

## 薬効解析センター

助教授 小松 かつ子 (薬学博士)

助手 東田 千尋 (薬学博士)

本センターは、世界各地の民族薬物に関する資料の収集及び整理、薬効の評価及び解析並びにデータベースの構築を行い、世界の伝統薬物及び薬用植物に関する共同研究を推進することを目的としている。主な研究課題と本年度の成果は下記のとおりである。

### I. 伝統薬物に関するデータベース (ETHMED) の構築

### II. 薬効の評価と解析に関する研究

中国医学など世界の伝統医学で用いられる生薬並びに方剤の、難治性の神経疾患やそう痒症に対する有効性の検討とそれらの薬理作用の機序に関する研究

### III. 生薬の品質評価に関する研究

1. 遺伝子解析による生薬の同定法開発に関する研究
2. 生薬の基源と品質に関する研究

### IV. 世界の伝統医薬学の調査研究

#### 本年度の研究成果 (研究課題項目)

##### 1. 遺伝子解析による生薬の同定法開発に関する研究 (III-1)

ウコギ科 *Panax* 属の地下部に由来する「人参」、 「竹節人参」、 「広東人参」は、18S rRNA 遺伝子の塩基配列 (1809 塩基対) がそれらの原植物 *P. ginseng*, *P. japonicus*, *P. quinquefolius* の配列とそれぞれ一致し、各々は上流から 497, 499, 501, 712 番目の塩基の位置で置換が認められた。そこで、3 種の人参類生薬の簡便な鑑別法を開発する目的で、塩基配列の差異に基づいて制限酵素 *Ban* II, *Dde* I を選び PCR-RFLP 分析を行い良好な結果を得た。さらに、499, 501 番目にプライマーの 3' 末端が位置するように 3 種に特異なプライマーを合成し、これらを用いて *Panax* 属の地下部及び人参類生薬から得られた全 DNA を鋳型として PCR 反応を行い、各々のプライマーに対応する植物及び生薬でのみ増幅が認められる反応条件を設定した〔原著 1〕。

##### 2. 生薬の基源と品質に関する研究 (III-2)

1) 升麻：発疹性熱性疾患などに頻用され、また異物同名品の多い生薬として知られている「升麻」市場品の同定法を確立する目的で、キンポウゲ科 *Cimicifuga* 属 9 種〔原著 2〕、ユキノシタ科 *Astilbe* 属 7 種 2 変種、バラ科 *Aruncus* 属 1 種 1 変種〔原著 3〕、キツネノマゴ科 *Strobilanthes* 属 1 種及びキク科 *Serratula* 属 1 種〔原著 4〕の地下部の組織形態を検討した。その結果、各属各種は Table 1 に示す形質により組織分類が可能であり、中国、日本、韓国市場品の原植物として Table 2 に示す種を確証した。市場品の多くは *Cimicifuga* 属に由来し、その内日本市場品は *C. heracleifolia*, *C. dahurica* 及び *C. foetida* の根茎であった。なお、画像解析装置を用いて二次木部の年輪様構造を数値化することにより、*C. heracleifolia* と *C. dahurica* の組織学的差異を明確にできた〔原著 2〕。

Table 1. Key for Identification of the Botanical Origins of Chinese Crude Drug “Shengma” and Its Related Drugs on the Basis of Anatomical Characteristics of the Rhizomes of *Cimicifuga*, *Astilbe*, *Aruncus* and *Strobilanthes* species, and of the Roots of *Serratula* species\*

