致して観察された。

エンゴサク: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。エンゴサクの国内市场品 15 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射、次いでドラージェンドルフ試液噴霧後、亜硝酸ナトリウム試液を噴霧により検出した。その結果、すべての試料に標準品 dehydro- corydaline の明瞭なスポットが観察された。

カンキョウ: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。カンキョウの国内市场品 17 試料について、試料溶液 1 については 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧後、加熱により検出した。その結果、多数のスポットが観察され、そのうちの1つが標準品 [6]-shogaol のスポットと一致し、すべての試料に観察された。一方、試料溶液 2 については、1,3-ナフタレンジオール試液噴霧後、加熱により検出した。その結果、R_f 値 0.5 付近に 2 つのスポットが認められた。
コウジン: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。コウジンの国内市场品 12 試料について、バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後、加熱により検出した。その結果、

多くのスポットが検出され、そのうちのひとつが標準品 ginsenoside Rg₁ のスポットと一致した。

シンイ: 局方に TLC による確認試験法が収載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。シンイの国内市場品 19 試料について、紫外線 (254, 366 nm) 照射、次いでドラージェンドルフ試液噴霧により検出した。その結果、すべての試料に標準品 magnoflorine の橙色スポットが観察された。

【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

今回の 10 市場品中、6 市場品のみ ITS の全領域 (NIB-836, 837, 839, 843) または上流から 559 bp の領域 (NIB-840, 844) の塩基配列を決定できた。ITS 領域の塩基配列は、ITS1 領域が 216 bp, 5.8S rRNA 遺伝子領域が 162 bp, ITS2 領域が 221 bp であった。NIB-836, 839 は DQ278168 の配列と相同であり、NIB-837, 840, 843, 844 はこれに類似するが各々 1 箇所 (K₁₇₉, Y₃₅₂, Y₅₈₈, S₄₁₉) にヘテロ塩基が認められた。対照にした *N. incisum* 由来の四川省理県産羌活 (TMPW No. 28401) は EU236180 の配列と相同であった。

以上により、解析できた市場品はすべて *N. incisum* であると同定した。

(2) ケイガイ

ケイガイ 10 市場品の内、NIB-853 以外の 9 市場品で ITS の全領域またはほぼ全領域 (NIB-860) の塩基配列を決定できた。ITS 領域の塩基配列は、ITS1 領域が 232 bp, 5.8S rRNA 遺伝子領域が 163 bp, ITS2 領域が 228 bp であった。

9 市場品の ITS 配列はすべて同じで、INSDB に登録されている *S. tenuifolia* の 4 検体の配列 (AB557591, JN802670, EU383034, KM051459) と相同であった。

以上により、解析できた市場品はすべて *S. tenuifolia* であると同定した。

(3) イレイセン

イレイセン 15 市場品から得た 15 検体について全 DNA を抽出し、ITS 領域について PCR 法による増幅を行った結果、3 検体 (NIB-0757, NIB-0758, NIB-1126) のみ増幅断片が得られた。塩基配列を解析した結果、*C. mandshurica* の配列と相同性を認めた。18S, ITS1, 5.8S, ITS2 の領域は AB775147 と比較して決定した。すなわち、ITS1 領域は 172 bp, 5.8S rRNA 遺伝子領域は 159 bp, ITS2 領域は 220 bp であった。*C. mandshurica* と同属他種を鑑別し得る種特異的な塩基は ITS1 領域における 74 番目から 80 番目の配列 ACGGGTC である。また 143-144 番目が AA、150-151 番目が GC、159 番目が A であることから支持された。

(4) カンキョウ

TrnL intron 領域の部分配列は、全 17 検体中、7 検体 (RgKw-6, 9, 10, 13-15, 17) で塩基配列を決定出来た。全ての配列が一致し、全長は、496 bp であった。この配列について、Blast Search Program による相同性検索を行ったところ、国際塩基配列データベース (INSDB) 上の *Z. officinale* の配列 3 種と一塩基を除き、一致した。

一方、*trnL*-F IGS 領域は、12 検体 (RgKw-1, 3, 6, 9-17) で塩基配列を決定出来た。本領域についても、全検体中において、同一の塩基配列を示し、全長は、328 bp であった。相同性検索の結果、データベース上の *Z. officinale* の配列 5 種と完全に一致した。また、上記の配列は、いずれも本研究班で既に塩基配列解析が終了しているショウキョウ由来の配列と一致した。

(5) キクカ

医薬基盤研究所より提供を受けたデータベース用の試料 12 検体について、INSDB の登録数が最も多かった ITS 配列の内、ITS1

領域を解析した。ただし、KiKw-5, 7 は、3 個体を試験に供したが、PCR 産物が得られたのは、1 個体のみであった。解析可能だった 22 個体より、13 個の遺伝子型が見出され、その全長は、いずれも 255 bp であった。変異は、13 箇所で見られ、そのすべてが、いずれかの遺伝子型で塩基の重複を示す部位であった。最も多くの個体が帰属された遺伝子型は、genotype 3 の 5 個体であり、この遺伝子型を持つものは、いずれもキク由来の試料であった。同一ロット内の 2 個体で、同じ遺伝子型を示したものは、KiKw-2, 8, 10 の 3 検体であった。Blast search program による相同性検索の結果、いずれの遺伝子型も、データベース上の *C. vestitum*, *C. rhombifolium*, *C. lavandulifolium*, *C. indicum*, *C. morifolium* などの配列と非常に高い相同性を示した。登録配列数が膨大なため、全てを確認することは不可能だったが、確認した限りにおいては、塩基の重複が見られた部位を除き、一致する配列であった。

(6) キジツ

キジツモデル試料 21 試料、43 検体について ITS1 領域の塩基配列情報を取得した。ダイレクトシーケンスの結果のうち、基原植物の鑑別に肝要と考えられる塩基についてまとめた。塩基番号は Yamaji らの報告に従い、*C. hassaku*, *C. natsudaikai*, *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. unshiu*, *C. reticulata* の鑑別に肝要な変異点のみ抽出した。なお、これらの変異点のみでは、植物種を一意的に特定することはできず、例えば *C. aurantium* と *C. neoaurantium* を区別することはできない。

これらの変異点について、Yamaji らの報告する ITS 領域の変異点情報と比較し、これらが一致したものについて、基原植物種の判定結果を“judge”の欄に記した。

