

び塩酸塩苦味後味以外の味要素が検出され、特に酸性苦味と塩基性苦味後味値が強く検出された。

ブクリョウ：測定液は薄茶色から茶色を示し、センサ測定にて苦味や渋味が検出されると同時にヒトによる官能試験においても苦味と渋味を感じており、センサ測定とヒトの官能が合致していた。一方、ヒトによる試験にて検体によって酸味が感じられるものがあり、特に NIB-0087 には明確に酸味が感じられたが、センサ測定においても酸味が検出された。

ボタンピ：測定液はクリーム色から茶色を呈し、味の表現は、苦味及び渋味が強く検出されたセンサ測定での検出パターンとヒトによる官能試験の表現の合致が良好であった。

マオウ：測定液は茶褐色を呈し、センサ測定では特に塩基性苦味後味が強く検出され、同時に酸性苦味、渋味や塩味も検出された。ヒトによる官能試験においても苦味と渋味を強く感じており、センサデータと官能データが合致していた。一方、色測定において、NIB-0210 が他検体と比較して色味が暗く、黄色みと赤みが強かった。

#### 【副作用情報に関する研究】

医中誌からは、215 報の論文を得た。このうち、漢方薬が引き起こした副作用に関する論文をピックアップしていき、62 報を得た。PubMed からは 272 報を得た。そのうち、漢方薬が引き起こした副作用に関する論文をピックアップしていき、2 報を得た。合計 64 報について内容を精査し、漢方薬が引き起こす副作用に関する論文として、すべてを Excel のデータ形式にし、昨年度までのデータに追加する予定とした。64 方のうち 30 報は過去の副作用の事例をまとめた総説論文、臨床試験や動物実験により副作用がなかったとする論文が 3 報、漢方

薬ではない健康食品による副作用報告が 1 報であり、漢方薬の副作用に関する論文 16 報と、学会発表の抄録 15 報が、データベース入力の対象となった。

2013～2014 年に新たに文献・学会発表により副作用が報告された処方としては、多い順から黄連解毒湯 4 報、抑肝散 3 報、加味逍遙散 3 報、梔子柏皮湯 3 報、芍薬甘草湯 2 報、柴朴湯 2 報であった。過去の報告と合わせると、芍薬甘草湯が 26 報、小柴胡湯 23 報、柴苓湯 13 報、防風通聖散 13 報という順となった。

また、2013～2014 年に報告された副作用の種類としては、医薬品・医療機器等安全性情報 No.305 で報告がなされた特発性腸間膜静脈硬化症が 12 報と最も多く、次いで偽アルドステロン症 8 報、膀胱炎 4 報、間質性肺炎 3 報であった。新たな病名はなかった。

#### 【国際標準化情報に関する研究】

##### （1）第 5 回 ISO TC249 WG1 会議

①中国より新規に提案されたデンシチニンジンの種子と種苗に関する案件（“Seed and seedling quality of *Panax notoginseng*.”）について、日本から、全ての薬用植物について seeds and seedlings の国際標準を作成することは endless となるので優先品目を決めるべきであること、中国産の種子のみを使った今回のデータだけでは不十分であり他の地域に産する同植物からの種子を使ったデータを取る必要があることを主張。最終的には、種子をいくつかの原産地から導入して比較すること、タイトルから quality を削除する事、Form 4（提案書）に記載されている“solving the problem of miscellaneous cultivars”の意味を明確にする等の修正を加えた後、NWIP として検討を進めるかを決定する投票に進むことになった。なお、現在日本での栽培生産はなく、医薬品原料と

しての使用もないか少量なため影響は少ない。

②2013年までにPWI(Preliminary Work Item、予備業務項目)に留どまった中国より提案されている道地生薬に関する国際標準案件 (“Geo-herbs”)は Geo graphical indication (地理的表示)の薬用植物版であるが、ISO Head OfficeのMary LEUより、特定の地域でのみ生産されるものはISOでは認められないことが解説され、これから先には進めないこととなった。

③中国より新規に提案された肉従容に関する案件 (“Dao-di herbs -*Cistanches Herba from Alxa league*”)について、日本から、品質と採集地との関係が全く説明されていないこと、基原植物が明確に示されていないこと、ワシントン条約II類に指定されている生薬で輸出入には許可が必要であり国際標準には適さないことを主張した。また、先のGeo-herbsと同じ基本概念の提案であることから国際標準には適さず、本提案のままではこれから先に進むのは困難となり、「ISO Directive, Section 6.6.3 Part 2の記載を考慮して、本提案はPWIに留める」という最終結論となった。

④中国より新規に提案されたガイヨウに関する案件 (“Geo-authentic Traditional Chinese Medicine --*Artemisiae Argyi Folium in Qizhou*”)について、提案書及び発表のスライドにおいて、本種が日本にも野生し生薬ガイヨウとして使用されていることが述べられていたが、これらは誤りであることを指摘し、本種は中国のみに分布し中国のみで使用されている内容に修正させた。本提案も、先のGeo-herbsと同じ基本概念の提案であることから、Geo-authenticという表記をタイトルから外すこと、本種はモグサの原料でもあることからWG4と相談すること、提案書の記載を日本の指摘にしたがって修正すること等を行った後、NWIP

としての投票に進むとの最終結論となった。

⑤中国より新規に提案された生薬デンシチニンジンの品質に関する案件 (“Quality of *Radix Notoginseng*”)について、日本から、生薬の品質は各国の法律で規制されているものであるから成分含量等を国際標準で規定するのは反対である意思表示をスライドにより行った。最終的に、本提案はタイトルからqualityを削除すること、生産地と品質の関連を説明すること等の修正を加えた後、NWIPとして検討を進めるかを決定する投票に進む事になった。

⑥中国より新規に提案された生薬タンジンの種子と種苗に関する案件 (“Seed and seedlings of *Salvia miltiorrhiza* Bunge.”)について、日本から、本植物が日本にも自生するという提案書及びスライドの記載の誤りを指摘した。本提案はマイナーな修正を加えた上でNWIPとして検討を進めるかを決定するための投票に進む事になった。なお、本国際標準ができて、現在日本での本種の栽培生産はなく、使用量も少なく影響は少ない。

⑦アメリカニンジン種子と種苗に関する案件 ‘Ginseng seeds and seedlings-Part 2: American ginseng’)について、カナダより、アメリカニンジンの栽培に関する共同研究進捗状況報告がなされたが、本提案について未だ提案書の作成がなされていないことを日本から指摘し、最終的には本案件はPWIとして残し今後発展させることとなった。なお、現在日本での本種の栽培生産はなく、使用量も少なく影響はない。

### (3) 第7回 ISO TC249 WG2 会議

NP投票を通過した以下の3つの提案に関して以下の議論があった。

「Quality and safety of natural materials and manufacturing products」(ドイツ)の提案については、範囲が広いとため、1) 確認試験、2) 重金属の評価、3) 残留農薬の評価、4)

微生物汚染の評価、5) アフラトキシン、6) 保存剤分析、7) 毒性物質の定量、の7つに分担して情報収集した上で提案を仕上げるものとされた。

「General requirements for manufacturing process」(日本)の提案については、マネジメントシステムとの区別に留意しながらWDを仕上げるものとされた。

「Requirements for industrial manufacturing process of red ginseng」(韓国)については、WDがほぼ仕上がっていることから、final WDに向けて精査することとされた。

また、今回新たに日本及び韓国から提出された生薬及び生薬製品のラベリングに関する提案は、内容について日韓で協議しながら進めることとされた。さらに、

「Analytical method of single herb products for herbal decoction/preparation」(韓国)の提案は、国際規格にする意義が見出せず、廃案とされた。

#### (4) ISO TC249 WG2 web 会議

「Quality and safety of natural materials and manufacturing products」(ドイツ)の提案については、分担に関する報告が説明され、WDの作成を進めることとされた。

「Requirements for industrial manufacturing process of red ginseng」(韓国)については、ニンジンのサイズにより蒸す条件を変えたり、熱風乾燥の条件を設定したり、改善されたことが報告された。日韓のラベリングの提案について、WG5のコーディング提案との連携を取ることを求められた。

#### (5) 第8回 ISO TC249 WG2 会議

日本及びドイツ提案の作成の遅れに関して審議され、最初の重要なタイムリミットである final CD から DIS への移行から逆算して、first WD、final WD、first CD を提出する期限が確認され、それまでのタイムスケジュールが確認された。韓国提案については、すでに final WD に近い状態であるた