1. Endodermal cell is absent or several cells present.
  2. Endodermal cell is absent or several cells present, ray parenchyma is not sclerified, and clustered crystal is absent.
    3. Growth ring in secondary xylem is obvious.
      4. Most of big vessels appear in tangential band and interfascicular cambium is obvious.
        5. The vessels within a growth ring are bigger in the early xylem than in the late xylem ( $Cor(v) ** > 0.40$ ) ..... *Cimicifuga heracleifolia*
        5. No difference between the size of vessels in the early xylem and that in late xylem is observed ( $Cor(v) ** < 0.30$ ) ..... *C. dahurica*
      4. Big vessels are diffuse and interfascicular cambium is obscure or partly seen.
        6. Several or a few endodermal cells are present.
          7. Rhizome is 4~14 mm in diameter and its cortex is 300~550  $\mu\text{m}$  thick without sclereids. Ray parenchyma of stem residue is not sclerified ..... *C. simplex* from China
          7. Rhizome is 12~38 mm in diameter and its cortex is 500~1600  $\mu\text{m}$  thick with sclereids. Ray parenchyma of stem residue is often sclerified ..... *C. simple* from Japan
        6. Endodermis is absent.
          8. Interfascicular cambium is obscure and the number of vessels per bundle within a growth ring is 45~130. Ray parenchyma of stem residue is usually sclerified ..... *C. foetida*
          8. Interfascicular cambium is partly seen and the number of vessels per bundle within a growth ring is 22~62. Ray parenchyma of stem residue is not sclerified.
            9. Cortex is 580~830  $\mu\text{m}$  in thickness and the maximum number of sclereids over each vascular bundle is above 60 ..... *C. yunnanensis*
            9. Cortex is 850~1000  $\mu\text{m}$  in thickness and the maximum number of sclereids over each vascular bundle below 15 ..... *C. nanchuanensis*
      3. Growth ring in secondary xylem is obscure.
        10. Endodermis is present and the parenchyma of pith is not sclerified ..... *C. brachycarpa*
        10. Endodermis is absent and the parenchyma of pith is usually sclerified.
          11. Sclereids are abundant in cortex and the maximum number of sclereids over each vascular bundle is 20~68 ..... *C. acerina*
          11. Sclereids are sparse in cortex and the maximum number of sclereids over each vascular bundle is below 20 ..... *C. japonica*
  2. Endodermis is absent, ray parenchyma is sclerified, and clustered crystal is present ..... *Aruncus sylvester* var. *sylvester*  
*Ar. sylvester* var. *tenuifolius*
1. Endodermal cells are present in circle.
  12. Secretory canal is absent.
    13. The vessels of secondary xylem have scalariform perforation, and clustered crystal is present.
      14. Growth ring in secondary xylem is obvious, and ray parenchyma is not sclerified.
        15. Most of big vessels are banded in early xylem ( $Cor(v) ** > 0.45$ ) .
          16. Thin-walled xylem parenchyma cells appear in tangential band in which most of big vessels are present ..... *Astilbe chinensis*
          16. Big vessels are present in banded parenchyma and next lignified tissue.
            17. Endodermal cell has obvious saparian strip, and the number of vessels per bundle is 42~93\*\* ..... *As. microphylla*
            17. Casparian strip of endodermal cell is faint, and the number of vessels per bundle is 23~40\*\* ..... *As. macrocarpa*
        15. Some of big vessels are diffuse ( $Cor(v) ** < 0.58$ ) .
          18. Thin-walled parenchyma is obviously banded ..... *As. grandis*
          18. Thin-walled parenchyma is somewhat banded.
            19. Vascular bundles are 14~20 in number, and interfascicular cambium is partly seen ..... *As. japonica*
            19. Vascular bundles are 20~40 in number, and interfascicular cambium is obvious ..... *As. thunbergii* var. *thunbergii*  
*As. thunbergii* var. *congesta*
      14. Growth ring in secondary xylem is obscure, and ray parenchyma cell is sclerified.
        20. Vascular bundles are 28~45 in number, and the clustered crystal is 57~82  $\mu\text{m}$  maximum diameter ..... *As. rivularis* var. *rivularis*
        20. Vascular bundles are 60~78 in number, and the clustered crystal is 100~140  $\mu\text{m}$  in maximum diameter ..... *As. rivularis* var. *angustifoliolata*
    13. The vessels of secondary xylem have simple perforation, and cystolith is present ..... *Strobilanthes forrestii*
  12. Secretory canal is present ..... *Serratula chinensis*

\*The transection of rhizome between two neighboring stem residues is observed in *Cimicifuga*, *Astilbe*, *Aruncus* and *Strobilanthes* species and that of root in the middle part, in *Serratula* species. As for *Cimicifuga* species, the rhizome with more than 5 stem residues is chosen and the transection of stem residue also observed.