その結果、国内の四国産の試料のうち、

PCR 増幅産物が得られたものは *C. hassaku* を基原とするものが多く、中国浙江省産の試料は *C. aurantium* を基原とするものが多数であることが明らかになった。

NIB-0813 (2 検体)、0814 (2 検体)、827 (2 検体)、829 (1 検体)、833 (2 検体) の 5 試料、9 検体については、Yamaji らの分類表において一致する配列型がなかったが、いずれも *C. natsudaikai*, *C. aurantium* と高度に近縁な配列型を有することが確認された。なお、NIB-0817, NIB-0821 については今回適用したゲノム DNA 調製および PCR の手法では、増幅産物を得ることができなかった。

(7) エンゴサク

エンゴサクモデル試料各検体より DNeasy Plant Mini Kit を用い調製したゲノム DNA を鋳型として KOD-plus により *trnL*-intron 領域の増幅及び塩基配列の解析を行った。その結果、*trnL*-intron 領域の塩基配列は、いずれの生薬検体についても同一であり、これらは北海道研究部の *Corydalis turtschaninovii* (エンゴサク、中国) 由来のものと同一であった。すなわち、今回供試したエンゴサクモデル試料は、いずれも *Corydalis turtschaninovii* を基原とするものであることが確認された。

【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】

(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

H25 年度に HiSeq2000 (Paired-End 100bp) で取得した FASTAQ データの RNA サンプル情報をまとめた。医薬基盤研究所から提供された RNA サンプルは HiSeq1500 Rapid mode (Paired-End 100bp) で FASTAQ データを取得した。

RNA-Seq 解析の解析フローは、同一植物

頃、配列アッセンブルを市販の CLC Genomics Workbench のソフトを用いて行った。得られた contig 配列に対して、BLASTX 検索 (vs. NCBI nr, e-5, Best20) 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) に逐次、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 RNA-Seq 解析の全データ及び FASTAQ データを提出した。

(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

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、これまでに多種の植物の多様な組織、器官の EST、トランスクリプトーム情報が収集されてきているが、これらの情報を活用するためのメタ解析の方向性について、議論した。

その結果、植物の生産する化合物をトリテルペン、フラボノイド等の基本骨格別に分類し、それらの生合成酵素遺伝子群の塩基配列情報、発現情報等を植物種間等で比較解析する手法が考えられ、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するため打ち合わせを実施し、3 種類の RNA-Seq データ (FASTQ ファイル) を提供した。繰り返しの RNA-Seq 分析データも必要であることから、今年度、再分析を計画した。

クズ、クララに関しては、千葉大学にてアルカロイド・フラボノイド生合成経路に注目して、インフォマティクス解析を担当した。さらに、シソに関しては、理研メタボローム情報研究チームがトリテルペン、

フラボノイド生合成経路に注目して、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

昨年度の実績報告したゲノム解析対象植物種を検討する上で基盤情報となる、ゲノムサイズ及び染色体の倍数性の指標となる C-value 解析結果から、ケイヒは同属植物の *Cinnamomum camphora* の C-value が小さいことが明らかになったが、この結果を検証する目的で、今年度は、フローサイトメーターでゲノムサイズの測定する事を決定した。ゲノムサイズの知られているシロイヌナズナを中心として、パセリ、クララ、ヒロハクララ、シナニッケイ、ミシマサイコ (圃場)、ミシマサイコ (in vitro 培養物)、トウキ、センキュウ、オタネニンジン、シナマオウなどの 8 種類の重要薬用植物含む計 11 種類の新鮮葉についてフローサイトメーターによるゲノムサイズを測定した。

「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に示した。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) を計画している。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。ゲノム解析は、かずさ DNA 研究所のゲノム解析グループが担当予定である。

(4) 新規 RNA-Seq 分析 (Paired-End 100bp) の取得

今年度、昨年度に引き続き、多くの薬用植物を中心として、新規 RNA-Seq 分析を HiSeq1500 Rapid mode (Paired-End 100bp) の取得する計画を立てた。千葉大学、大阪大学、医薬基盤研究所から提供された計 26 植物種 121 サンプル由来の RNA-Seq 分析を行い、既に、一部のデータ取得が完了した。

ケシ由来の RNA サンプルのみ、直接 RNA サンプルが提供され、その他は植物材料がかずさ DNA 研究所に提供され、かずさ DNA 研究所で RNA サンプルの抽出を行った。現在、RNA-Seq 分析 (Hiseq1500 の Paired-End 100bp) で FASTAQ データを取得中である。一部の植物材料は、医薬基盤研究所から提供され、千葉大学にて、RNA サンプルの抽出を行った。現在、RNA-Seq 分析 (Hiseq1500 の Paired-End 100bp) で FASTAQ データする計画である。

【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】

(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

最優先のデータ取得必須の第 1 コア生薬 5 品目 (甘草、生姜、人参、蒼朮、黄芩) については、少なくとも基原植物 1 種についての文献情報の入力と公開が完了し、計 20 件の情報を収載した。第 1 コア生薬で文献情報が未取得なのは、蒼朮の基原植物 *Atractylodes chinensis* Koidzumi である。

優先のデータ取得必須の第 2 コア生薬 15 品目 (茯苓、芍薬、桂皮、当帰、柴胡、川芎、地黄、麻黄、山梔子、大黄、白朮、牛膝、車前子、黄连、蘇葉) については、菌類生薬である茯苓を除き、少なくとも基原植物 1 種についての文献情報の入力と公開が完了し、計 32 件の情報を収載した。第 2 コア生薬基原植物 (高等植物) で文献情報が未取得なのは、黄连の基原植物である *Coptis japonica* Makino var. *japonica* Satake (キクバオウレン)、*C. japonica* Makino var. *major* Satake (コセリバオウレン)、*C. deltoidea* CY.Cheng et Hsiao (ガレン)、大黃の基原植物である *Rheum tanguticum* Maximowicz, *R. officinale* Baillon, *R. coreanum* Nakai (チョウセンダイオウ)、当帰の基原植物である *Angelica acutiloba*

(Siebold et Zucc.) Kitag. var. *sugiyamae* Hikino (ホッカイトウキ)、麻黄の基原植物である *Ephedra sinica* Stapf (シナマオウ)、*E. equisetina* Bunge (コダチマオウ) の計 8 植物種である。

