

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07151

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた生薬のDNA鑑定法の構築

研究課題名(英文)Development of origin identification method for crude drugs using next-generation sequencer

研究代表者

中西 宏明(Hiroaki, Nakanishi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90392274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いて、生薬のミトコンドリアDNAを分析することにより、動物生薬の基原動物種を推定する方法を開発した。本法は、2種類の生薬混合物において、少なくとも5%のmtDNAが含まれている場合、マイナー成分を検出できた。これは、生薬の正規品に類似品(基原動物が異なる)が混合した場合に有用である。また、市販されている動物由来生薬が主成分の漢方製剤では、およそその組成(含有している動物種)を把握できた。一方、安価で持ち運び可能な小型次世代シーケンサーであるMinIONでも本法を適用できたことから、生薬の原産地(フィールドワーク)でも検査が可能になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した方法は、動物生薬の基原動物種を客観的に判別できるだけでなく、粉末状になっても検査ができ、熟練度も不要である。また、基原動物の異なる類似品が混合されていた場合でも、それを見破ることが可能である。一般に次世代シーケンサーは高額な機器であるが、安価な小型次世代シーケンサーでもある程度適用できるようにし、この方法を多くの人々が利用できるようにした。さらに小型次世代シーケンサーは持ち運び可能であることから、現地でリアルタイムに生薬の基原動物鑑定ができるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a method that can detect each animal species of origin for crude drugs derived from multiple animal species by analyzing mitochondrial DNA of crude drugs using a next generation sequencer. This method could detect minor contents from mixtures of two animals, if the mixtures contained at least 5% mtDNA. Therefore, it was suggested that this method is useful for detection of non-standard crude drugs, which origin animal species is different from standard, included in standard crude drugs. Moreover, this method could also roughly estimate the compositions of a commercial Kampo drugs. On the other hand, this method also can apply to the MinION which is portable next generation sequencer, so the species of origin of crude drugs could be identified in field work.

研究分野：法生物学

キーワード：動物生薬 基原 次世代シーケンサー ミトコンドリアDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では、生薬は薬事法で医薬品として認められているため、医薬品・医薬部外品・健康食品として幅広く使用されている。日本薬局方収載生薬では基原生物が定められており、生薬総則では、生薬の基原は適否の判断基準となっている。生薬は主に、薬用となる植物または動物の特定の部位を乾燥したものであり、多くの場合は基原生物が生息もしくは栽培されている所からは遠く隔たった市場で取引されている。そのため、基原生物が異なる類似品が出回る可能性があり、高品質な製品を市場に安定供給することは、生薬の品質管理にとって重大な課題である。遼寧省の大連の生薬市場では、約 800 種類の生薬のうち 180 種類の偽生薬が見つかったとの報告がある(中国中医薬報:2006年)。したがって、生薬の鑑別・同定は、その品質管理に不可欠となっている。

生薬の鑑別・同定法としては、官能試験法、外部形態や内部組織の構造を比較する形態学的方法、含有化学成分を比較する化学的方法などが用いられてきた。しかしながら、これらの方法で用いられる鑑別指標(形態や含有化学成分)はいずれも生物(生薬)の表現形質であり、生育環境や生物ステージによって変動する。このような表現形質を鑑別指標とする生薬の鑑別・同定法は、この点に欠陥がある。また、形態学的方法では、例えば粉末状など、大きく形態が変わった場合、鑑別することが難しくなる。