\*\*Each value is measured on second-year growth region by Image Analysis System.  $Cor(v)$  indicates the correlation coefficient between the diameter of vessels and the position of vessels in radial direction.

2) 花椒及び山椒：中国産 *Zanthoxylum* 属 *Fagara* 亜属 8 種の果皮及び花柄の組織形態学的特徴を走査顕微鏡 (SEM) を多用して精査し、これまでに報告した *Zanthoxylum* 亜属 8 種 3 変種 1 品種の特徴と併せて、「花椒」及び「山椒」市場品を同定するための組織分類法を確立した。中国では、*Z. bungeanum* と *Z. armatum* var. *subtrifoliatum* の果皮が同程度流通し、*Fagara* 亜属の *Z. schinifolium* の成熟果皮は 15% 以下が主として東北地区～華北に見られるのみであった〔原著 5〕。また、同属の種子で利尿剤とされる「椒目」について、上記各種の種子を割断した後 SEM で観察、画像解析装置により解析して組織学的区別点を見出し、「椒目」市場品を同定した〔原著 6〕。次に、「花椒」及び「山椒」市場品として流通量が多かった *Zanthoxylum* 亜属の果皮及び市場品について、精油及び辛味成分による品質評価を行った。「山椒」の

Table 2. The Botanical Origins of Commercial Samples of “Shengma” and Its Related Crude Drugs, and Their Available Markets

| Botanical origins |                      |   | Number of samples |                |                | Available market (Name)**                        |
|-------------------|----------------------|---|-------------------|----------------|----------------|--|
| Family            | Genus                | Species   | Homogenous        | Heterogeneous* |                |  |
|                   |                      |   |                   | Same gen.      | Different gen. |  |
| Ranunculaceae     | <i>Cimicifuga</i>    | <i>C. heracleifolia</i>                             | 11                | 18             | 3              | [C] North, [J], [K]                              |
|                   |                      | <i>C. dahurica</i>                                  | 2                 | 23             | 3              | [C] North, [J], [K]                              |
|                   |                      | <i>C. foetida</i>                                   | 23                | 15             | 3              | [C] Whole area*** (Lu-), [J], [K]                |
|                   |                      | <i>C. simplex</i>                                   | 1                 |                |                | [C] Shanxi                                       |
|                   |                      | <i>C. nanchuanensis</i>                             |                   | 1              | 1              | [C] Sichuan                                      |
|                   |                      | <i>C. yunnanensis</i>                               |                   | 5              |                | [C] Yunnan (Lu-)                                 |
| Saxifragaceae     | <i>Astilbe</i>       | <i>As. chinensis</i>                                |                   |                | 1              | [C] Sichuan                                      |
|                   |                      | <i>As. rivularis</i>                                |                   | 1              |                | [C] Yunnan (Hong-)                               |
|                   |                      | <i>As. rivularis</i> var.<br><i>angustifololata</i> |                   | 1              |                | [C] Yunnan (Hong-)                               |
| Rosaceae          | <i>Aruncus</i>       | <i>Ar. sylvester</i>                                |                   |                | 5              | [C] Southwest, Northeast, [K]                    |
| Compositae        | <i>Serratula</i>     | <i>Se. chinensis</i>                                | 10                |                |                | [C] Guangdong (Guang-)<br>[Hongkong] (Lu-, Bai-) |
| Acanthaceae       | <i>Strobilanthes</i> | <i>St. forrestii</i>                                | 17                | 2              |                | [C] West, South                                  |

\*The samples consisted of two or three kinds of rhizomes, in which the corresponding species of the same genus or different genus were detected.