続いてデータ取得を行う第 1 優先生薬 25 品目 (牡丹皮、桃仁、黄耆、細辛、防風、半夏、大棗、五味子、沢瀉、麦門冬、釣藤鉤、山茱萸、遠志、呉茱萸、杏仁、知母、葛根、桔梗、山薬、防己、山椒、黄柏、陳皮、厚朴、木通) については、16 生薬 (牡丹皮、黄耆、防風、半夏、沢瀉、麦門冬、釣藤鉤、遠志、杏仁、葛根、山薬、山椒、黄柏、陳皮、厚朴、木通) の、少なくとも基原植物 1 種についての文献情報の入力と公開が完了し、計 19 件の情報を収載した。第 1 優先生薬基原植物 (高等植物) で文献情報が未取得なのは、桃仁、細辛、大棗、五味子、山茱萸、呉茱萸、知母、桔梗、防己の 9 生薬の基原植物である。

さらにデータ取得を行う第 2 優先生薬 30 品目 (阿膠、荊芥、乾姜、附子、紅参、辛夷、芒硝、石膏、竜骨、牡蛎、猪苓、滑石、粳米、枳実、麦芽、竜眼肉、樸椒、麻子仁、独活、威靈仙、酸棗仁、白芷、薄荷、升麻、竜胆、羌活、天麻、木香、連翹、菊花) については、動物生薬 3 品目 (阿膠、竜骨、牡蛎)、鉱物生薬 3 品目 (芒硝、石膏、滑石)、菌類生薬の猪苓、第 1 コア生薬と基原植物が同一の 2 品目 (乾姜、紅参) を除く 21 品目のうち、12 品目 (附子、粳米、枳実、樸椒、麻子仁、独活、酸棗仁、薄荷、天麻、木香、連翹、菊花) の、少なくとも基原植物 1 種についての文献情報の入力と公開が完了し、計 15 件の情報を収載した。第 2 優先生薬基原植物 (高等植物) で文献情報が未取得なのは、荊芥、辛夷、麦芽、竜眼肉、威靈仙、白芷、升麻、竜胆、羌活の 9 生薬の基原植物である。

以上、「薬用植物総合情報データベース」

に収載する漢方薬原料生薬 75 品目のうち、動物生薬 3 品目、鉱物生薬 3 品目、菌類生薬 2 品目、基原植物が重複する生薬 2 品目を除く生薬 64 品目のうち、47 品目についての文献情報整備が完了した (73.4%)。

(2) オリジナルデータ取得のための、植物組織培養物の育成と資源化

薬用植物総合情報データベース」に収載する漢方薬原料生薬 (75 品目) の基原植物 (高等植物由来 64 生薬 : 101 植物種) について、オリジナルデータ取得状況 (○ : ほぼ完了、△ : 取得中) 及びオリジナルデータは取得していないが、継代培養による維持保存中で資源化が可能な培養物がある植物種 (△/○) の状況をに示した。対象生薬 19 品目の基原植物 24 種のオリジナルデータ取得がほぼ完了し、以前から継代培養中の薬用植物も含め、対象生薬 23 品目の基原植物 28 種の資源化が完了した (23/64 : 35.9%)。

特に第 1 コア生薬基原植物は全ての生薬について少なくとも 1 種の薬用植物の資源化が完了し、第 2 コア生薬の基原植物は、桂皮、芍薬を除く全ての生薬の少なくとも 1 種の薬用植物の資源化が完了した (第 1 コア生薬 + 第 2 コア生薬 : 17/19 : 89.5%)。

以上、高等植物由来の生薬 64 品目のうち、50 品目について、少なくとも 1 基原植物についての文献情報あるいはオリジナルデータ取得を完了した (78.1%)。

スペインカンゾウの生存率は、北農試 No.2711 および富山大系 No.12851 とともに、ゼアチン濃度に関係なく 80-100% と高かった。両系統ともホルモンフリー区における再生率、生育が最も良好となったが、それぞれの再生率は、北農試では 83.3%、富山大系では 60.2% であり、北農試の方が高い値を示した。株数は、系統、ゼアチン濃度に関係なく 1.0-1.3 本であった。

ナイモウオウギは、ホルモンフリー区ま

たはゼアチン 0.5mg/L 区で生存率、再生率がそれぞれ、100%、90% 以上と高かった。株数はホルモンフリー区で 3 本と最も多く、草丈はゼアチン濃度上昇にしたがって伸長する傾向が認められた。

キバナオウギについては、コンタミが多く、実験できなかった。

以上の結果から、スペインカンゾウでは北農試 No.2711、富山大系 No.12851 とともに増殖、植物体伸長ともホルモンフリーが適し、ナイモウオウギは増殖にはホルモンフリー、植物体伸長にはゼアチン 0.5mg/L 添加が適していると考えられる。

牛膝の基原植物 *Achyranthes bidentata* の節切片は、0.1 mg L⁻¹ NAA + 10.0 mg L⁻¹ 4-CPPU 区を除く全ての試験区においてシュートを形成した。NAA + Kinetin 区、NAA + Zeatin 区における切片当たりのシュート形成数はそれぞれ、2.5~3.0 本、2.4~12.4 本で、最大シュート形成数は 0.1 mg L⁻¹ NAA + 3.0 mg L⁻¹ Kinetin 区の 3.0 本、0.1 mg L⁻¹ NAA + 10.0 mg L⁻¹ Zeatin 区の 12.4 本であった。NAA + Kinetin 区、NAA + Zeatin 区では、シュートはよく伸長するが、シュート数が少ない傾向であった。一方、NAA + 4-CPPU 区、NAA + BA 区における切片当たりのシュート形成数はそれぞれ 0~16.2 本、11.5~21.0 本で、最大シート形成数は 0.1 mg L⁻¹ NAA + 0.1mg L⁻¹ 4-CPPU 区の 16.2 本、0.1 mg L⁻¹ NAA + 3.0 mg L⁻¹ BA 区の 21.0 本とシュート形成数が多かった。これらのサイトカイニンは、シュートを多く形成するが、NAA + Kinetin 区、NAA + Zeatin 区ほど伸長しなかった。さらに、NAA + TDZ 区におけるシュートは、他の 4 種類のサイトカイニンと NAA との組合せ添加区に比べて短い。切片当たりのシュート形成数は 15.2~36.6 本と極めて多く、0.1 mg L⁻¹ NAA + 1.0 mg L⁻¹ TDZ 区では最多となる 36.6 本が得られた。