一方、分子生物学的な技術の進歩と遺伝子情報の蓄積に伴い、生薬についても分子生物学的な手法による鑑別法が多く発表されており、生薬の DNA 鑑定ができる環境が整いつつある。分子生物学的手法は、生薬の形状に関係なく検査でき、鑑別のための専門知識と熟練を必要とせず、客観的な結果が得られやすい等の利点があるが、現在ではあまり浸透しているとは言えない。その原因として、従来の報告では生薬と一対一のプライマーセットで遺伝子増幅させる手法が多いため、生薬の種類ごとにプライマーを設計しなくてはならず、汎用性に乏しいこと、また、DNA 抽出法が生薬によって様々であるため、導入しにくいこと、さらには、基原生物の異なる類似品が一定の割合で混ぜられていた場合には適用が難しいことが挙げられる。このうち、動物由来生薬の DNA 抽出法に関しては、統一した手法を確立されており、残る 2 つの課題も NGS を用いることにより解決できる可能性がある。NGS による生薬の DNA 鑑定法が確立されれば、生薬の基原生物が明らかになるのはもちろんのこと、類似品の混合割合や、産地、ロットの違い等も明らかになる可能性があり、従来の鑑定法では困難であった品質管理ができるようになるであろう。NGS による生薬の DNA 鑑定の導入によって、生薬の品質管理の限界に迫ることができるともかもしれない。NGS は今や汎用機器であり、解析コストも多検体・多領域では、従来の解析法より安価で簡便であり、NGS の導入はハードルが低くなっている。NGS による生薬の DNA 鑑定が導入されれば、生薬の品質管理は大きく変わることになるであろう。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NGS による動物由来生薬の基原鑑別法を構築することである。そのためにまず、NGS の汎用機器(イルミナ社 MiSeq 等)で確実に基原生物を特定できるのかを確認する。次に、NGS の特長を活用した鑑定方法として、生薬の正規品に基原動物が異なる類似品が混入されたことを想定し、混入された類似品の基原動物種を推定する方法を確立する。最後に、小型で安価な NGS である MinION について、基原動物鑑別に有用かどうか、さらに現地での鑑定(フィールドワーク)にも適用可能であるかを評価する。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

鹿茸(アカシカ由来; 正規品、トナカイ由来; 類似品)、五霊脂(ミケモモンガ由来; 正規品、モルモット由来; 類似品)、蛇胆(ニシキヘビ由来; 正規品、ミズオオトカゲ由来; 類似品)、牛黄、熊胆、麝香、蝉退(ミンミンゼミ由来、アブラゼミ由来; どちらも正規品)を用いた。これらの生薬は、いずれも日本の漢方薬局または漢方薬メーカーから、なるべく原型に近い形で入手した。また、動物由来生薬から成る市販の漢方製剤 2 種も用いた。

(2) DNA 抽出

サンプルを破砕機で粉末状にし、1.5 mL のサンプルチューブに入れた(1本につき 50 mg 以下)。チューブに ATL(キアゲン)を 200 μ L と Proteinase K(キアゲン)を 20 μ L を加え、56 でオーバーナイト処理した。続いて、TE 飽和フェノールを 500 μ L 加え、30 秒間よく混和したのち、15,000 rpm \times 10 分で遠心分離を行い、上清を分取した。上清に AL(キアゲン)を 200 μ L を加え、混和したのち、70 で 10 分間感作させた。続いて、100%エタノールを 200 μ L を加え、よく混和したのち、QIAamp DNA Mini Kit(キアゲン)のカラムにアプライし、8,000 rpm \times 1 分間、遠心分離した(この時、複数のチューブを用いている場合は、遠心分離を繰り返し、1本のカラムにまとめた)。カラムに AW1(キアゲン)を 500 μ L を加え、8,000 rpm \times 1 分間、遠心分離したのち、AW2(キアゲン)を 500 μ L を加え、14,000 rpm \times 3 分間、遠心分離した。最後に、カラムに Buffer EB(キアゲン)を 60 μ L を加え、10 分間静置したのち、8,000 rpm \times 1 分間で遠心分離をして、DNA 溶液を溶出させた。

混合サンプルとして、鹿茸についてはアカシカ由来のものとトナカイ由来のものを、五霊脂についてはミケモモンガ由来のものとモルモット由来のものをミトコンドリア DNA のコピー数を基準に任意の割合で DNA 抽出溶液を混合した。