\*\* [C], [J] and [K] show China, Japan and South Korea, respectively. The samples were generally called “Shengma”, “Shoma” and “Sungma”, but sometimes accompanied with a qualifier. This qualifier is shown in parenthesis.

\*\*\*The whole area except Guangdong prov. and the northeastern part of China.

原植物として流通拡大傾向のあった *Z. piperitum* f. *inerme* ‘ブドウザンショウ’の果皮は、精油 (geranyl acetate, limonene) 及び辛味成分 (hydroxy- $\alpha$ -sanshool  $\gg$   $\beta$ -sanshool,  $\gamma$ -sanshool) 含量がともに従来種のサンショウ、アサクラザンショウより高かった。「花椒」類の原植物では *Z. bungeanum* は精油成分として limonene, linalyl acetate を多く含み、辛味成分は hydroxy- $\alpha$ -sanshool が殆どで、hydroxy- $\beta$ -sanshool がこれに次いだ。*Z. armatum* var. *subtrifoliatum* には xanthoxylin を主にするものと linalool を主にするものがあり、同種由来の市場品の 80% 以上は前者であった〔原著 7〕。さらに、新潟薬科大学との共同研究により、‘ブドウザンショウ’の果皮から新規のアミド成分を単離し構造決定した〔原著 8〕。

3) 柑橘類生薬：日本産「陳皮」及び「枳実」の原植物とされる *Citrus unshiu* 及び *C. natsudaidai* の新鮮な果皮について各々、品種間におけるメトキシフラボン類及びクマリン類の含量、及び組織形態を、成熟を追いながら検討した。成分パターンは品種間で殆ど差異が認められなかったが、含量や組織形態で差異が見られる品種があった〔原著 9〕。次に、フラボノイド配糖体 6 成分、フラボノイド及びクマリン類のゲニン類 28 成分の分析法を検討して 3 種の HPLC 条件を設定し、これを *Citrus* 属 27 種 1 変種、*Fortunella* 属 1 種、*Poncirus* 属 1 種 1 変種、4 交配種の果皮に適用し分析した。その結果、各種の新鮮果皮は成分組成と含量比率の違いにより 14 タイプに分類でき、乾燥果皮においても各々は区別可能であった〔原著 10〕。これを市場品に適用した結果、日本産「陳皮」は *C. unshiu*、中国産「陳皮」は *C. unshiu* と *C. reticulata* 系が主、中国産「青皮」は *C. reticulata* 系が主であった。日本産「枳実」及び「枳殼」は *C. hassaku* が主でその他 *C. natsudaidai* など、中国産「枳実」及び「枳殼」は *C. aurantium* が主で「緑衣枳実」は *P. trifoliata* ‘枸橘’であった。*C. reticulata* 系の種では nobiletin, tangeretin などが *C. unshiu* に比べて高含量であった。また *C. hassaku* は成分、薬理試験から *C. natsudaidai* と同等とされるが、marmin は少なかった〔原著 11〕。

### 3. 痒みのメカニズムに関する研究 (II)

痒みは皮膚疾患における不快な主症状の1つであり、アトピー性皮膚炎などで見られるように慢性的な激しい痒みによる搔破が難治性への移行をもたらすことから、その抑制方法の解明が切望されている。また内臓疾患にも耐え難い痒みを生じる場合があるがその発生機序は明らかではない。

