2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 ３０ 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ１４９６９
研究課題名（和文）産地横断的及び縦断的品質評価の戦略；漢方生薬４品目について

研究課題名（英文）Strategies for cross-sectional and longitudinal quality evaluation of cultivated area and the herbal medicine.

研究代表者
佐々木　陽平（Sasaki, Yohei）

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：１０３６６８３３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,500,000円

研究成果の概要（和文）：生薬は医薬品原料であることから安定した品質が要求される。しかし生薬は同時に、原植物の成育の過程では自然環境により、収穫後は人為的な加工条件を経ることにより必然的に品質のバラツキが生じるという性質を有している。すなわち生薬の品質のバラツキを産地間（横断的）および年次間（縦断的）で比較することの可能性を検討し、これにより「等級」分けの指標となる品質評価の要素および数値を設定することを試みた。金沢大学で試験栽培を進めている重要漢方生薬４品目（当帰、芍薬、地黄、麻黄）を中心に品質を調査した。

研究成果の概要（英文）：Herbal medicines are required to have stable quality. Herbal medicine inevitably has the property that there is variance in quality because of growing environment and processing conditions. I examined the possibility of comparing variations in the quality of herbal medicine between production areas (crossing) and between years (longitudinal). At the same time, I attempted to set the elements and numerical values of the quality evaluation that is an indicator of classification. The four important herbal medicines (Angelicae Acutilobae Radix, Paeoniae Radix, Rehmanniae Radix, Ephedrae Herba) currently being cultivated at the Medicinal Plant Garden in Kanazawa University were surveyed.

研究分野：薬用植物学、生薬学

キーワード：薬用植物栽培　生薬国産化　漢方生薬

１．研究開始当初の背景

日本の医療で使用される生薬は、その資源の８割以上を中国産に依存している現状にある（日本漢方生薬製剤協会「原料生薬使用量等調査報告書(3)、平成 27 年版」)。これを改善する目的で厚生労働省および農林水産省の後押しのもと、日本各地で薬草栽培の普及事業が進められている（例えば、薬用作物の産地化に向けたブロック会議、平成 25 年度より全国各地で開催)。しかし長年にわたり中国産に依存してきた日本は生薬生産技術がまだ確立していない。現在の日本に必要なことは、薬草栽培の面積を拡大するより生薬の生産方法を確立することが先決である。この問題を放置して栽培地の拡大のみを押し進めてしまうと、国産生薬の全体的な品質の低下という結果につながることが推察される。さらに深刻な問題は品質の低下を示す指標すら存在していないことである。

現在、生薬を取り扱っている医療機関やメーカーは安定した品質の生薬の安定供給を希望している。しかし現状では、その選択肢が限られているのが現状である。日本産生薬が流通し始める現在、産地間の品質の違いをも認識し、そのための指標を明示する必要がある。

２．研究の目的

生薬は天然品に由来するという性格上、同じ産地でも品質は毎年同一とは限らない。一方、医薬品原料として生薬は、安定した品質であることは必須事項である。希望する品質や価格の生薬を選択することが可能であった時代において、安定供給はそれほど大きな問題ではなかった。しかし地球規模での温暖化を始めとする環境変化や、人間活動の拡大による資源の枯渇問題が生じてきた。現状では、今年使用した生薬と同等品の生薬を、同価格で来年も確保できるかということが問題になりつつある。筆者は「バラツキのあるロット内から同等の品質の生薬を選ぶことができれば」この品質の問題を克服できると考えた。

現在、生薬の品質の基準となる指標として、五官によるものや日本薬局方の規定などがある。前者は熟練者による経験的な指標であり、その鑑定能力を有する人材は限られている。しかも日本産という新たな生薬が生産された場合、同様の指標が適用できるかは確証がない。後者は、数値的な規定であることから絶対的な比較が可能である一方、指標成分の最低濃度の規定が多い。すなわち不良品の足切りであり良品鑑別のための規定ではない。そこで本研究ではまず日本で栽培化が進む重要漢方生薬４品目（当帰、芍薬、地黄、麻黄）を対象にし、品質の特徴を調べることを目的とした。

３．研究の方法

(1) 当帰（*Angelica acutiloba* の根）

・材料：金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園で栽培、収穫および加工した当帰。

・糖含量の測定：試料粉末に水を加え超音波抽出。遠心分離後の上清に対し F-kit（J.K.インターナショナル社）により glucose、fructose、sucrose 含量を算出。