(3) MiSeq による解析法

ターゲットとした遺伝子は、遺伝子での系統解析でよく用いられるミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域、12S rRNA 領域および Cytochrome Oxidase I (COI) 領域とした。用いたプライマーは表 1 の通りである。

表 1 MiSeq のライブラリ作製に用いたプライマー
(12S-C は 12S rRNA の蝉退専用プライマー、下線部はタグ配列)

Primer set	Direction	Sequence (5'-3')
12S	Forward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> CCCAAACTGGGATTAGATACC
	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTACAGAACAGGCTCCTCTAG
16S	Forward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GCCTGTTACCAAAAACATCAC
	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT
COI	Forward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC
	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTANACYTCNNGRTGNCCRAARAAYCA
12S-C	Forward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> AACTAGGATTAGATACCTATTAT
	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAGAGCGACGGCGCATGTGT

PCR は、20 μ L の反応液中に 10 μ L の KOD One PCR Master Mix (東洋紡)、1 μ L の 10 μ M プライマーミックス(最終濃度;各 0.5 μ M)、1 μ L の抽出 DNA 溶液(10 ng/ μ L 以下)を含み、SimpliAmp サーマルサイクラーで 98 10 秒、55 5 秒、68 1 秒を 40 サイクルで実施した。ライブラリ作製は Nextra XT Index Kit (イルミナ) を用い、MiSeq Reagent Kit v2 500 Cycle Kit (ライブラリ最終濃度 8 pM、PhiX 濃度 20%、paired-end, 251 reads) にて分析した。

解析は、CLC Genomics Workbench 12 (キアゲン) を用い、エクセルにより同じ変異パターンを持つリードをまとめた(以後、「ハプロタイプ」とする)。それぞれの領域において、全リード数の 5% (生薬) または 1% (漢方製剤) を超える出現割合を持つハプロタイプを「有効ハプロタイプ」とし、その塩基配列を BLAST で相同性検索した。

(4) MinION による解析法

ターゲット遺伝子はミトコンドリア DNA の COI 領域とし、PCR は、20 μ L の反応液中に 10 μ L の KOD One PCR Master Mix (東洋紡)、1 μ L の 10 μ M プライマーミックス(最終濃度;各 0.5 μ M)、1 μ L の抽出 DNA 溶液(10 ng/ μ L 以下)を含み、SimpliAmp サーマルサイクラーで 98 10 秒、55 5 秒、68 1 秒を 40 サイクルで実施した。ライブラリ作製は Ligation Sequencing kit (オックスフォードナノポアテクノロジー) を用い、R10.3 フローセルにてシークエンスした。なお、プライマーは Forward (5'-CTGTACTAGCAGCCGAATTA-3')、Reverse (5'-CAGACTATTCCTATGTACCCAAATG-3') の配列とした。

ベースコールは MinKNOW ソフトウェアを用い、Fast モードと High-accuracy モードのそれぞれで実施した。解析は、CLC Genomics Workbench 20 を用い、IGV ソフトウェアにてリードを可視化した。IGV ソフトウェアにてコンセンサス配列を得て、その塩基配列を BLAST で相同性検索した。

(5) MinION のフィールドワークへの応用

10 mg の粉末サンプルを用い、Kaneka Easy DNA Extraction Kit ver. 2 (カネカ) を用いて DNA を抽出した。ライブラリは、Rapid Sequencing Kit (オックスフォードナノポアテクノロジー) を用いて調製し、Flongle フローセル(R 9.4.1; オックスフォードナノポアテクノロジー)にてシークエンスした。Fast モードにてベースコールし、解析は上記(4)と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 単一基原サンプルの分析

鹿茸および五霊脂の単一基原サンプルについて分析した。その結果、五霊脂では正規品、類似品のいずれも COI 領域が増幅されなかったため、分析は行わなかった。12S rRNA および 16S rRNA 領域では、すべてのサンプルで、各生薬に対応する動物が検出され、かつ、予想された動物以外の陽性ハプロタイプは検出されなかった。したがって、次世代シークエンサーを用いての基原動物種の推定は可能であることが明らかになった。