め、CD 段階へ移行するスケジュールについて審議された。また、ラベリングに関する提案は、最終的に日韓の提案を合併させることも視野に入れながら作業を進めることで合意された。

#### D. 考察

【薬用植物総合情報データベースの拡充に関する研究】

次年度以降は表1に示すように、運用中のデータベースについてシステムの維持並びに必要な応じた改修を行う。また、新規開発項目及び、改修したシステムについて拠点研究者間での試用を継続し、使用上の問題点等のフィードバックを受け、システムの整備を進める計画である。

今期の開発項目のひとつである、横断検索機能については、現在、複数の検索結果を並列表示するのみの機能にとどまっているが、将来的には、データの数値等を用いて計算処理を加え、多変量解析等が可能なシステムに発展することが望ましい。

【成分分析データの集積に関する研究】

生薬の熱水抽出エキスの作成においては、チョレイにおいて極端に少ないエキス収量であった。以前ブクリョウが同様に少ない終了であったが、キノコ類の場合、その主成分はエルゴステロールなどの疎水性成分が多く、そのため熱水抽出においては組織に溶媒(水)が十分に浸透しない可能性があった。

LC/MS 測定においては、今回測定したのは6種類の生薬であるが、多変量解析の結果ではサンシュユ、サンヤクについては産地によるグループ分けがある程度できていたが、他の種類については明確ではなかった。ゴミシについては黒竜江省産と遼寧省産での判別分析において、黒竜江省のマーカ化合物候補として Wuweizidilactone H

が推定された。

チモにはサポニンに相当するピークを多く認めた。また一部の試料中のピークには分裂するものが多く現れ、これは異性体の存在によるものと推定された。サンシユについては *Morroneiside* および *Loganin* に相当すると思われるピークを確認した。サンヤクについては一部特殊な元素に由来すると思われる中性フラグメントが観察されており、成分的に興味深いものが含有されている可能性がある。エンゴサクに関しては *Glaucine*, *Corydaline*, *Dehydrocorydaline* に相当すると思われるピークが確認された。イレイセンに関しては、5つの産地のものがあつたが、広西省のみが特徴的なピークを示し、それは配糖体の集合体であると推定された。

キキョウに関して、保持時間 18.69 分のピークのマススペクトルは、主に  $m/z$  1417 及び  $m/z$  1007 のピークが観測された。 $m/z$  1417 をプリカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  1285, 1123, 961, 829, 683, 及び  $m/z$  521 のピークが観測され、それぞれペントース、ヘキソース、ヘキソース、ペントース、デオキシヘキソース及びヘキソースに相当する組成の脱離によるものと考えられた。さらに、同時に観測された  $m/z$  1285 の MS/MS も同様の結果を示しており、これは、*platicodigenin* [ $C_{30}H_{48}O_7$ ] をゲニンとするサポニンのピークと考えられた。一方、 $m/z$  1007 に関すると思われるピークが観測されなかったことから、 $m/z$  1007 は共溶出した他の成分と考えられた。これをプリカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  845, 683 及び  $m/z$  521 のピークが観測され、それぞれヘキソース、ヘキソース及びヘキソースに相当する組成の脱離によるものと考えられた。これは、*platicodigenin* [ $C_{30}H_{48}O_7$ ] をゲニンとするサポニンのピークと考えられた。保持時間 22.39 分のピークのマススペ

クトルは、主に  $m/z$  1225, 1093 及び  $m/z$  683 のピークが観測された。 $m/z$  1225 をプリカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  1093, 961, 799, 667 及び  $m/z$  521 のピークが観測され、それぞれペントース、ペントース、ヘキソース、ペントース及びペントースに相当する組成の脱離によるものと考えられた。また、 $m/z$  961 から  $m/z$  829, 667 へのペントースとヘキソースの脱離の異なったピークも観測された。これらのことから、本ピークは *platicodigenin* [ $C_{30}H_{48}O_7$ ] をゲニンとするサポニンのピークと考えられ、得られた構造情報から、*platicodin D* と推定された。これらのスペクトル解析の結果から、本分析条件によって測定されたデータには、キキョウに含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、特徴的なデータの集積が可能となった。

タイソウに関して、保持時間 13.07 分のピークのマススペクトルは、主に  $m/z$  609 が観測された。これをプリカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  301 のヘキソース及びデオキシヘキソースからなる 2 糖類に相当する組成の脱離によるものと考えられた。これらのことから、本ピークは *rutin* と推定された。同時に観測された  $m/z$  725 をプリカーサーイオンとした MS/MS は  $m/z$  575 のペントースに相当する組成が脱利したものに  $H_2O$  が付加したと考えられる  $m/z$  575 や *kempferol* に相当する組成の  $m/z$  285 のピークが観測され、フラボノイドが共溶出したものと考えられた。保持時間 21.54 分のピークのマススペクトルは、主に  $m/z$  1043 のピークが観測された。これをプリカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  911 及び  $m/z$  749 のピークが観測され、それぞれ、ペントース及びヘキソースに相当する組成の脱離によるものと考えられ、トリテルペンサポニンのピークと推察された。本分析条件によって測定されたデータには、タイソウ

に含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、特徴的なデータの集積が可能となった。

コウボクに関して、保持時間 8.70 分のピークのマススペクトルは、主に  $m/z$  314 のピークが観測され、含窒素化合物であることが示唆された。これをプリカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  269 を主としたピークが観測され、これは、ジメチルアミノ基が脱離しものと推定され、イソキノリンアルカロイドのピークと考えられた。保持時間 9.61 分のピークのマススペクトルは、 $m/z$  767, 502, 496 及び  $m/z$  371 が主に観測された。これらの MS/MS は、相関性がなく、これらは共溶出した化合物と考えられた。 $m/z$  496 をプレカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  347, 317 及び  $m/z$  281 を主としていた。これらはそれぞれ、ペントースに相当する組成の脱離、ヘキソースに相当する組成の脱離及びそれからの  $2H_2O$  に相当する脱離によるものと考えられ、これはフェニルプロパノイド配糖体のピークと推定された。本分析条件によって測定されたデータには、コウボクに含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、特徴的なデータの集積が可能となった。

薄層クロマトグラフィーは、特別な装置を必要とせず、簡便に行えることから、日本薬局方の生薬の確認試験として多用されているが、一般的に  $R_f$  値の再現性が悪いなどの問題もある。本研究では、生薬の TLC による確認試験を実施するにあたり参照できる、代表的な薄層クロマトグラム画像データを公開することを目的として、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の協力を得て、実際に各社が扱っている生薬の確認試験の TLC クロマトグラムを集積している。今年度は、昨年度に引き続き新たな TLC による確認試験

法の検討を行い、適切な条件が設定できたものについては、公開用の画像データを収集した。

生薬の確認試験では、スポットの色も重要な情報となることから、画像データの公開に当たっては、色の再現性を確保する必要がある。そこで、色見本を添えて画像データを取得することにより、相対的に色の再現性を確保することとした。

日本薬局方の一般試験法<2.03>薄層クロマトグラフィーでは、使用する薄層板について、通例としてその作製法を規定しているが、現在では、通常市販の薄層板が使用されている。本研究班では、現在最も一般的に使用されていると思われる Merck 社製の薄層板と、国産メーカー品として Wako 社製の薄層板を用い、展開結果を比較している。生薬の TLC による確認試験の中には、標準物質と一緒に展開せず、確認スポットの  $R_f$  値と色調を示してある場合があるが、特にこのようなものについては、TLC による確認試験の実施例の画像情報を公開することにより、確認試験の確実な実施が保証されるものと期待される。

今年度、日局に TLC による確認試験が設定されていない 14 の生薬について、TLC による確認試験法の検討を行い、アマチャ、シャゼンシ、シュクシャ、タクシャ、モッコウ、レンギョウについて新たに TLC による確認試験を設定した。これらの生薬は、これまで確認試験が設定されていないか呈色反応のような特異性が低い方法が設定されていたものであり、今回設定した TLC による確認試験は、日局生薬の品質の担保に貢献することが期待される。TLC による新たな確認試験を検討した生薬の中には、TLC による確認試験の設定が困難と思われるものもあるが、新たな生薬も含めて次年度も検討を継続する。

今回、12 生薬の国内市場品における

HPTLC 分析を行い、各標準品のスポットを中心とした分離良好な画像データを得ることが出来た。サイシンについては、一部試料に指標スポットが観察されなかった。このように一連の試料の画像データを比較することで、品質の同等性を簡便に判断できることが改めて確認できた。結果をみると、多くの生薬間で分布に違いも認められ、画像データから生薬の成分分布の特徴が観察された。