A. bidentata と同様に、牛膝の基原植物 *A. fauriei* の節を含む茎切片は、 0.1 mg L^{-1} NAA + 10.0 mg L^{-1} 4-CPPU 区を除く全ての試験区において節切片からシュートが形成された。各サイトカイニンによるシュート形成はヒナタイノコズチとほぼ同様の傾向があり、切片当たりのシュート形成数は、5 種類のサイトカイニンの中で TDZ が最も多く、NAA + TDZ 区で 11.8~34.2 本で、 0.1 mg L^{-1} NAA + 3.0 mg L^{-1} TDZ 区では最多となる 34.2 本のシュートが得られた。

牛膝の基原植物の多芽体形成を考えると NAA + TDZ 区が適しており、*A. bidentata* の節を含む茎切片では 0.1 mg L^{-1} NAA + 1.0 mg L^{-1} TDZ 区、*A. fauriei* の節を含む茎切片では 0.1 mg L^{-1} NAA + 3.0 mg L^{-1} TDZ 区が至適濃度であった。

山梔子の基原植物 *G. jasminoides* の無菌培養植物体の頂芽をホルモンフリー区で 8 週間培養後に観察を行った結果、草丈は 1.3 cm、節数は 5.1 節であった。一方、GA₃ を添加した区の節数は 4.7-5.2 節で、節数に差は認められなかったが、節間が伸長し、草丈が有意に高くなった。その中でも 10.0, 20.0, 50.0 mg L⁻¹ GA₃ 区では、草丈がそれぞれ 5.8, 5.9, 5.5 cm と、無添加区より 4.23 ~4.54 倍高い結果となった。その内、50.0 mg L⁻¹ GA₃ 区は、草丈の伸長にバラつきが大きく、安定的に材料を確保できないため、節間伸長には不適であると判断した。また、5.0, 10.0 mg L⁻¹ GA₃ 区では、80 % のシュートが正常に成育したが、20.0 mg L⁻¹ GA₃ 区では、頂芽が枯死する個体が生じ、50 % に低下した。

以上の結果から、山梔子の基原植物 *G. jasminoides* の節間伸長に至適な GA₃ 濃度は、節間伸長に優れ、かつ正常成育率の高い、 10.0 mg L^{-1} GA₃ 区であることが明らかになった。

【植物体栽培及び効率的生産法に関する研究】

（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

生薬「黄耆」では、ロット間における無機成分組成の差異は小さく、他の生薬と比較するとニッケル (Ni) が 0.58~1.15ppm、バナジウム (V) が 2.46~3.07ppm の範囲で特異的に含まれていた。

生薬「葛根」では、無機成分の組成の差異はロット間で少なく、他の生薬と比較するとスズ (Sn) が 1.90~2.60ppm の範囲で特異的に含まれていた。

生薬「沢瀉」では、ロット間で比較すると NIB-0366, 0368, 0369 および 0400 において鉄 (Fe) が 1045~1204ppm、アルミニウム (Al) が 218~294ppm 含まれ、他ロットの 10~100 倍の含量であった。カドミウム (Cd) が 0.41~1.61ppm の範囲で僅かに検出された試料もあった。

生薬「釣藤鈎」および「麦門冬」では、それぞれ無機成分の組成の差異はロット間で少なかった。測定した釣藤鈎の多くは、スズ (Sn) が 1.89~2.77ppm の範囲で特異的に含まれていた。

（２）薬用植物の病害虫の調査

カノコソウに発生した病害は葉の黄化、花茎の褐変を生じ、被害が著しい株は枯れ上がる症状の発生を確認した。症状を示す株を圃場から抜き取り塊茎を切断すると塊茎断面に褐変した箇所がみられ、培地に置床した花茎断面からは糸状菌菌糸の伸長を確認した。これらの症状はこれまでに報告されているカノコソウ半身萎凋病の症状に類似していた。トウキに発生した病害は地上部に黄化、萎凋症状が生じ、地際付近の茎、根は腐敗し次第に枯れ上がる株が発生した。これらの症状はこれまでに報告されている *Fusarium solani* による根、基部の腐敗症状に類似していた。

(3) 7年間低温貯蔵した種子の発芽率

1. 高発芽率の種子

エーゼレス+シリカゲル及びエーゼレス単独使用により発芽率が高かった種子は、カワラケツメイ、ゲットウ、アサガオ、ゴマ、タイワンツナソ、ニシインドコキュウリ、ハトムギ、キビ、ナガササゲ、トカドヘチマ、ケンポナシの 11 種類であった。エーゼレス+シリカゲル使用で発芽率が高かった種子は、ミツバ、アオジソ、オオイタビ、オオハマギキョウ、コロシントウリ、ゴマクサ、ウツボグサ、ボタンボウフウの 8 種類であった。エーゼレス単独使用で発芽率が高かった種子は、エビスグサモドキ、クロタラリア、ゴジカ、クララの 4 種類であった。以上のうち、カワラケツメイ、ミツバ、アサガオ、タイワンツナソ、ニシインドコキュウリの発芽率が 100%であった。

2. 低発芽率の種子

エーゼレス単独使用に低発芽率種子が多く見られ、ミツバ、アオジソ、オオイタビ、オオハマギキョウ、ゴマクサ、ウツボグサ、ボタンボウフウの発芽は皆無であった。エーゼレス+シリカゲル使用では、エビスグサモドキ、クロタラリア、クララのマメ科植物とゴジカの発芽率が低かった。リュウキュウマメガキはいずれの処理ともに発芽しなかった。

3. 発芽率が上昇した種子

シロバナヨウシュチョウセンアサガオ、ゴジカ、ケンポナシ、サキシマフヨウ及びクララの発芽率が顕著に上昇した。しかしながら、これら種子の貯蔵前の発芽率は極めて低く、休眠状態であったと思われる。

【絶滅危惧薬用植物情報に関する研究】

1) ミシマサイコの標本確認調査において、1930 年代から 1950 年代にかけて阿蘇地域で多くの個体が採取されていること、しかし、その後の採取記録が少なく、1993 年の