・希 EtOH エキス含量：第十七改正日本薬局方生薬試験法に準じた。

・主成分 ligustilide 分析（HPLC）

(2) 芍薬（*Paeonia lactiflora* の根）

・材料：金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園で栽培、収穫したシャクヤク。

・試料：収穫直後のシャクヤクの根、及び外皮（コルク層）を剥離した根を凍結乾燥で乾燥したもの。この粉末に 50% MeOH を加え超音波 25 min、遠心分離したもの。

・分析条件：Waters ACQUITY UPLC H-Class、カラム 2.5C18-MS-Ⅱ（2.0 mm I.D. ×100 mm)、溶媒 0.1% formic acid 水溶液及び、0.1% formic acid アセトニトリルの溶媒システム。解析波長 270 nm。

(3) 地黄（*Rehmannia glutinosa* の根）

・材料：金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園で栽培、収穫、加工した地黄。

・試料：凍結乾燥後、粉末にし、300 マイクロメートルの篩に通したものを使用。

・Catalpol の定量：試料に HPLC の移動相を添加（50 mg に対し水 1 mL を加える）し超音波抽出。HPLC にて測定。

・分析条件：カラム YMC-TriartC18（4.6 mm I.D. ×250 mm)、溶媒：アセトニトリル、リン酸水系の溶媒システム。測定波長 210 nm。

・希 EtOH エキス含量：第十七改正日本薬局方生薬試験法に準じた。

(4) 麻黄（*Ephedra sinica* の草質茎）

・植物材料：金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園及び石川県志賀町のマオウ試験栽培ほ場で栽培、収穫したマオウ。

・生薬材料：東京市場品麻黄。HPLC により総アルカロイド含量が 1.15% であることが既知である。

・試料：粉末にし、105 度で 15 時間乾燥したものを使用。

・総アルカロイドの分析条件：カラム COSMOSIL 5C18-MS-II（4.6 mm I.D. ×250 mm)、溶媒：アセトニトリル、水、リン酸、SDS 系の溶媒システム。測定波長 210 nm。

・TLC（Silica gel 60)：マオウの粉末を MeOH で抽出した上澄み。ブタノール、水、酢酸の溶媒システムで分析

・検出、定量：ニンヒドリン試薬の噴霧、加熱で呈色させ、デジタル画像を介して画像解析。

４．研究成果

(1) 当帰

・当帰は、原植物が収穫された後、自然乾燥および加温を伴うもみ洗いという工程を経る。この乾燥期間、もみ洗いのお湯の温度や時間など、当帰の品質に影響を与える多くの要因がある。奈良県大和地方など伝統的な生産地ではその環境に適した条件が採用されているが、新たな産地ではその条件が定まっていない。そこで、本研究ではもみ洗いの時間変化と含有成分の変化の関係を明らかにすることを目的で測定を行った。この関係は、伝統的な経験法のエビデンスの解明にもつながる情報となる。

含有成分として、当帰の味を左右していると考えられる糖類の定量を試みた。すなわち glucose (Fig.1)、fructose (Fig.2)、sucrose (Fig.3) である。

Fig.1 当帰中の glucose 含量の経時変化

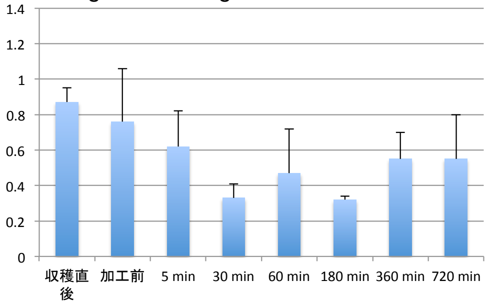


Fig.2 当帰中の fructose 含量の経時変化

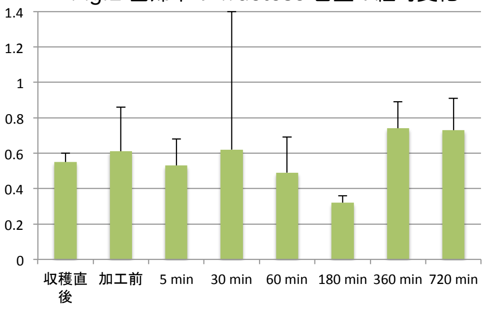
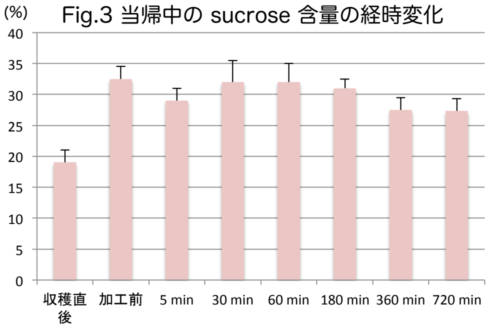