## 【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

*N. incisum* と *N. forbesii* にはそれぞれ種内多型が認められたが、両種は ITS 配列により明らかに区別可能であった。一方、*N. franchetii* の配列は *N. forbesii* に酷似していた。また *N. forbesii* において 5 箇所の塩基が異なる 2 タイプが存在した。『和漢薬百科図鑑』によれば、*N. franchetii* は *N. forbesii* のシノニムにされる。また、羌活の基原の一つとして *N. forbesii* Boissieu var. *oviforme* (Shan) Chang (= *N. oviforme* Shan) が記載されている。*N. franchetii* と類似した配列を示すものが *N. forbesii* であり、残りの 1 タイプは *N. forbesii* var. *oviforme* とも考えられる。

キョウカツ 4 市場品の内、3 市場品は DNA 量が少なかったため、また 1 市場品はコンタミが原因で、ITS 配列を決定できなかった。

### (2) ケイガイ

今回のケイガイ市場品はすべて河北省産であり、日局規定の *S. tenuifolia* の花穂に由来するという結果であった。*S. multifida* が荊芥として用いられるという記載は、『和漢薬百科図鑑』のほか、『中華本草』にも認められた。ただし、吉林、遼寧、黒竜江、河北省等の自生地のみで使用されるとの記載

であった。今回の結果から、ケイガイ市場品中に *S. multifida* が混入しても、ITS 配列により容易に区別できることが明らかとなった。

### (3) イレイセン

日本市場に流通するイレイセンとして、*C. mandshurica* を原植物とするものを確認した。一方で、12 検体から PCR 法において ITS 領域を増幅するために適した DNA を得ることができなかった。理由として、威靈仙から抽出した全 DNA に不純物が含まれていること、DNA 自体が抽出されにくいことが挙げられる。このことは分光光度計の測定結果から充分考えられた。前者のような検体については全 DNA 溶液の精製試薬、例えば Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) や GENE CLEAN Kit などを使用して精製を試みたがいずれも増幅を認めなかった。

塩基配列の解析が可能であった 3 検体はいずれも刻み生薬であった。全形または原形生薬からの全 DNA 抽出の際、始めは根の部分を使用していた。刻み生薬が成功した結果を受けて、同様に根の基部からの抽出を試みたがいずれも失敗に終わった。しかし刻み生薬のみが成功しているという事実を考えると、刻み生薬であることが有利である。今回は実施しなかったが、ある程度の大きさの全形生薬を切断、または粉末化し、これを検体として使用することで PCR 法に適した全 DNA を抽出できる可能性が考えられる。

### (4) カンキョウ

市場に流通するカンキョウの *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析を行った結果、前者の領域において、10 検体、後者の領域において、5 検体が、PCR 増幅が出来ず、塩基配列の決定が不可能であった。既に遺伝子情報の取得が終了しているショウキョウの塩基配列解析では、い

ずれの試料においても、上記の2領域を一度のPCRで増幅出来ており、今回、各領域に分けてPCR増幅を行ったにもかかわらず、PCR産物が得られない試料が多く見出された背景には、カンキョウの調製時における熱処理によるDNAの分解(断片化)があると推察される。また、*trnL-trnF* IGS領域において塩基配列が決定出来なかった5検体のうち、RgKw-4, 5, 7, 8は、いずれも今回の試料の中では、入手年が古いものであることから、これらの検体では、時間経過により、試料中のDNAの分解が、他の試料よりも進んでいたため、PCR増幅が出来なかったと推察された。*trnL-trnF* IGS領域に比べ、*trnL* intron領域において、PCRの成功率が低かった点については、後者の領域の方が、より長い配列を有していたことが要因と思われる。

塩基配列の決定が可能であった各検体における内部配列については、どちらの領域においても、JP16で規定する基原植物である*Z. officinale*の配列と一致あるいは、ほぼ一致した。また、前述の通り、ショウキョウの国内市場品由来の配列とも完全に一致しており、生薬、ショウキョウ及びカンキョウの調製に用いられる*Z. officinale*の*trnL* intron領域及び*trnL-trnF* IGS領域の塩基配列は、安定していることが明らかになった。

INSDに登録されている*Zingiber*属植物5種(*Z. cylidricum*, *Z. junceum*, *Z. nimmonii*, *Z. odoriferum*, *Z. parishii*)の*trnL-trnF* IGS領域の配列を、今回の研究で得られた同領域の塩基配列と比較した結果、*Z. officinale*と他の同属植物は、十分に区別可能であった。このことから、PCR増幅の成功率も考慮すると、カンキョウの基原植物の鑑別には、*trnL-trnF* IGS領域の塩基配列解析が有用であると考えられる。

#### (5) キクカ

市場に流通するキクカのITS1配列及び

*trnH-psbA* IGS配列を解析した結果、いずれの領域の配列においても、わずかな違いを持つ多くの遺伝子型が認められた。ITS1配列と*trnH-psbA* IGS配列との比較では、前者が、13個の遺伝子型、後者が9つの遺伝子型であり、後者の配列のほうが、多様性がやや小さかった。同一ロット内の2個体で、同一の遺伝子型を示した検体は、ITS1配列では、KiKw-2, 8, 10, *trnH-psbA* IGS配列では、KiKw-1, 2, 8, 10, 12であった。この内、KiKw-2, 8, 10, 12は、いずれも性状からキク由来と判断された試料である。このことは、キク由来の試料のほうが、シマカンギク由来のものに比べて、遺伝的背景が安定していることを示唆している。キク由来の試料で唯一、2個体間での配列が異なっていたKiKw-12のITS1配列においても、違いは、1塩基のみであることも上記の考察を支持するものである。

今回解析に用いた遺伝子領域による基原種鑑別については、多数の近縁植物の存在、倍数性、*Chrysanthemum x morifolium*の複雑な種分化の過程などの要因により、不可能であった。

#### (6) キジツ

キジツモデル試料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、増幅産物が得られなかった。これは、両者の入手年がそれぞれ2003年及び2006年と古く、経年による核酸の分解が原因と推定される。陳旧品を良品とするキジツの遺伝子鑑別においては、今後、経年サンプルを材料とした場合の遺伝子鑑別手法の確立が課題と考えられる。

D社からは参考品として、市場流通品ではない試料の提供を受けた。これらはITS1領域の解析の結果、NIB-0818は*C. sinensis*、NIB-0820, NIB-0831, NIB-0832の3試料は*C. unshiu*と判別され、本遺伝子領域がキジツの基原植物種推定に有用であることが示

された。

### (7) エンゴサク

エンゴサクモデル試料のうち、入手年が1987年の試料については塩基配列解析に成功した検体が4検体中1検体のみであった。これは経年により核酸が分解されていたためと考えられる。2001年以降の入手年の検体については、標的領域のPCR増幅及び塩基配列解析においてとくに問題は生じなかった。

今回、北海道研究部保有の *Corydalis* 属植物3種の遺伝子情報を取得したが、国内に産するジロボウエンゴサク *Corydalis decumbens* やヤマエンゴサク *C. lineariloba* についても、遺伝子資源として興味が持たれる。

今後、ジロボウエンゴサクや、*Corydalis* 属植物の今回解析した系統以外の個体等の遺伝子情報についても収集する必要があると考えられる。

### **【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】**

#### 解析試料とする植物資源について

本研究において、とくに医薬基盤研究所で分担している重要生薬の基原植物のEST情報収集においては、RNA-Seq解析の材料として、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて保存、維持栽培されている植物資源を使用している。このように、来歴の確実な植物試料からESTライブラリー等を構築することは、以後の実験の再現性等を担保するため重要である。また、植物資源にEST等の付加情報が付属することにより、植物資源そのものの価値も高められると考えられる。

今回、医薬基盤研究所からRNA-seq解析に供した植物試料はいずれも導入番号等で管理される来歴の確かなものであることに加え、*in vitro* 培養物においては定期的に継

代維持されているため、いつでも、RNA-Seq情報を取得したものと同一の遺伝子背景を持つ植物体を目的遺伝子単離等の実験に使用可能である点が優れていると考えられる。

#### ゲノム解析対象植物種の選択について

今年度、生薬桂皮の基原植物である *Cinnamomum* 属植物を本プロジェクトでゲノム解析を行う対象薬用植物に決定し、予備試験データ取得に着手した。シナニッケイは重要生薬の中で、ゲノムサイズが小さい可能性が示唆されたので、選抜した。ゲノム解析には、かずさDNA研究所のゲノム解析グループの平川博士の協力を得る計画であるため、次年度の解析成果を計画している。