記録を最後に近年の採取記録がないことが明らかになった。

2) キキョウの標本確認調査において、熊本県内におけるキキョウの分布地が限られていることに加えて、近年の採取記録が無いことが明らかになった。

3) 宮崎県産ミシマサイコの野生株から採取した種子を計測し、長さ 4.3mm 幅 1.7mm の大型種子の A ランク、長さ 3.4mm 幅 1.1mm の中型種子の B ランク、長さ 2.6mm 幅 1.0mm の小型種子の C ランク、長さ 3.3mm 幅 0.6mm の未熟種子の D ランクの 4 ランクに区分できることが明らかになった。

4) 宮崎県産ミシマサイコの野生株種子の発芽率は C ランクが 36.7%と最も高く、続いて B ランクの 28.3%、A ランクの 21.7%、D ランクの 11.7%となっていた。C ランクは発芽開始日、盛期、終了日が最も早く、発芽時期が全体的にまとまっていた。

5) 宮崎県産ミシマサイコの野生株種子の平均草丈は 12 月 15 日の時点で C ランクが最も大きく 18.5cm、続いて大きい順に A ランクの 16.8cm、B ランクの 14.6cm、D ランクの 10.5cm であった。

6) 福岡県北九州市産のミシマサイコの地上部を調査した結果、草丈が 108.0cm、葉幅が 1.9cm と広く、葉質が厚く、葉色が黄色い緑で光沢があり、全体的に大型になるキュウシュウサイコ (*Bupleurum scorzonrifolium* Willd. var. *stenophyllum* Nak.) タイプ、それに対して、草丈 62.0cm と低く、葉幅が 1.1cm と狭く、葉質は普通で、葉色がやや濃い緑で光沢がほとんど無く、全体的に小型になるものをミシマサイコ (*Bupleurum scorzonrifolium* Willd. var. *stenophyllum* Nak. f. *kiusianum* (Kitag.) Kitag) タイプ、さらに、草丈 99.3cm、葉幅が 1.7cm、葉質は厚く、葉色がやや黄色い緑でやや光沢があり、全体的に中型になるものを中間タイプ、計 3 タイプに区分された。

7) 福岡県北九州市産のキキョウの地上部と地下部を調査した結果、草丈 0.8m、茎径 3.1mm、茎数 1 本、果実個数 2.0 個、根長 15.0cm、根幅 1.8cm の中型タイプと、草丈 1.2m、茎径 5.7mm、茎数 2 本、果実個数 7.5 個、根長 17.5cm、最大根幅 2.6cm の大型タイプの 2 タイプに区分された。

【内部及び外部形態情報に関する研究】

(1) 粉末生薬の観察方法

1. ニンジン末とコウジン末

文献記載の内容に一致した。両者の違いは、でんぷんの糊化の状態にあるといえるが、ニンジン末でも部分的に糊化していることがわかった。局方では、ときに糊化したでんぷんを・・・との表現になっている。

2. キキョウ末

師管の破片との表現があるが、実際に粉末を観察したところ、容易に師管と断定できる破片は確認できなかった。師管の存在は明らかであるが、粉末での確認となると何か工夫が必要と考えられた。なお、特徴である乳管の破片は容易に確認できた。

3. オウレン末

でんぷん粒が観察されることになっているが、全体が黄色となり、また径が小さいためか、確認が困難なサンプルが多いように感じられた。円から多角形を呈する石細胞とコルク組織は、共通して容易に確認できた。茎あるいは葉由来と思われる表皮細胞は、NIB-013, NIB-150 で確認できた。

4. オウバク末

特徴的な組織である結晶細胞列および特殊な形の異形細胞を伴う石細胞はすべてのサンプルで容易に確認できた。NIB-254, NIB-655, NIB-658 では、希ではあるがコルク層らしきものが確認できた。本来、周皮を取り除くことになっているが、処理が不十分だったとも考えられる。確認のため、全形生薬の切片を作成して観察する必要がある。

ある。

(2) 麦門冬、防風、撲櫟の生薬の性状

1. 麦門冬

内部形態 本本品の横切片を鏡検するとき、外側から表皮、根被、外皮、皮層柔組織、内皮、木部、師部、髓が認められる。表皮は NIB-384, 386, 389, 418 に確認することができた。根被細胞の外縁部は細胞が崩れているが、表皮が存在する場合、その部分は根被細胞の崩壊はみられなかった。根被細胞は複数の層からなっており、根被細胞の径 $24.4 \sim 134.4 \mu\text{m} \times 8.6 \sim 41 \mu\text{m}$ 、各ロットの平均値でみると $58.7 \sim 68 \times 20.4 \sim 25.8 \mu\text{m}$ であった。外皮は 1 層で長方形をしている。外皮細胞の径は $28.2 \sim 163.8 \mu\text{m} \times 15.5 \sim 57.7 \mu\text{m}$ 、各ロットの平均値でみると、 $65.5 \sim 84.6 \mu\text{m} \times 28.6 \sim 34.9 \mu\text{m}$ で、NIB-393 の外皮細胞が比較的に小さい。皮層柔組織は厚い層で中心柱から放射状に広がっており、層の中心部の細胞が大きい。皮部柔細胞の径は $69.5 \sim 335.8 \mu\text{m} \times 34.1 \sim 169.7 \mu\text{m}$ 、各ロットの平均値でみると、 $152.5 \sim 200.9 \mu\text{m} \times 77.9 \sim 109 \mu\text{m}$ で、楕円形をしていることが分かった。NIB-389 の皮層柔細胞が比較的に小さい。内皮は 1 層で細胞壁は厚く、多角形の構造をとっている。内皮細胞の径は $15 \sim 44.5 \mu\text{m} \times 12.6 \sim 43 \mu\text{m}$ 、各ロットの平均値でみると、 $23.1 \sim 27.4 \mu\text{m} \times 20.6 \sim 26 \mu\text{m}$ で、NIB-393 の内皮細胞が小さい。木部は縁が波打った円形で、突出部が原生木部となっている。原生木部の数は $13 \sim 23$ とばらつきが多く、平均すると 1 つのサンプルに 18 の原生木部があることになる。原生木部の間に師部が観察される。したがって原生木部の数と師部の数は一致する。道管は多くがらせん紋道管で一部階紋道管が見られた。また双方が途中で切り替わっている道管も存在した。道管の径は $16.6 \sim 53.9 \mu\text{m}$ で、HYCP-84 の径が最小値と最大値になっている。髓の柔細胞の