(2) 混合サンプルの分析

鹿茸の正規品と類似品の混合サンプルについて分析した。その結果、観察されたハプロタイプ比は、12S rRNA と 16S rRNA 領域では混合比にほぼ対応していたものの、COI 領域ではアカシカの割合が多くなる傾向があり、混合比と若干の差異がみられた。また、マイナー成分の検出限界に関しては、少なくとも 19 : 1 の割合であれば、検出することが可能であった。

五霊脂の正規品と類似品の混合サンプルの分析については、16S rRNA 領域では観察されたハプロタイプ比と実際の混合比はほぼ対応していたが、12S rRNA 領域では混合比と若干の差異がみられた。

鹿茸、五霊脂ともに、検出された混合比は解析領域間で多少の違いがみられたが、おおむね実際の混合比と一致していた。これは、プライマー配列と各動物の配列との相同性の違いによるものと考えられる。また、5%のマイナー成分混入でも検出できることから、次世代シーケンサーによる分析は、類似品混入を明らかにするのに有用であることが判明した。

表2 鹿茸の正規品と類似品の混合サンプルにおける分析結果

A:B	Haplotype	12S		16S		COI	
		Ratio against total reads (%)	Origin expected	Ratio against total reads (%)	Origin expected	Ratio against total reads (%)	Origin expected
1:1	1st	44.60	<i>Cervus elaphus</i>	38.48	<i>Rangifer tarandus</i>	54.22	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	41.13	<i>Rangifer tarandus</i>	33.96	<i>Cervus elaphus</i>	25.54	<i>Rangifer tarandus</i>
	3rd	2.77	-	2.96	-	2.22	-
2:1	1st	56.73	<i>Cervus elaphus</i>	47.56	<i>Cervus elaphus</i>	61.47	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	30.20	<i>Rangifer tarandus</i>	26.35	<i>Rangifer tarandus</i>	16.75	<i>Rangifer tarandus</i>
	3rd	2.07	-	3.10	-	2.44	-
4:1	1st	69.47	<i>Cervus elaphus</i>	59.93	<i>Cervus elaphus</i>	71.10	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	19.85	<i>Rangifer tarandus</i>	17.51	<i>Rangifer tarandus</i>	11.96	<i>Rangifer tarandus</i>
	3rd	1.28	-	2.32	-	2.90	-
9:1	1st	78.72	<i>Cervus elaphus</i>	69.92	<i>Cervus elaphus</i>	77.94	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	10.41	<i>Rangifer tarandus</i>	9.40	<i>Rangifer tarandus</i>	5.75	<i>Rangifer tarandus</i>
	3rd	0.67	-	1.62	-	2.83	-
19:1	1st	84.77	<i>Cervus elaphus</i>	78.70	<i>Cervus elaphus</i>	81.69	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	5.41	<i>Rangifer tarandus</i>	5.12	<i>Rangifer tarandus</i>	3.52	-(<i>Rangifer tarandus</i>)
	3rd	0.44	-	0.83	-	2.88	-
39:1	1st	87.86	<i>Cervus elaphus</i>	84.80	<i>Cervus elaphus</i>	83.63	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	2.56	-(<i>Rangifer tarandus</i>)	1.85	-(<i>Rangifer tarandus</i>)	2.94	-(<i>Rangifer tarandus</i>)
	3rd	0.60	-	0.43	-	1.46	-

リード数の多い上位3番目までを掲載、有効塩基配列は5%以上の割合を持つハプロタイプ
A:アカシカ (*Cervus elaphus*)基原、B:トナカイ (*Rangifer tarandus*)基原