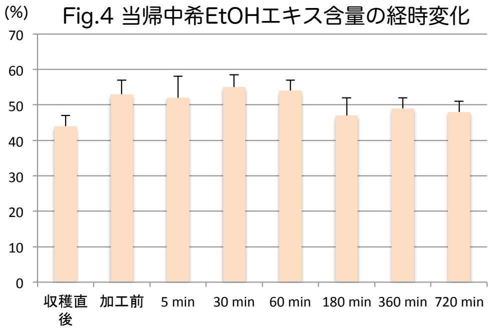
Fig.3 当帰中の sucrose 含量の経時変化



これらの結果から、約 180 分までは glucose と fructose が減少する傾向にあることが明らかになった。すなわちお湯への溶出が考えられる。その後は増加傾向にあることは、スクロースからの加水分解による生成であることが考えられる。

なお、この時間変化を通じて希 EtOH エキス含量はそれほど大きな変化がないことを明らかにした。いずれも日本薬局方の規定である 35%は充分満たしている。

Fig.4 当帰中希EtOHエキス含量の経時変化

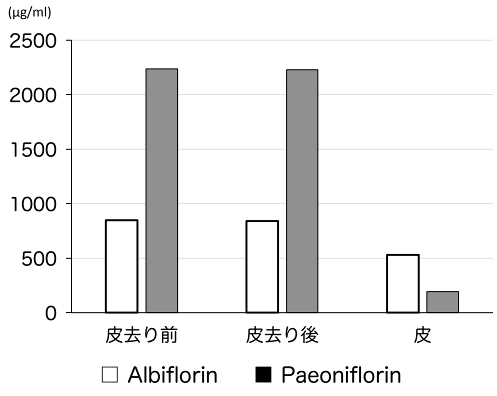


(2) 芍薬

・シャクヤクの加工は、一般的に、外皮を剥離し自然乾燥という工程である。本研究では外皮の剥離の時期、度合い、乾燥状況などと含有成分の関係を調べた。

外皮の剥離は回転ドラム式洗浄機等で行う事が多いが、その剥離の度合は当然ながら、回転時間で変化する。予試験として、根に含まれる albiflorin と paeoniflorin の含量を、外皮剥離前後で比較した図を示す (Fig.5)。この結果から、外皮の剥離の度合いでは、成分含有量が大きく変化しないことを明らかにした。

Fig.5シャクヤク根の皮去り前後の主要成分含量



(3) 地黄

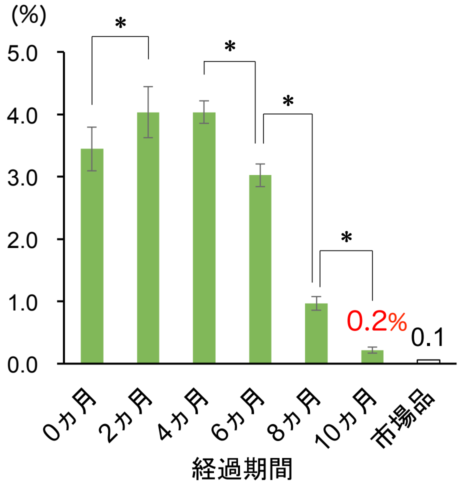
・地黄は、収穫後の乾燥において加熱工程を経ることが多い。加熱による影響で、根は黒変してしまう。本研究では温度を加えずに自然乾燥することで地黄を生産する条件を検討した。

まず、地黄の主成分とされる Catalpol は当初 ３%以上含まれているにも関わらず乾燥状態では 0.2%にまで減少することを明らかにした (Fig.6)。同時に、最初の２ヶ月は