径は、20.8～86.6 μm ×14.1～69.6 μm 、各ロットの平均値でみると、32～46.2 μm ×23.6～33.5 μm で、球状に近いことが分かった。外皮細胞には油滴が存在する。確認できた油滴は球状のものと、楕円状に広がっているものがあった。各ロットのすべてのサンプル内に油滴が確認できたのは、HYCP-82, 84だった。シュウ酸カルシウムの結晶は針状晶と柱状晶の2種ある。麦門冬のシュウ酸カルシウムの結晶は皮層全体に分布している。すべてのサンプルに両方が確認できたのは、NIB-384, 389で、確認できた束針晶の数は19個、柱状晶は21個とわずかに柱状の方が多い。

におい、味 わずかににおいがある。HYCP-84, NIB-418は比較的強く感じた。味は、NIB-389は甘味を感じたが、NIB-393以外のロットでは甘味の他に渋味も感じた。NIB-393は渋味が強く、甘みを感じなかった。

2. 防風

内部形態 生薬の利用部位は根茎を伴う根で、輪節部分は根茎である。生薬に占められる部分は根の占める割合が大きいのので、根の形態を基本として記述する。

根：皮部の厚さは半径の約2分の1で最外層はコルク層からなる。周皮のすぐ下に径80～100 μm の、やや大きな分泌道が認められる。二次皮層全体に放射方向に大きな空隙がある。分泌道は二次師部に伴って認められ、径は20～30 μm 、密度は7～12個/ mm^2 、分泌道を構成するエピセリウム細胞の数は5～9個であった。木部には二次木部が発達し、通道要素は孔紋道管、階紋道管、らせん紋道管が認められ、最大径は45～80 μm であった。二次組織中には放射組織が発達する。でんぷん粒は単粒がごく少なく、複粒が多くを占め、2～8粒が多くまれに10粒からなるものが認められた。複粒を構成するでんぷん粒1つあたりの径は3～

7 μm であった。単粒の径は5～11 μm であった。

根茎：皮部の厚さは半径の約2分の1で最外層はコルク層からなる。周皮のすぐ下では分泌道が横走するものがある。根と同様、二次皮層全体に放射方向に大きな空隙がある。分泌道の形態は根に似るが数が多く密度は25～35個/ mm^2 であった。木部の通道要素も根と同様で道管の最大径は45～80 μm であった。二次組織中には放射組織が発達する。髄が明瞭で、中心部は柔細胞とやや肥厚した厚壁柔細胞からなる。でんぷん粒は複粒が多く2～10粒のものが認められた。複粒を構成するでんぷん粒1つあたりの径は3～7 μm であった。単粒はごく少なく、径3～7 μm であった。

3. 撲櫟

内部形態 本品の横切片を鏡検するとき、周皮のコルク層部分にはコルク石細胞が層をなし、内部にはコルク細胞とは別の大きな石細胞群を伴う。二次皮層の外側には石細胞群が不規則に配列するか、通常じん皮繊維群に連なって形成される。二次皮層の内側では石細胞群の数が減り、代わりに師部繊維群が階段状に並び、その構成細胞層数は4～8であった。柔組織中にはシュウ酸カルシウムの集晶が散在するほか、石細胞群や繊維の細胞に隣接してシュウ酸カルシウムの単晶を含む細胞が認められる。柔細胞中には単粒からなるでんぷん粒が認められ、径は2～5 μm であった。

【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

MTT活性値は、細胞数の増加や細胞の状態によって増減する。樹状細胞は細胞数に依存してMTT活性値を増加させた。従って、樹状細胞では、細胞増殖や細胞活性の変化によってMTT活性値が増減することが明らかになった。

樹状細胞に各生薬エキス（100 µg/ml）を48時間処置し、樹状細胞の MTT 活性を測定した結果、MTT 活性値に増減が観察された。オウゴン、ケイヒ、シャクヤク、ダイオウの4種の生薬エキスは樹状細胞の MTT 活性を著しく上昇させた。一方、オウレン、ビャクジュツ、キョウニンの3種の生薬エキスは樹状細胞に対し、MTT 活性を著しく減少させた。

オウゴンエキスは、ほとんどのロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を著しく増加させた。カンゾウエキスは、ほとんどのロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を増加させた。

ショウキョウエキスは、1ロットで MTT 活性を僅かに減少させたが、他のロットは樹状細胞の MTT 活性をほとんど変化させなかった。ソウジュツエキスは、2ロットで MTT 活性を減少させたが、他のロットでは MTT 活性を変化させなかった。ニンジンエキスは、多くのロットにおいて僅かに MTT 活性を増加させた。オウレンエキスは、ほとんどのロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を減少させ、その減少の割合にはロット差があった。ケイヒエキスは、全てのロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を増加させ、その増加の割合にはロット差があった。ジオウエキスは、樹状細胞の MTT 活性を変化させなかった。シャクヤクエキスは、全てのロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を増加させ、その増加の割合にはロット差があった。トウキエキスは、2ロットのみ MTT 活性を増加させたが、他のロットは MTT 活性を変化させなかった。サイコエキスは、樹状細胞の MTT 活性に対し一定の効果を示さず、MTT 活性を増加させるロットと減少させるロットがあった。サンシシエキスは、1ロットのみ樹状細胞の MTT 活性を増加した。その他のロットもロット差があるが、僅かに増加傾向を示

した。ゴシツエキスは、樹状細胞の MTT 活性を変化させなかった。シャゼンシエキスは、1ロットで樹状細胞の MTT 活性を減少させたが、他のロットは MTT 活性を変化させなかった。ダイオウエキスは、1ロットを除いたロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を著しく増加させ、その増加の割合にはロット差があった。ビャクジュツエキスは、樹状細胞の MTT 活性を減少させ、その減少の割合にはロット差があった。マオウエキスは、1ロットで樹状細胞の MTT 活性を減少させた。また、減少傾向を示すロットがあった。センキュウエキスは、1ロットで樹状細胞の MTT 活性を減少させたが、他のロットは MTT 活性を変化させなかった。ソヨウエキスは、3ロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を著しく増加させた。ブクリョウエキスは、ほとんどのロットにおいて樹状細胞の MTT 活性を減少させた。ハンゲエキスは、3ロットで樹状細胞の MTT 活性を著しく減少させた。他にも MTT 活性を減少させる傾向を示すロットがあった。サイシンエキスは、2ロットで樹状細胞の MTT 活性を著しく減少させた。他のほとんどのロットにおいても MTT 活性を減少させる傾向を示した。キョウニンエキスは、14ロットが樹状細胞の MTT 活性を著しく減少させ、他の13ロットは MTT 活性をほとんど変化させなかった。タクシャエキスは、樹状細胞の MTT 活性をほとんど変化させなかった。ボウイエキスは、2ロットが樹状細胞の MTT 活性を減少させ、1ロットが MTT 活性を僅かに増加させた。しかし、他のロットは、樹状細胞の MTT 活性を変化させなかった。