#### 次年度以降のRNA-seq解析について

次年度は新規のRNA-Seq解析の取得に関して、全体として解析試料数を減らす方向で調整し、2年間（H25年度、H26年度）で取得したRNA-seq解析に関して、バイオインフォマ解析を強化する。また、シナニッケイのドラフトゲノム解読結果を受けて、ゲノム解析に関与する追加のゲノムデータの検討を開始する予定である。また、今年度は配列生データの取得にとどまり、精密なアセンブルやアノテーション、発現解析などが未着手のデータが多く残っているので、これらの未解析データについて来年度以降に精密解析を進めていく。なお、漢方薬に用いられる重要生薬の基原植物については、ひきつづき医薬基盤研究所の保有植物資源を材料としてRNA-Seq解析を進めて行くこととした。これらの解析はHiSeq1500 Rapid mode (Paired-End 100bp) で実施する予定である。また、個々のサブグループで別予算にて得られたRNA-Seqデータを本データベースに収集、登録することも今後の統合的な解析のために重要である。



【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】

漢方薬原料生薬の多くは中国で生産されているため、植物組織培養による増殖法に関する文献は、日本語や英語以外の言語で書かれた物（中国語や韓国語）が数多く存在し、詳細なデータを収載するのが困難な文献もあった。また、園芸用としても価値のあるリンドウ属植物のように、植物組織培養による増殖法に関する文献は入手できたものの、基原植物同士の交配種で日本薬局方の基原植物種とは異なる材料の例や、材料植物の学名の記載がなくデータベースに収載できないものがあった。文献情報がないもの及び入手が困難あるいは調査が困難なものについては、オリジナルデータで補完していく予定である。

2 系統のスペインカンゾウの種子より育成した無菌植物体の節切片を材料に、生存率、再生率、株数、草丈に対する種々濃度のゼアチンの効果を調べた結果、植物体再生には、ゼアチン無添加培地が適していたが、系統間の差が認められ、北農試 No.2711 の方が高い再生率を示した。スペインカンゾウの組織培養による増殖については、Kohjyouma らの報告と Patel らの報告があり、いずれの報告でも節切片を材料に、シュートの形成にはナフタレン酢酸とベンジルアデニンの組み合わせ、あるいはベンジルアデニン添加培地を使用している。しかし本研究でのシュート再生は、むしろホルモンフリーの方が良好であった。このことは、スペインカンゾウの植物ホルモンへの感受性は、系統間で大きく異なることを示唆している。

オウギ属植物のうち、キバナオウギ種子は雑菌の混入率が高く、種子からの組織培養物の誘導が出来なかった。さらに強い条件での殺菌操作が必要であると思われる。

牛膝の基原植物 *A. bidentata* と *A. fauriei*

においては、NAA と TDZ を組み合わせ添加することにより、多芽集塊の形成が促進され、*A. bidentata* では外植体あたり 36.6 本、*A. fauriei* では外植体あたり 34.2 本のシュートが形成されたが、シュートの伸長が抑制される傾向が強く認められたため、発根による植物体再生の効率を今後検討する必要がある。

山梔子の基原植物 *G. 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、節間伸長に最適な  $GA_3$  濃度を調査したところ、節間伸長に優れ、かつ正常成育率の高い、 $10.0 \text{ mg L}^{-1} GA_3$  区が至適濃度であることが明らかになった。今後は、 $10.0 \text{ mg L}^{-1} GA_3$  区で培養して節間伸長した無菌培養植物体から、節を含む茎切片を切り出し、多芽集塊形成による大量増殖条件を検討する予定である。

【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

黄耆、葛根、沢瀉、釣藤鈎および麦門冬の 5 品目を比較すると、黄耆はニッケルやバナジウムを、葛根および釣藤鈎はスズを特異的に含むことが明らかになった。各生薬のロット間の無機成分組成の差異は比較的少なかったが、沢瀉では一部のロットの鉄およびアルミニウムの含量が極端に高かった。

沢瀉の一部のロットにおいて、鉄やアルミニウム含量が高い原因は、生育に伴う土壌からの吸収では極端に値が高いことからその可能性は低いと思われ、むしろ加工時に用いた洗浄水もしくは切断および研磨機材等に由来する混入と思われた。

#### (2) 薬用植物の病害虫の調査

カノコソウ半身萎凋病は *Verticillium dahliae* と *Gibellulopsis nigrescens* の 2 種が病

原として報告され、2013年に北海道の生産者圃場で確認されている。防除法については、殺菌剤ベノミルを用いた種苗の消毒が検討され、平成27年度以降に本剤の適用拡大に関する試験が実施される予定である。

*Fusarium solani*によるトウキの根および基部の腐敗症状は、これまでに国内の発生報告はなく、本報告が初めての事例であった。従って病原菌の分離・同定、被害実態の把握や発生生態などの詳しい調査を実施して防除法を検討する必要があると思われた。

### (3) 7年間低温貯蔵した種子の発芽率

低温貯蔵した種子の発芽率に及ぼすエーゼレスとシリカゲルの影響について、今年度の成績と過去に行った5年間貯蔵した種子の成績を併せた結果を示した。7年間貯蔵した種子で100%の発芽率を有する一方で、エーゼレスあるいはシリカゲルとの共存により著しく発芽率を低下させる植物種があることが明らかとなった。特に、エーゼレス単独使用の影響は大きく、植物種ではミツバ、ボタンボウフウ、ミシマサイコなどのセリ科植物、シソ、アオジソ、コガネバナ、メハジキなどのシソ科植物で顕著に見られた。エーゼレス使用による発芽抑制の原因は不明であるが、種子の含水量との関係やエーゼレスによる種子呼吸の停止などの関与の可能性が考えられた。今後種子貯蔵におけるエーゼレスの使用に留意するとともに他の植物種についての検証が必要である。

### **【絶滅危惧薬用植物情報に関する研究】**

1) 標本調査の結果から、熊本県におけるキキョウとミシマサイコの生育地は、かつては県内に広くみられたと思われるが、両種ともに1970年代以降から徐々に減少し、さらに1980年代から1990年代にかけて激減したものと推察される。両種ともに自生

株は極めて貴重なものになってきていると考えられる。

2) 宮崎県産ミシマサイコは、小型の種子であっても十分に発芽能力をもっており、野生種の播種増殖は、未熟種子を取り除けば、種子サイズに大きなバラツキがあっても可能であると考えられる。

3) ミシマサイコの自生地が全国的に減少している中、福岡県北九州市のミシマサイコの自生地は、ミシマサイコタイプ、キュウシュウサイコタイプ、中間タイプの3タイプが混生しており、種の多様性が高い地域であるため、遺伝資源の供給地として重要な場所であると考えられる。

4) 福岡県北九州市産のキキョウは、全体的に大型のものが多く、その中でも1mを越える大型タイプは、地上部の特性として茎数多く、茎径も太くしっかりしているため1株当たりの果実数が多くなる傾向が、また、地下部の特性として根が太く長くなるため1株あたりの根の収量が多くなる傾向が見られた。このように大型タイプは、種子採取用や栽培研究用の多収性系統として期待できる面があり、今後の研究材料として重要だと考えられる。

### **【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

公定書記載の内容は、文献に記されているものと一致した。ただし、組織を表す用語については、古い文献との食い違いが見られた。実際の観察において、多くは容易に確認できる組織だったが、でんぷん粒など確認しにくい組織もあった。逆に、オウバクでは文献記載のないコルク層と思われる組織が確認できるサンプルもあり、原型生薬での確認が必要と思われた。

#### (2) 麦門冬、防風、撲楸の生薬の性状

麦門冬について、『日本薬局方』の外観、においの記載と比較して特に相違はなかった。

しかし、味においては NIB-389 以外の全てに渋味を感じた。また、『日本薬局方』には折るとき皮層は柔軟であるがもろくと記載されているが、かたくもろいものが多かった。内部形態において、『日本薬局方』では原生木部は約 20 個と記載されているが、測定結果は約 18 個となりほぼ一致しているといえる。また、『日本薬局方』に、木部全体と師部に関する記載がないため、追記する必要があるかもしれない。生薬の性状に関しては他の文献とも概ね一致していた。