表3 2種類の漢方製剤(A,B)における分析結果

Sample	Haplotype	12S		16S		COI	
		Ratio against total reads (%)	Origin expected	Ratio against total reads (%)	Origin expected	Ratio against total reads (%)	Origin expected
漢方製剤 A	1st	69.22	<i>Cervus elaphus</i>	66.91	<i>Cervus elaphus</i>	30.71	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	5.28	<i>Cervus elaphus</i>	6.00	<i>Cervus nippon</i>	21.85	<i>Cervus elaphus</i>
	3rd	5.06	<i>Saiga tatarica</i>	3.87	<i>Saiga tatarica</i>	6.70	<i>Saiga tatarica</i>
	4th	-	-	-	-	2.91	<i>Cervus elaphus</i>
	5th	-	-	-	-	2.75	<i>Cervus elaphus</i>
	6th	-	-	-	-	2.74	<i>Bufo gargarizans</i>
	7th	-	-	-	-	2.61	<i>Cervus nippon</i>
漢方製剤 B	1st	24.05	<i>Cervus elaphus</i>	35.94	<i>Arctocephalus pusillus</i>	17.67	<i>Cervus elaphus</i>
	2nd	22.74	<i>Arctocephalus pusillus</i>	10.57	<i>Cervus elaphus</i>	8.28	<i>Cervus elaphus</i>
	3rd	14.30	<i>Arctocephalus pusillus</i>	6.42	<i>Phoca groenlandica</i>	7.75	<i>Arctocephalus pusillus</i>
	4th	9.31	<i>Phoca groenlandica</i>	2.57	<i>Cervus nippon</i>	5.70	<i>Cervus elaphus</i>
	5th	1.97	<i>Bos taurus</i>	1.62	<i>Bos taurus</i>	4.85	<i>Cervus elaphus</i>
	6th	1.85	<i>Cervus elaphus</i>	1.50	<i>Callorhinus ursinus</i>	3.05	<i>Cervus elaphus</i>
	7th	1.20	<i>Cervus elaphus</i>	1.40	<i>Cervus elaphus</i>	2.95	<i>Elaphe carinata</i>
	8th	-	-	1.38	<i>Cervus elaphus</i>	2.87	<i>Phoca groenlandica</i>
	9th	-	-	-	-	2.50	<i>Arctocephalus pusillus</i>
	10th	-	-	-	-	2.42	<i>Cervus elaphus</i>
	11th	-	-	-	-	1.50	<i>Arctocephalus pusillus</i>
	12th	-	-	-	-	1.47	<i>Arctocephalus pusillus</i>
	13th	-	-	-	-	1.37	<i>Arctocephalus pusillus</i>
	14th	-	-	-	-	1.13	<i>Cervus elaphus</i>

有効塩基配列は1%以上の割合を持つハプロタイプ
Cervus elaphus:アカシカ、*Saiga tatarica*:サイガ(オオハナレイヨウ)、*Bufo gargarizans*:アジアヒキガエル、*Arctocephalus pusillus*:ミナミアフリカオットセイ、*Phoca groenlandica*:タテゴトアザラシ、*Bos taurus*:ウシ、*Cervus nippon*:ニホンジカ、*Callorhinus ursinus*:キタオットセイ、*Elaphe carinata*:シュウダ(ナミヘビ科のヘビ)

(3)漢方製剤の分析

漢方製剤Aは、添付文書より、ロクジョウ、レイヨウカク、センソ、ゴオウ、動物胆を含有するが、このうち、本法による分析では、ゴオウと動物胆が検出されなかったものの、他の成分は検出できた。12S rRNA 領域において、0.94%の割合を持つハプロタイプが「ウシ」の配列であったため、閾値を検討する必要があると考えられた。

漢方製剤Bは、添付文書より、カイクジン、ゴオウ、ロクジョウ、ハンピ、シベットを含有

するが、このうちシベットののみが検出できなかった。シュウダを検出したが、ハンピは一般的には「ニホンマムシ」が基原動物であるが、シュウダはニホンマムシの代わりにハンピとして用いられていることが示唆された。

本法は、市販の漢方製剤からも分析可能であったが、添付文章に含まれるすべての動物生薬を検出できたわけではなく、解析領域間で検出される動物種の数に多少の違いもみられた。これは、プライマー配列と各動物の配列との相同性の違いによるものと考えられる。