（2）Amyloid β 誘発の神経細胞死に対する作用

A β (25-35) の2日間処置により、大脳皮質神経細胞の約30%が死滅した。オウレンではすべてのサンプルで非常に強い細胞

毒性が見られ、A β (25-35) 処置単独によるよりもはるかに多くの神経細胞死が認められた。この他、サンプルの中で細胞死を増強するものがあつた生薬は、オウゴン (NIB-001, NIB-174)、ビャクジュツ (NIB-030)、サンシシ (NIB-044)、サイコ (NIB-153, NIB-190, NIB-191)、キョウニン (NIB-512)、シャゼンシ (NIB-025) だつた。10 μ M A β (25-35) 処置による細胞死を 100%とした場合、50%以上の回復を示したサンプルを上げると、カンゾウ (NIB-003, NIB-005, NIB-007, NIB-038, NIB-107, NIB-108, NIB-109, NIB-146, NIB-168)、ボウイ (NIB-582, NIB-584, NIB-587, NIB-575)、ビャクジュツ (NIB-050, NIB-163, NIB-206, NIB-217)、ダイオウ (NIB-049, NIB-101, NIB-134, NIB-135, NIB-161, NIB-210, NIB-202, NIB-223)、サンシシ (NIB-019, NIB-224)、サイシン (NIB-318)、サイコ (NIB-122)、トウキ (NIB-066, NIB-102, NIB-136, NIB-137, NIB-138, NIB-162, NIB-173, NIB-204, NIB-218)、ニンジン (NIB-011, NIB-012, NIB-040, NIB-056, NIB-061, NIB-067, NIB-077, NIB-093, NIB-112, NIB-113)、マオウ (NIB-141, NIB-144, NIB-166, NIB-209, NIB-210)、キョウニン (NIB-426)、ショウキョウ (NIB-147)、ソヨウ (NIB-133, NIB-160, NIB-200, NIB-211)、タクシャ (NIB-364, NIB-383)、シャクヤク (NIB-063, NIB-128)、ソウジュツ (NIB-009, NIB-148, NIB-182)、センキュウ (NIB-026, NIB-048, NIB-064, NIB-084, NIB-100, NIB-132, NIB-159, NIB-199, NIB-214) となつた。

(3) 転写因子 NF- κ B 活性化に対する効果

HeLa- κ B6 細胞に TNF- α で刺激した結果、未刺激のものと比較して約 3-5 倍ルシフェラーゼ活性が上昇した。そこで、刺激した細胞のルシフェラーゼ活性からコントロールの活性を差し引いた値を活性誘導率 100

として、各生薬の活性を評価した。

オウゴンエキスの NF- κ B 活性化抑制作用は弱く、NIB-002 および NIB-057 は活性を 30%程度抑制した。カンゾウエキスには阻害活性を有するものはほとんどなかった。逆に、活性増強を示すロットが存在し、NIB-108 は活性を 40%程度増強させた。ショウキョウエキスには NIB-055 のみ若干ではあるが、阻害活性が認められた。NIB-039 や NIB-060 など、逆に活性を若干増強させたロットがあつた。ソウジュツエキスには活性抑制が認められず、逆に活性を増強させるロットがいくつか認められた。ニンジンエキスには弱いながらも、NIB-056 では活性抑制効果が認められた。一方、NIB-067 や NIB-076 など活性を増強させるロットが複数個認められた。オウレンエキスは全体的に活性を抑制しており、約 30%の活性抑制を認めるロットが多数あつた。最も効果が強い NIB-041 では 45%程度の活性抑制効果を示した。ケイヒエキスは、NIB-078 では 30%程度、NIB-043 と NIB-151 では 10%程度の弱い活性抑制が認められた。一方、NIB-070 は 50%以上もの強い活性増強効果を示し、他にも活性を増強させるロットが多く認められた。ジオウエキスには活性を抑制したロットは一つもなく、むしろ全体的に活性を増強させた。特に NIB-022 や NIB-156, NIB-219 では 30%程度の活性増強が認められた。シャクヤクエキスには阻害効果を示すロットはなかった。逆に活性を 30%以上増強させるロットが多く認められた。トウキエキスでは、検討したロットにはあまり活性が認められなかった。一方、活性を 30%程度増強させたロットがいくつもあつた。サイコエキスには、活性を増強するものと阻害するものが混在していた。サンシシエキスでは、NIB-081 など活性抑制が認められるロットがあつた。しかし、NIB-154 のように活性

増強を示すロットが多かった。ゴシツエキスでは、NIB-189 には活性抑制効果が認められたが、その他のエキスには阻害効果が認められなかった。シャゼンシエキスには活性を増強させるものと阻害させるものが混在しており、その効果はいずれも弱かった。ダイオウエキスには、活性阻害効果を示すものと増強効果を示すものが複数ロット認められた。NIB-049 と NIB-135 には 30% 以上の阻害効果、NIB-028 と NIB-134 には 30% 以上の増強効果が認められた。ビャクジュツエキスでは、NIB-206 のみ活性抑制効果を有したが、他のロットはいずれも弱いながらも活性増強効果を示した。マオウエキスでは、多くのロットで活性抑制を認められ、効果が最も強い NIB-144 は約 50% の抑制効果を示した。センキュウエキスはいずれのロットにおいても強い活性増強効果が認められた。その効果は最も弱いロットにおいても 45% であり、最も効果が強い NIB-048 では約 2 倍もの増強効果が認められた。ソヨウエキスではいずれのロットにおいても 10%~20% の活性抑制が認められた。ブクリョウエキスには阻害活性を有するものはなかった。逆に、活性を増強させる効果が強く、50% 以上増強させたロットが 4 つも認められた。ハンゲエキスは全体的に活性を増強させた。最も効果が強い NIB-431 では 40% の増強効果が認められた。サイシンエキスは弱いながらも阻害効果を示し、その効果は強いロットにおいても 30% 程度であった。杏仁エキスでは、活性を増強させたロットは NIB-522 だけあったが、抑制効果を示すロットは多く存在した。タクシャエキスは全体的に抑制効果を示した。中でも、NIB-380 のように 50% 以上の強い抑制効果を示すロットが認められた。ボウイエキスでは、NIB-586 のみ活性増強傾向が認められるものの、他のロットはいずれも抑制効果を有した。