日局ボウフウの条文には、葉しょうの残基を伴うことがある、とされる。今般の検討資料は全体的に根茎が短い傾向にあり、葉鞘の残基が確認されたものは全形品でも数点に留まった。また局方条文に記される長さおよび径について、今回検討した全形品では、径は数値を満たしたものの、長さが条文記載を満たすものは少数であった。このように現在の国内市場品ボウフウの性状は、局方制定当時の商品と比べて一定以上の差があると考えられる。ボウフウ市場品にボウフウ (*Sapshnikovia*) 属の地下部とは明らかに異なる基原植物の商品 (NIB0442) が認められた。このものは 25 年度報告書の中で丸山らがセリ科カワラボウフウ属の *Peucedanum ledebourielloides* K.T.Fu 由来と指摘していることと付合している。

ボクソク市場品を鏡検した結果、二次師部 (皮部) 内部には師部繊維の層が形成される。この組織は周皮に近づくにしたがい、石細胞群に置き換わる傾向にあった。この石細胞群は径が 100~1,000 $\mu\text{m}$  にもおよぶことから、肉眼やルーペ視で黄白色の細点として確認される組織と考えられた。

#### 【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

本研究は、免疫制御機構に対し重要な役

割を担う樹状細胞を用い、樹状細胞の増殖や生存率や障害性の指標として MTT 活性の測定を行い、免疫系制御の観点から生薬エキスによる生物活性を測定した。

本研究では、MTT アッセイ法により各生薬エキスのロットで生物活性の違いを検出することができた。キョウニンエキスのみ、その生物活性の違いに入手年との関連性が推察されたが、その他の生薬エキスは、その生物活性の違いに、産地・入手年・形態・等級での相関は確認されなかった。これらの結果から、生薬エキスの生物活性は、樹状細胞の増殖や生存率や障害性を検出可能な MTT 活性の測定により検出可能であることが示唆された。本年度に解析を行った生薬エキスのうち、オウゴン、カンゾウ、オウレン、ケイヒ、シャクヤク、サイコ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、ソヨウ、ブクリョウ、ハンゲ、サイシン、キョウニンの 14 種の生薬エキスは、生物活性を検出することが可能であることが示唆された。

一方、ショウキョウ、ソウジュツ、ニンジン、トウキ、サンシシ、シャゼンシの 6 種の生薬エキスは、樹状細胞に対する生物活性が弱く、他のアッセイ系による検討が有効であることが示唆された。

また、ジオウ、ゴシツ、センキュウ、タクシャ、ボウイの 5 種の生薬エキスは、樹状細胞に対する生物活性がほとんど検出されず、他のアッセイ系による検討が有効であることが示唆された。

##### (2) Amyloid $\beta$ 誘発の神経細胞死に対する作用

サンプルが異なっても、細胞死を強める活性が顕著に認められたのはオウレンだった。ブクリョウ、ケイヒ、ハンゲ、ゴシツはどのサンプルにも作用が見られなかった。他の生薬では、サンプル間で活性に差が見られ、A $\beta$  (25-35) が誘発する神経細胞死を抑制する活性と成分との間に何らかの関

係性が見られるかどうかに興味を持たれる。

### (3) 転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化に対する効果

本年度は、スループットの高いアッセイ系を1つにして、各ロットについて個別に試験を実施した。その結果、各生薬の各ロットで活性の変動が認められた。同じ生薬エキスにも関わらず、活性を阻害したり増強したりすることがわかったが、それらがどの成分に起因しているのかなどに興味を持たれた。

### (4) HIF1 の転写活性化能に対する効果

今回、各ロットを用いて生薬の HIF-1 $\alpha$  の転写活性化能への効果を検討した。ロットの差が大きい生薬と差が小さい生薬が存在すると考えられた。今回、オウゴン、ダイオウで観察された HIF-1 $\alpha$  の活性の増強は、腫瘍悪性化進展を促進する可能性がある。また、HIF-1 $\alpha$  の活性で観察された生薬によるロット差の違いが、他のアッセイ系でも同様に観察できるのか、もしくは HIF-1 $\alpha$  に対する特異的な傾向であるのかについて、考察を加えていく必要があると考えられた。

### (5) 生薬抽出エキスの抗酸化機能

それぞれの生薬における各サンプルの ORAC 値を諸情報との関連性について解析することにより、下記のような特徴を明らかにした。

- ・チンピは日本産が6サンプル含まれていたが、特に傾向は見られなかった。
- ・ハンゲは、北鮮産3サンプルが高値を示し、中国産の平均の2~4倍程度と極端に高値であった。
- ・サイシンもハンゲ同様北鮮産サンプルが高値を示し、うち1サンプルは極端に高値であった。
- ・キョウニン<sup>1</sup>は皮を除去したものが比較的 low 値を示した。このことから、皮に抗酸化活性が高い成分が含まれる可能性が示唆された。

産地以外の情報(生薬形態、入手粘、野生品と栽培品、分類や等級)と、ORAC 値と関連性を示さなかった。抗酸化力の産地による差は、気候、土壌、栽培方法等が影響している可能性が示唆された。

### (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

生薬10種類について NO 産生抑制活性の検討を行ったが、キクカにおいては比較的強い活性をすべてのロットで示し、多変量解析による結果、活性化合物が Linarin と推定された。この化合物の構造は、非糖部が 4'-O-methoxyl-5,7-dihydroxyflavone であり、糖部として (6'-O-rhamonosyl) glucose=rutinose が flavone の 7 位に結合した構造であるが、LC/MS のフラグメントからはこの構造を支持した。

### 【官能データ情報の集積に関する研究】

味については、測定に供した各品目生薬はそれぞれの味の要素について生薬ごとに全体としては同一のパターンを示したことから、各品目の生薬それぞれの平均的な味のパターンを表していると考えられる。色については、全ての品目で全体的に明度が高く、黄色みが強かった。また、明度の高い検体は黄色みが低くなる傾向が認められた。

オウギ : NIB-0303 は他検体と比較して  $b^*$  値が突出して高く、また苦味や渋味の値が大きく得られた。他の検体の入手年が 2008 年から 2011 年であったのに対し、NIB-0303 のみ 1998 年に入手されたものであることから、経年変化による色や味の変化が生じている可能性がある。

オウバク : オウバクは全検体で苦味が特異的に検出された。ヒトによる官能試験では、検体間の苦味の差を感じることは難しかったが、味センサで測定された塩酸塩苦味後味値と測色計で計測された  $b^*$  値には正の

相関、また、 $a^*$  値とは負の相関があり、黄色み方向と青み方向の色の強いオウバクは苦味が強い傾向にあると考えられる。

カクコン：センサによる味測定において旨味が検出された一方で、ヒトでは旨味は表現されなかった。カクコンはグルタミン酸を含有していることから、グルタミン酸ナトリウムなどに応答性を持つ旨味センサで検出された一方で、強い苦味にマスクされ、ヒトでは旨味が表現されなかったと考えられる。

センキュウ：センサによる味測定において旨味が検出された一方で、ヒトではわずかな甘みが表現された。ヒトは旨味を甘味と表現することがあるため、今回味センサで旨味として検出された味をヒトでは甘みと表現した可能性が考えられる。

ソヨウ：色・味とも、官能と機器測定による表現の一致が低かった。本生薬の測定液は保管時の温度により色に変化がみられたことから、温度の違いなどにより色や味の成分組成が変動する可能性が考えられる。

チンピ：NIB-0673 及び NIB-0674 は他検体と比較して色・味ともに多少異質であった。これら 2 検体は中国広東省新会産で、色も他の検体より黒く、含有成分比も他の検体とは異なる傾向が見られている。また、これらは入手年が他検体より約 20 年古いことから、NIB-0673 及び NIB-0674 の色や味の特徴は、産地（原植物種）及び経年に由来するものと考えられる。

ビヤクジュツ：味センサによる測定では旨味や塩味も検出されたが、ヒトによる官能試験では、強い苦味と渋味に表現が集約されたと考えられる。

ブクリョウ：味センサ測定及びヒトによる官能試験共に酸味が検出される検体が存在した。この酸味は、エキス抽出時の方法の違いに由来する可能性があるが、定かではない。

ボタンピ：味センサによって渋味後味が他の生薬より強く検出されたのがボタンピの特徴であった。また、ボタンピは匂いも非常に特徴的であり、今回試験に供した測定液もボタンピ特有の匂いが強く感じられたことから、匂いの強弱も評価の対象としやすい生薬であると考えられる。

マオウ：味センサによる測定において塩味が他の生薬よりも強く検出された。塩味を検出するセンサは強い苦味や渋味にも応答性を示すことがあるため、その応答であると考えられる。一方、色測定において、NIB-0210 が他検体と比較して色味が暗く、黄色みと赤みが強かったが、他の多くの検体が中国内蒙古自治区産であるのに対して本検体は中国甘粛省産であることから、産地や保管状況などが異なることにより違いが生じた可能性が考えられる。