むしろ増加していた。希 EtOH エキス含量試験でも同様の傾向を示した。

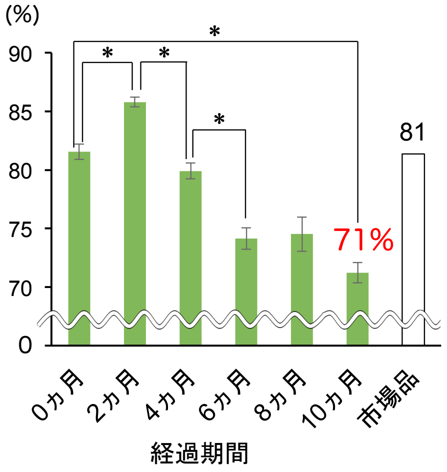
Catalpol の減少は、含有成分の量とも関係があることも明らかにした（data not shown)。

Fig.6 地黄中の catalpol 含量の経時変化



Mean±S.E. (n=3), ＊student's t-Test $p < 0.05$

Fig.7 地黄中の希EtOH含量の経時変化



Mean±S.E. (n=3), ＊student's t-Test $p < 0.05$

(4) 麻黄

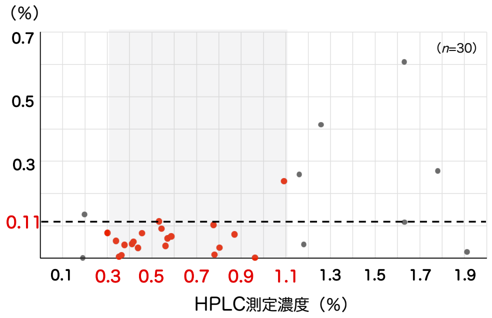
・麻黄は日本薬局方において総アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）を 0.7%以上含むと規定されている。しかし日本で麻黄の原植物を栽培した場合、この規定は非常に厳しい値であることが知られている。

最近、石川県志賀町にマオウ試験栽培ほ場が構築されつつあり、このから生産される麻黄の中には規定値を超えるものが出てきた。そこで本研究では、0.7%を超えているか否かを迅速に調べる方法として TLC による方法の確立を目指した。TLC 法は一般的な成分定量法である HPLC と比較して、操作時間および価格面でも非常に有利である。

TLC での成分展開後ニンヒドリンによる呈色、デジタル画像による解析で検量線とともに測定した。この値を同時並行で HPLC 分析を実施し値を相互に比較した（Fig.8)。

本結果から我々が開発した TLC による定量法は、日本薬局方の規定値である 0.7% 付近の値は 0.11%以下の誤差範囲で定量可能であることを明らかにした。

Fig.8 HPLC測定濃度とTLC測定濃度の絶対誤差*



＊（絶対誤差）＝ | (TLC測定濃度)ー(HPLC測定濃度) |

5．主な発表論文等

〔学会発表〕（計 6 件）

(1) 伊藤幸祐、上野睦美、安藤広和、佐々木陽平、トウキの湯もみによる成分変化−温度と時間について。日本生薬学会第 64 回年会（千葉）、2017 年 9 月 9-10 日。

(2) 辻野舞、安藤広和、佐々木陽平、ジオウの乾燥過程における成分変化。薬用植物栽培研究会 45 周年記念講演会（甲州市）、2017 年 7 月 15-16 日。

(3) 織田枝里子、安藤広和、佐々木陽平、麻黄に含まれるエフェドリンの簡易測定法の開発。日本薬学会 138 年会（金沢）、2018 年 3 月 26-28 日。

(4) 上野睦美、伊藤幸祐、安藤広和、佐々木陽平、石川県における当帰の加工条件について。第 33 回和漢医薬学会学術大会（東京）、2016 年 8 月 27-28 日。

(5) 上野睦美、安藤広和、佐々木陽平、石川県における当帰の生産を目指して。日本生薬学会第 62 回年会（岐阜）、2015 年 9 月 11-12 日。

(6) 佐々木陽平、シンポジウム「日本の GACP を考える」におけるシンポジストとして；大学・薬用植物園ができること−取り組みの紹介。日本生薬学会第 62 回年会（岐阜）、2015 年 9 月 11-12 日。

6．研究組織

(1)研究代表者

佐々木　陽平（SASAKI Yohei）
金沢大学薬学系・准教授
研究者番号：10366833

(2)研究協力者
　安藤　広和 (ANDO Hirokazu)

(3)研究協力者
　辻野　舞 (TSUJINO Mai)

(4)研究協力者
　伊藤　幸祐 (ITO Kosuke)