(4) HIF1 の転写活性化能に対する効果

HeLa/HRE-Luc2 細胞を CoCl_2 で刺激することにより、発現するルシフェラーゼ活性が約 2 倍上昇した。相対的転写活性の差異が各ロット間において 1.0 以上であったものを「ロット差あり」と判定した。その結果、オウゴン、ダイオウにおいてロット差が観察され、すべてのロットにおいて HIF-1 α の活性を増強する傾向が示された。またソウジュツもロット差は観察されないものの HIF-1 α の活性を増強する傾向が示された。一方、オウレン、ボウイは、HIF-1 α の活性化を抑制した。その他の生薬については、多少のロット差は存在するが、HIF-1 α の転写活性化に対する効果はほとんどみられなかった。

(5) 生薬抽出エキスの抗酸化機能

各生薬の ORAC 値 (乾燥エキス重量あたりと生薬重量あたり) を示した。同一生薬においてサンプル間で最大下記の ORAC 値の差が見られた。オウギ (1.6)、チンピ (1.5)、ボタンピ (2.2)、ハンゲ (8.9)、*サイシン (2.7)、キョウニン (2.1) [() 内 : 最大値と最小値の比 (倍)]。また、各生薬の乾燥エキス重量あたりの ORAC 値と生薬重量あたりに換算した ORAC 値の平均値を示した。

(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

1. 国内流通品の NO 産生抑制活性

10 品目の生薬 (イレイセン、エンゴサク、カンキョウ、キジツ、シコン、コウジン、ケイガイ、ブシ、サンショウ、キクカ) について活性試験を行った。各生薬について、平均 NO 産生抑制率 (%) 及び平均細胞生存率 (%) を算出した。その中ではキクカの NO 産生抑制率は 40.1%、エンゴサクが 34.4%、イレイセンが 29.3%、サンショウが 27.8% と比較的強い活性を示した。またロット間の活性の差異が大きな生薬として

は、サンショウ、ブシ、キジツ、シコン、キクカであった。そこで今回は、キクカについて ESI-orbitrap MS のデータと活性データとの多変量解析を行い、活性化合物の推定を行った。

2. キクカが多変量解析

キクカは 12 種類のロットが収集されており、産地は湖南省、浙江省、広東省、安徽省、山西省、河南省と 6 つの産地のロットが集められている。各産地における NO 産生抑制活性は、産地による特徴は見いだせず、主成分分析 (PCA) においても明確なグループ分けはできなかった。キクカの細胞生存率はいずれのロットもほぼ 100% 以上と毒性は認められなかった。産生抑制率の平均値より強いものを活性の強いグループ、弱いものを活性の弱いグループに分け、判別分析 (OPLS-DA) を行った。この場合 score plot 上では比較的きれいな分離が行われた。そこで loading s-plot を解析し、活性の発現に寄与していると思われるプロットを解析した。S-plot において、活性に寄与していると推定されるプロットの拡大では、positive mode では保持時間 5.5 分の m/z 285, 593 であった。同保持時間の negative mode においては m/z 637, 591, 445, 283 にピークが認められた。Positive mode において m/z 447 は 593-146 であることから、593 が $[M+H]^+$ とすると、それから pentose が抜けた値と一致する。さらに 285 は 447-162 であることから、447 の分子からさらに hexose が抜けた値と一致する。このことは negative mode でも同様にみられ、591 $[M-H]^-$ とすると 637 $[M+HCOOH-H]^-$, 445 $[M-pentose-H]^-$, 283 $[M-pentose-hexose-H]^-$ と考えられ、positive mode の推定と一致する。さらに精密質量分析の結果、分子式は $C_{28}H_{32}O_{14}$ と考えられ、キクカの成分として報告されている化合物では Linarin (Acasin) が唯一一致する。本化合物は市

販されているため、入手後に化合物単体での活性を検証する予定である。

【官能データ情報の集積に関する研究】

オウギ: 測定液は薄黄色から薄茶色を呈し、苦味と旨味が検出された。NIB-0303 は、測色では b^* 値が突出して高く、味センサでは苦味や渋味への応答が大きかった。

オウバク: 測定液は全体的に明るい黄色を呈し、苦味が特異的に検出された。

カッコン: 測定液は薄い灰色がかかった茶色から茶色を呈し、明るさの強い検体では黄色みが低くなる傾向が見られた。苦味と渋味及び、センサ測定ではヒトでは表現されなかった旨味も検出された。

センキュウ: 測定液はクリーム色から茶色がかかったクリーム色を呈し、明るさの強い検体では黄色みが低くなる傾向が見られた。苦味と渋味がヒトと味センサに共通して検出され、味センサではこの他に旨味が検出された。

ソヨウ: 測定液は赤褐色から紫褐色を呈し、味センサ測定では、酸性苦味、渋味、塩酸塩苦味の各後味以外の味要素が検出され、中でも塩基性苦味後味が強く検出された。しかしながらヒトによる官能試験では「少し苦く、渋い」と表現された。また、色についても、赤みを表現する a^* 値がほぼ 0 であり、味、色とも官能と機器測定による表現の一致が低かった。

チンピ: 測定液は薄い黄色から濃い茶色を呈し、特に NIB-0673 及び NIB-0674 は濃い茶色を呈した。これら 2 検体は、測定用液の pH が他の検体と比較して低い傾向にあり、特に NIB-0674 はセンサ測定により酸味を検出すると共に、ヒトによる官能試験でも明確な酸味が感じられた。

ビャクジュツ: 測定液は黄土色を呈し、ヒトによる官能試験では苦味と渋味が表現された。一方味センサ測定では、渋味後味及