#### 【副作用情報に関する研究】

前年度と比較して調査機関が短くなっているにもかかわらず、漢方薬に関する副作用情報数は増加した。特に、腸間膜静脈硬化症の報告が目立って多くなってきており、偽アルドステロン症発症例も増加している。前者は、2013 年に医薬品・医療機器等安全性情報が発表されてこの副作用が広く知られるようになった結果、これまで見逃されていた症例がそのように診断されたことによる症例数の増加と考えられる。また、偽アルドステロン症発症例の増加も、漢方薬全体の使用量の増加と、偽アルドステロン症に関する基礎研究が進み副作用自体の知名度が上がったことから報告数が延び、副作用の発症頻度としては大きな変化はないと考えられる。

PMDA 医薬品副作用データベースは、学会発表や論文にはならなくても、製薬企業または医療機関から報告のあった症例すべてについてまとめられ、重複や、本来なら

ば医薬品の副作用とは言えないものなども含まれているため、本データベースとは棲み分けが出来ていると考えられる。

## 【国際標準化情報に関する研究】

### （1）第5回 ISO TC249 WG1 会議

第5回 ISO TC249 WG1 会議（平成26年5月27日、日本・京都）での議論を経て、中国より提案された Geo-herbs、肉従容及びガイヨウに関する案件は、基本概念の提案であることから国際標準には適さず、本提案のままではこれから先に進むのは困難となり、「ISO Directive , Section 6.6.3 Part 2 の記載を考慮して、本提案は PWI に留める」という最終結論となったが、これらの案件は今後、規格案として作り直して再提案してくる可能性が考えられる。

### （2）第7,8回 ISO TC249 WG2 会議

WG2 は、提案数が絞られていることも幸いし、また、総会との抱き合わせ以外に、2回の個別 WG を開催していることもあり、審議のための時間は十分に持っている。しかし、提案の範囲が広範であることもあり、通常提案作成のスケジュールに後れを取っており、提案者の奮起が必要とされている。

TC249 全体として、タイトルとスコープの確定は設立以来の懸案であるが、話し合いの中ではなかなか決定打が出ず、強引が投票での決着も予想される中、日本国内で、日本としての意見をまとめるための話し合いが一向に行われる気配がないことに違和感を覚える。組織改編や体制整備も重要であるが、JLOM には実質的な問題点に目を向けていただきたいところである。

## E. 結論

平成22年度より構築を開始した「薬用植物総合情報データベース」は平成25年3月に一般公開を開始した。データベース構

築整備の実質的第2期の2年目である本年度は、昨年度より開発を開始したカテゴリ間横断検索機能の整備・改修を行うとともに、生物活性情報のデータ一括登録システムの新規開発、横断検索機能に付随する遺伝子情報の多重整列解析機能の追加等、各種機能の拡充ならびに改修を行った。

今回市場流通品の熱水抽出エキスを作成し、LCMS の検討を行った。また、その結果を多変量解析にかけ、産地、基原、調製法などによる各郡の成分差異を検討した。

LC/MS による6種類の生薬の分析検討の結果、主成分分析において産地によるグループ分けが可能であったものはサンシュユとサンヤクであった。ゴミシにおいては黒竜江省のマーカ化合物においては Wuweizidilactone H が候補に挙げられた。

キキョウ、タイソウ及びコウボクについて、LC-MS/MS を用いた分析プロファイルから、生薬の化学成分情報のデータベース化を行い、品質の情報化を試みることにした。これまでに検討を行った測定条件を元に、HPLC の条件の検討、MS 条件や MS/MS 条件の検討等を行い、データ採取条件の検討を行った。その結果、キキョウ、タイソウ及びコウボクに含まれる成分についての化学情報の集積が可能となった。

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、薄層クロマトグラフィーによる生薬の確認試験の代表的なクロマトグラムを画像データとして一般に公開するために、画像データの収集を行った。クロマトグラムの色の再現性については、色見本を添えてデータを収集することにより、相対的に色の再現性を確保することとした。また、Merck 社製プレートと Wako 社製プレートを用いて、結果を比較した。今年度は、日本薬局方に収載されている生薬のうち、TLC による確認試験が設定されていない

生薬について、新たな試験法の設定のための検討を行い、アマチャ、シャゼンシ、シュクシャ、タクシャ、モッコウ、レンギョウの新規確認試験法を設定し、TLCの画像データを収集した。これらの試験法は、日本薬局方原案審議委員会生薬等（B）委員会での審議を経て、日本薬局方に収載或は収載が予定されている。今回収集したデータは、独立行政法人医薬基盤研究所のホームページで順次公開されている。これらのデータは、TLCによる生薬の確認試験の確実な実施に貢献するものと期待される。

本研究では、12生薬の国内市場品におけるHPTLC分析を行い、各標準品のスポットを中心とした分離良好なHPTLC画像データを得ることが出来た。これらは視覚判断可能な一斉分析データとして有用な資料になると考えられる。今回のような広範囲な国内市場品生薬の同等性を化学的に評価した例は少なく、本結果はデータベース構築のための一科学データとして期待される。

7種類の繁用生薬の遺伝子鑑別に関する情報を整備することを目的にして、現在の日本市場に流通している生薬市場品の遺伝子解析を行い、各生薬の基原種の同定に有用な遺伝子領域を次のように明らかにした；キョウカツ：ITS領域、ケイガイ：ITS領域、イレイセン：ITS領域、カンキョウ：trnL-trnF IGS領域、キジツ：ITS1領域、エンゴサク：trnL intron領域。それぞれの領域の塩基配列解析の結果、キョウカツは*Notopterygium incisum*、ケイガイは*Schizonepeta tenuifolia*、イレイセンは*Clematis mandshurica*、カンキョウは*Zingiber officinale*、キジツは*Citrus aurantium*、*C. hassaku*及びこれらの近縁種、エンゴサクは*Corydalis turtschaninovii*をそれぞれ基原とするものと判断された。キクカについてはITS1領域とtrnH-psbA IGS領域を検討

したが、多数の近縁植物の存在、倍数性、*Chrysanthemum x morifolium*の複雑な種分化の過程などの要因により、基原種鑑別が不可能であった。ただし、trnH-psbA IGS配列において、*C. morifolium*由来と推定された試料は全て同一の遺伝子型に帰属された。

昨年度に引き続き、薬用植物総合情報データベースに増設される新カテゴリーの一つとして、「薬用植物のトランスクリプトーム・ゲノミクス情報」のデータ収集を継続した。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、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た。H25年度に得られたデータについて、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。また、今年度、新規に26植物種121サンプル由来のRNA-Seq分析を行い、一部データ取得が完了した。さらに、選抜した8種類の薬用植物のゲノムサイズを測定し、比較的ゲノムサイズの小さいシナニッケイのゲノム解読を計画している。解析・収集したEST情報を収載し、薬用植物総合情報データベースのトランスクリプトーム・ゲノミクス情報と配列情報のリンクを行うデータベースサイトの構築を更新した。

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、組織培養物及び効率的増殖法に関する文献調査、新規情報のデータベースへの入力、既存データの更新を行った。その結果、57種の薬用植物について、86件の情報の拡充を完了した。また、薬用植物栽培並びに関連産業振興のため、オリジナルデータの取得と漢方薬原料生薬の基原植物の植物組織培養物の資源化を進め、24種の薬用

植物のオリジナルデータ取得を完了し、28種の薬用植物組織培養物の資源化を完了した。

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%)。

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) 無機成分の組成を比較すると、黄耆はニッケル (Ni) が 0.58 ~ 1.15ppm、バナジウム (V) が 2.46 ~ 3.07ppm の範囲で含まれ、葛根および釣藤鈎はスズが 1.89 ~ 2.77ppm の範囲で特異的に含むことが明らかになった。各生薬のロット間の無機成分組成の差異は比較的少なかったが、沢瀉では 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、他のロットと比較して 10 ~ 100 倍程度高かった。

薬用植物の病害虫情報を収集するために北海道内の生産地等を調査した。カノコソウでは、本年度北海道研究部において半身萎凋病が発生し、その原因は *Verticillium dahliae* によると判断した。またトウキにおいて発生した茎や根の腐れは *Fusarium solani* と推定した。