(4) MinION による分析

MinION のベースコールには、Fast モードと High-accuracy モードがあるが、Fast モードでもすべての生薬で基原種の推定は可能であった。鹿茸の正規品と類似品の混合サンプルでは High-accuracy モードを用いる必要があるものの、アカシカの塩基配列でトナカイの DNA もアライメント可能で、19:1 の混合比までであれば、マイナー成分を検出・同定できた。一方、ミズオオトカゲ由来の蛇胆は、ニシキヘビの塩基配列ではアライメントできず、これらの混合サンプルの場合、基原種の同時検出は困難であると考えられた。Fast モードは解析時間が数時間で済み、基原種推定に有効であることが示唆されたが、High-accuracy モードは MinKNOW での解析に膨大な時間がかかるため、混合サンプルの解析は従来の次世代シーケンサーを用いた方が良いと思われた。

(5) フィールドワークへの応用

MinION による分析をフィールドワークに適用するため、DNA 抽出、ライブラリ調製およびシーケンシングを簡素化した。抽出試薬は、サンプルに溶液を混ぜてインキュベートするだけであるが、MinION のライブラリ作製に適した量と質の DNA が抽出できた。この検討では、鹿茸の正規品と類似品を用いたが、どちらも基原の推定に成功した。また、ライブラリは 30 分以内で調製でき、フローセルは使い捨てであることから、フィールドワークに十分適用できるものと考えられた。

表 4 MinION における分析結果 (Fast モードと High-accuracy モードの違い)

Samples	Species of origin	BLAST result	Concordance rate	
		Origin expected	Fast mode	High-accuracy mode
鹿茸	<i>Cervus elaphus</i>	<i>Cervus elaphus</i>	706/717 (98%)	719/725 (99%)
	<i>Rangifer tarandus</i>	<i>Rangifer tarandus</i>	669/715 (94%)	716/727 (98%)
熊胆	<i>Ursus thibetanus</i>	<i>Ursus thibetanus</i>	710/725 (98%)	719/730 (98%)
牛黄	<i>Bos taurus</i>	<i>Bos taurus</i>	715/723 (99%)	718/726 (99%)
麝香	<i>Moschus chrysogaster</i>	<i>Moschus chrysogaster</i>	705/726 (97%)	713/727 (98%)
蛇胆	<i>Malayopython reticulatus</i>	<i>Malayopython reticulatus</i> ^{*1}	719/728 (99%)	727/736 (99%)
	<i>Varanus salvator</i>	Mapping impossible ^{*1}	-	-
	<i>Varanus salvator</i>	<i>Varanus salvator</i> ^{*2}	674/680 (99%)	676/680 (99%)
蝉退	<i>Oncotympana maculaticollis</i>	<i>Oncotympana maculaticollis</i> ^{*3}	734/739 (99%)	744/749 (99%)
	<i>Graptosaltria nigrofuscata</i>	<i>Graptosaltria nigrofuscata</i> ^{*3}	716/728 (98%)	724/729 (99%)

1: *Malayopython reticulatus* (ニシキヘビ) でアライメント

2: *Varanus salvator* (ミズオオトカゲ) でアライメント

3: *Oncotympana maculaticollis* (ミンミンゼミ) でアライメント

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi Hiroaki, Yoneyama Katsumi, Hara Masaaki, Takada Aya, Saito Kazuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Estimating included animal species in mixed crude drugs derived from animals using massively parallel sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85803-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西 宏明、米山 克美、原 正昭、高田 綾、齋藤 一之
2. 発表標題 基原動物が複数混合した生薬における個々の基原動物推定法（第2報）
3. 学会等名 日本薬学会第 141 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西 宏明、米山 克美、原 正昭、高田 綾、齋藤 一之
2. 発表標題 基原動物が複数混合した生薬における個々の基原動物推定法
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------