種子と脱酸素剤 (エージレス) あるいは乾燥剤 (シリカゲル) を袋と一緒に封印し、5°C の低温条件で 7 年間貯蔵した 28 種類の種子の発芽率を調査した。その結果、リュウキュウマメガキを除く 27 種類では貯蔵前と同等あるいはそれ以上の高い発芽率を示した。特にカワラケツメイ、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は 100% であった。しかしながら、発芽の状況はエージレスとシリカゲルの存在により大きく異なり、エージレスを入れて封印した種子では全くあるいはほ

とんど発芽しないものが 8 種類認められた。

絶滅危惧薬用植物に関する情報を正確に発信するためには、今後も絶滅危惧薬用植物に関する文献調査、標本調査、現地確認調査を継続して行い、絶滅危惧薬用植物データベースの拡充と整備を進めていく必要がある。特に、今後は、薬用植物資源としての活用を見据えた野生種の種苗特性や資源量に関連するデータ情報の収集の重要性が高まってくると考えられる。

内部形態情報に関して、公定書記載の内容に関しては、概ね確認可能であった。ただし、キキョウの師管の破片については、粉末を観察する範囲では確認が困難であった。また、オウレンのでんぷん粒も確認しにくいサンプルがあった。市場流通品の麦門冬について「生薬の性状」を調査した。日本薬局方やその他の文献の記載と基本的に同様であった。また、等級の比較においても、外観や内部形態に違いがあることを確認した。今回の結果は、薬用植物総合情報データベースに形態情報として提供すると同時に、日本薬局方の「生薬の性状」規格案にも反映させる予定である。現在国内市場で流通するボウフウには、全形品でも局方制定当時の性状記載の長さに達しないものが多く認められた。またボウフウ属以外の植物由来とする商品も認められたことから、局方条文の記載との整合性と原植物との詳細な比較検討の必要性が示唆された。日局ボクソクの基原植物はクヌギ *Quercus acutissima* Carruthers、コナラ *Q. serrata* Murray、ミズナラ *Q. mongholica* Fischer ex Ledebour var. *crispa* Ohashi アベマキ *Q. variabilis* Blume と記載されるが、今回比較検討した NIB1051 標本をはじめとする国内市場流通品はいずれも、比較植物材料のクヌギの性状と良く一致した。特に局方条文に記される「石細胞群の白点」は今回の検討の結果、じん皮繊維が石細胞化した細胞



群のように観察されており、このような性状はクヌギではよく観察された一方で、コナラでは少なく、かつ径も小さな傾向にあった。このことから、市場品ボクソクの多くがクヌギの幹皮に由来することが示唆された。

樹状細胞の増殖や生存率や障害性の指標とした生物活性測定試験により、オウゴン、カンゾウ、オウレン、ケイヒ、シャクヤク、サイコ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、ソヨウ、ブクリョウ、ハンゲ、サイシン、キョウニンの14種の生薬エキスは、生薬エキスのロット間の差を検定可能である。Amyloid  $\beta$  誘発の神経細胞死に対する抑制作用では、カンゾウ、ボウイ、ビャクジュツ、ダイオウ、サンシシ、サイコ、トウキ、ニンジン、マオウ、キョウニン、ショウキョウ、ソヨウ、タクシャ、シャクヤク、ソウジュツ、センキュウに Amyloid  $\beta$  誘発の細胞死を抑制する作用が認められた。また、NF- $\kappa$ B 活性化試験を用いることにより、各生薬のロット差を評価できると考えられた。今後、他の生薬についても同様の方法でアッセイを実施することにした。さらに HIF-1 $\alpha$  の転写活性化に対する抑制効果では、それぞれ各ロットの効果を検討した結果、少なくともロット差を観察できる生薬とロット差のほとんど無い生薬が存在することが確認された。

乾燥エキスの ORAC 分析の結果、抽出エキスおよびその原材料である生薬は、食素材に比べると抗酸化力が高い傾向が見られた。また、局方品として流通している同一生薬において抗酸化能に大きな差があることが明らかとなった。特に北鮮産はハンゲ、サイシンにおいて極端に高値を示すことから何らかの抗酸化値の高い成分が含まれる可能性が示唆された。また、キョウニンは皮にも抗酸化値の高い成分が含まれる可能性が示唆された。今回の分析結果において

も、同一生薬におけるサンプル間の抗酸化力の差が大きく、生物活性や成分分析の結果において抗酸化力と相関している可能性が考えられることから、多変量解析をはじめ様々な解析により活性化合物の予測や生薬の品質評価への適用検討を行いたいと考えている。また、今後さらに、抽出エキスを HPLC で分離し、酸化還元反応を利用した電気化学検出器でピーク情報を取得し質量分析データと比較解析することにより、抗酸化の観点で、成分と抗酸化値の相関を検討する予定である。

10種類の生薬に関して NO 産生抑制活性の検討を行い、キクカから活性化合物と思われる Linarin を推定したが、今後市販化合物を用いて最終的に化合物の構造を確定し、単体での活性の検証を行っていく予定である。

本年度は10生薬113検体（オウギ11検体、オウバク15検体、カクコン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）の熱水抽出エキスの味及び色に関する検討を行った。主観的で曖昧な表現になりがちな官能評価に客観性を持たせるため、味認識装置並びに分光測色計を用いて測定を行い、味及び色を数値で表現した。また、簡単な官能試験も行い、機器による測定の数値との適合性を検討した。味については、測定に供した各品目生薬はそれぞれの味の要素について生薬ごとにほぼ同一のパターンを示したことから、味認識装置を用いて各品目の生薬それぞれの平均的な味のパターンを表現可能と考えられる。色については、全ての品目で全体的に明度が高く、黄色みが強かった。また、明度の高い検体は黄色みが低くなる傾向が認められた。更に、味の要素と色の要素の間に強い相関が認められる生薬も存在したことから、今後、

産地や成分含量等との関連性の有無も検討して行く必要があると考えられる。

漢方処方への副作用に関する情報として、論文 16 報と学会発表の抄録 15 報を得て、その内容をデータベースに追加した。

2012 年以降より継続中の WG1 分野の国際標準案に関する進捗状況について、ニンジン種子と種苗に関する案件は、FDIS が 2014 年 2 月に全参加国の賛成により承認され、国際標準として同年 4 月発刊された。重金属定量法と限度値に関する案件は、DIS の投票が 2015 年 1 月 27 日締切で実施されて承認され、今後、FDIS の投票に移行する予定となった。チョウセンゴミシ種子と種苗に関する案件は、投票の結果、2014 年 6 月 7 日に NWIP として承認された。また、第 5 回 ISO TC249 WG1 会議（平成 26 年 5 月 27 日、日本・京都）に提案された案件は以下のように進捗した。1) 中国より新規に提案されたデンシチニンジンの種子と種苗に関する案件は、最終的に、種子をいくつかの原産地から導入して比較すること、タイトルから quality を削除すること、等の修正を加えた後、NWIP としての投票に進む事になった。その後、提案書に修正が加えられた上で投票にかけられ、賛成多数で NWIP として認められた。2) 2013 年までに PWI に留どまった中国より提案されている道地生薬に関する国際標準案件 "Geo-herbs" は、特定の地域でのみ生産されるものは ISO では認められないルールとなっていることから、本提案はこれから先には進まないこととなった。3) 中国より新規提案された肉従容に関する案件は、先の Geo-herbs と同じ基本概念の提案であることから国際標準には適さず、本提案のままではこれから先に進むのは困難となり、本提案は PWI に留めるという最終結論となった。4) 中国より新規提案されたガイヨウ *Artemisia argyi* に関する案件は、先の

Geo-herbs と同じ基本概念の提案であることから、本提案のままではこれから先に進むのは困難となり、Geo-authentic という表記をタイトルから外すこと、本種はモグサの原料でもあることから WG4 と相談すること、提案書の記載を日本の指摘にしたがって修正すること等を行った後、投票に進むという最終結論となった。その後、京都会議で出された提案がタイトルを変えて投票が開始された。今回の修正案では、Part 2 として *Artemisia princeps* Pampanini および *A. montana* Pampanini が加えられ、これらの植物は JP のガイヨウの基原植物であり日本に影響を及ぼすこと、Part1 ではもぐさへの使用は除外されていること、また、*Artemisia argyi* は日本では医薬品として利用されていないこと等の状況を判断して、投票では棄権票を投じる予定である。5) 中国より新規提案された生薬デンシチニンジンの品質に関する案件は、最終的に、タイトルから quality を削除すること、生産地と品質の関連を説明すること等の修正を加えた後、投票に進む事になった。その後、第 5 回会議の決定に従って投票にかけられ、賛成多数で NWIP として認められた。6) 中国より新規提案されたタンジンの種子と種苗に関する案件は、マイナーな修正を加えた上で投票に進む事になった。その後、第 5 回会議の決定に従って、投票にかけられ、賛成多数で NWIP として認められた。7) カナダより報告があったアメリカニンジン種子と種苗に関する案件は、最終的には本案件は PWI として残し今後発展させることとなった。なお、現在日本での本種の栽培生産はなく、使用量も少なく影響はない。一方、WG2 では少ない件数が良く議論されているが、やや進行に遅れが生じている。TC249 全体において、今後、タイトルとスコープがどのように決着するか、各国が各様の立場から正念場を迎えつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fuchino, H., Tanouchi, K., Daikonya, A., Wada, H., Iida, O., Sugimura, K., Kawahara, N.: Relationship between the inhibitory effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on nitric oxide production and the drying conditions after harvest, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **21** (1) 8-14 (2014).
- 2) Amakura, Y., Yamakami, S., Yoshimura, M., Yoshida, T., Fuchino, H., Goda, Y., Kawahara, N.: High Performance TLC Data of Representative Crude Drugs Available in Japanese Markets. *Pharmaceutical Regulatory Science*, **45** (6), 510-518 (2014).
- 3) Hayashi, S., Hishida, A., Fuchino, H., Takewaki, T., Wada, H., Kyogoku, H., and Kawahara, N.: Response of Growth and Shikonin Derivatives Content of *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zucc. under Different Soil Moisture Conditions, *The Japanese Journal of Pharmacognosy*, **68** (2), 58-64 (2014).
- 4) Zhu, S., Yu, X., Wu, Y., 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).
- 5) Matsumoto, Y., Yoshimatsu, K., Kawahara, N., Yamamoto, S., Niino, T.: In vitro propagation by node culture and cryopreservation by V-Cryo-plate method for *Perilla frutescens*. *Advances in Horticultural Science*, **28** (2), 79-83 (2014).
- 6) Kammoto, T., Yomura, K., Kikuchi, Y., Hirakura, K., Makino, B., Hashimoto, K., Nishimura, H., Usui, K., Hakamatsuka, T., Goda, Y., Kawahara, N., Kiuchi, F.: Discrimination between Prepared Glycyrrhiza and Glycyrrhiza by TLC. *The Japanese Journal of Pharmacognosy*, **68** (2), 70-77 (2014).
- 7) 林茂樹, 菱田敦之, 柴田敏郎, 川原信夫: 生薬の国産化と今後の課題. 川原信夫監修; 薬用植物・生薬の最前線, シーエムシー出版 (2014) p.1-8
- 8) 吉松嘉代, 乾貴幸: 植物工場における薬用植物の栽培と生育制御. 川原信夫監修; 薬用植物・生薬の最前線, シーエムシー出版 (2014) p.9-19
- 9) 洩野裕之: LC/MS, LC/NMR を用いた生薬・薬用植物の品質評価. 川原信夫監修; 薬用植物・生薬の最前線, シーエムシー出版 (2014) p.43-52
- 10) 村上則幸: 北海道における機械化薬用植物栽培の現状と今後の展望. 川原信夫監修; 薬用植物・生薬の最前線, シーエムシー出版 (2014) p.53-59
- 11) 小松かつ子, 朱妹: 生薬の多様性解析と標準化. 川原信夫監修; 薬用植物・生薬の最前線, シーエムシー出版 (2014) p.157-165
- 12) 合田幸広: 生薬・漢方処方 of 標準化と日本薬局方. 川原信夫監修; 薬用植物・生薬の最前線, シーエムシー出版 (2014) p. 66-172
- 13) 袴塚高志: ISOTC/249 における薬用植物・生薬の国際標準化について. 川原信夫監修; 薬用植物・生薬の最前線, シーエムシー出版 (2014) p.173-179
- 14) 安食菜穂子: 生薬ならびに漢方処方の品質評価 - 客観的な味の評価を目指して-. 和漢薬, 731, (2014) 1-5.
- 15) 乾貴幸: 閉鎖型植物生産施設における水耕栽培を用いた薬用植物生産の可能性. 和漢薬, 732, (2014) 2-4.
- 16) 川原信夫, 保富康宏, 米田悦啓: 医薬

- 基盤研究所における生物資源事業について. *ファルマシア* 50 (10), 983-987(2014).
- 17) 山口真輝: 寒冷地に適したハトムギ「北のはと」の栽培について—栽培と管理方法の検討—. *和漢薬*, 740 (2015) 6-11.
- 18) 菊池健太郎: トウキの大規模栽培化について. *和漢薬*, 741 (2015) 10-12.
- 19) 大根谷章浩, 渕野裕之: 生薬の一酸化窒素抑制活性と LC/MS メタボローム解析. 特集「漢方とアレルギー」月刊アレルギーの臨床 2014年8月号 p.78-81
- 20) 渕野裕之: 生薬の LC/MS, LC/MS/MS 分析. 中村洋監修「LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用」公益社団法人日本分析化学会編 オーム社 p.248-254
2. 学会発表
- 1) 木内文之: 生薬の品質評価と有効成分. 日本生薬学会第 61 回年会 (2014. 9. 13-14, 福岡)
- 2) 川原信夫: 生薬の国内栽培振興の動向. 日本生薬学会第 61 回年会 (2014. 9. 14, 福岡)
- 3) 川原信夫: 薬用植物資源の国内栽培振興の動向. 第 58 回日本薬学会関東支部大会シンポジウム (2014. 10. 4, 東京)
- 4) 河野徳昭, 乾貴幸, 吉松嘉代, 川原信夫: 薬用植物資源の遺伝子情報の基盤整備とその活用. 第 43 回生薬分析シンポジウム (2014, 11. 7, 大阪)
- 5) 山口真輝, 林茂樹, 菱田敦之, 川原信夫: 道北におけるハトムギ「北のはと」の栽培技術の確立に向けた研究—加里の施用効果について—. 日本生薬学会北海道支部第 38 回例会 (2014. 5. 24, 札幌)
- 6) 菊池健太郎, 菱田敦之, 林茂樹, 川原信夫: トウキの大規模化栽培に関する研究—ホッカイトウキのペーパーポット育苗栽培法—. 日本生薬学会北海道支部第 38 回例会 (2014. 5. 24, 札幌)
- 7) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾貴幸, 新穂大介, 田村幸吉, 川原信夫: 薬用植物の組織培養物バンクの確立—ウラルカンゾウについて. 第 32 回日本植物細胞分子生物学学会大会 (2014. 8. 21-22, 盛岡)
- 8) 乾貴幸, 河野徳昭, 川原信夫, 吉松嘉代: 水耕栽培を用いたセリバオウレン生産の可能性. 第 32 回日本植物細胞分子生物学学会大会 (2014. 8. 21-22, 盛岡)
- 9) Yoshimatsu, K., Kawano, N., Inui, T., Araho, D., Tamura, Y., Kawahara, N.: Establishment of tissue culture bank for *Glycyrrhiza uralensis* (Chinese licorice) International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (2014, 8. 10-15, Melbourne, Australia)
- 10) Anjiki, N., Fushimi, H., Fushimi, N., Kawahara, N., Goda, Y.: Origin of the 'Huashi' (滑石) in Taipei markets. The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (2014, 9. 13, Fukuoka, Japan)
- 11) 渕野裕之, 高橋みき子, 新井玲子, 川崎武志, 川原信夫: シコン中に含まれるピロリチジンアルカロイドについて. 日本生薬学会第 61 回年会 (2014. 9. 13-14, 福岡)
- 12) 熊谷健夫, 北澤尚, 矢口素行, 渕野裕之, 川原信夫: メハジキの栽培に関する研究—秋移植栽培の栽植密度と播種期が生育、収量に及ぼす影響—. 日本生薬学会第 61 回年会 (2014. 9. 13-14, 福岡)
- 13) 河野徳昭, 吉松嘉代, 鈴木秀幸, 斉藤和季, 川原信夫: 薬用植物のトランスクリプトーム情報の整備. 日本生薬学会第 61 回年会 (2014. 9. 13-14, 福岡)
- 14) 豊岡寛美, 土田貴志, 林茂樹, 菱田敦之, 柴田俊郎, 川原信夫: 蘇葉の品質及び生産に関する研究 (第 2 報) —シソの収量及び成分含量の季節的推移—. 日本生薬学会第 61 回年会 (2014. 9. 13-14, 福岡)