胆汁うっ滞の患者に見られる痒みが opioid antagonist の naloxone で抑制されることや除痛の目的で硬膜外投与した morphine が痒みをもたらすという報告から、opioid が関与する中枢性の痒みの存在が考えられてきたがその詳細は明らかでなかった。そこでマウスの大槽内に各種 opioid を投与し痒みに関連する行動が見られるかどうかを検討した〔原著12〕。Morphine の大槽内投与により用量依存的な顔面への scratching がみられた一方、皮膚局所に投与した morphine は scratching を引き起こさなかったことから、morphine の作用部位が中枢であることが示唆された。ヒトにおける痒みは心理的影響を受け易い、naloxone で抑制されるといった性質があることから、マウスでの morphine による顔面への scratching が痒みの感覚に関連した行動であるかどうかを調べた。まず morphine の大槽内注射後、マウスの注意を実験者に向けた場合 (distraction) の影響を検討したところ、distraction により scratching が有意に減少した (Fig. 1)。また、naloxone の前投与 (皮下注射) によっても morphine 誘発性 scratching は有意に減少した。Opioid 受容体の3つのサブタイプに特異的なアゴニストをそれぞれ大槽内投与したところ、 $\mu$  受容体の特異的アゴニストである DAMGO でのみ用量依存的な顔面への scratching が引き起こされた (Fig. 2)。以上の結果より、morphine や DAMGO は中枢性の  $\mu$  受容体を介して顔面の scratching を誘発すること、この scratching はおそらく痒みの感覚によるものであることが示唆されるとともに、この動物

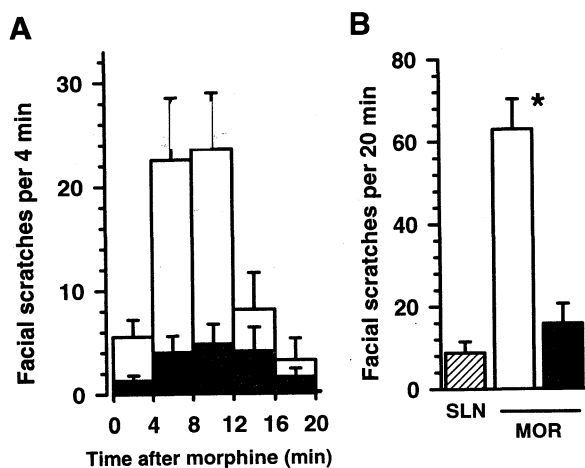


Fig. 1 The effect of distraction on the facial scratching induced by morphine injected into the cisterna magna of the mouse. Immediately after the intracisternal injection of morphine (0.3 nmol/mouse), the mouse behavior was videotaped in the presence of the experimenter (for producing distraction, closed columns,  $n=11$ ) or in his absence (control, open columns,  $n=9$ ) beside the animals. Values represent the number of facial scratching per 4 min (A) or 20 min (B) as means and S.E.M. In (B), SLN represents an intracisternal injection of saline (a hatched column,  $n=9$ ), and MOR represents an intracisternal injection of morphine (0.3 nmol/mouse) with (a closed column) or without (an open column) distraction. \* $p < 0.05$  when compared with saline (SLN).

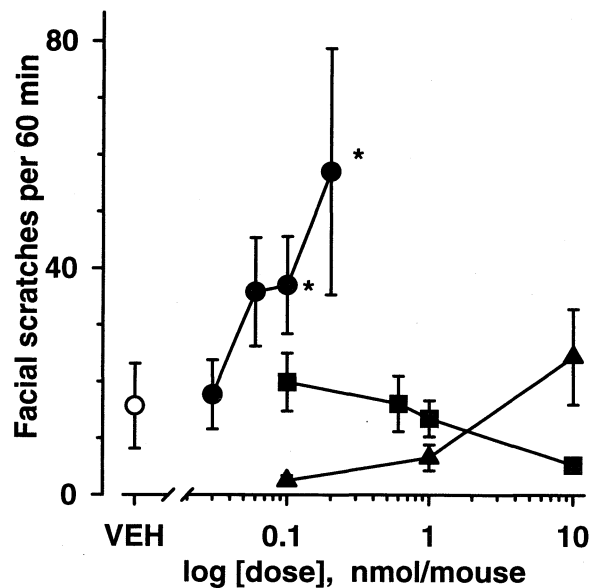


Fig. 2 Effects of intracisternal injections of agonists selective for opioid receptor subtypes on facial scratching in mice. The mouse was given an intracisternal injection of DAMGO (closed circles,  $n=7-8$ ), DPDPE (closed triangles,  $n=8$ ), U-50,488 (closed squares,  $n=7-15$ ) or saline (VEH, an open circle,  $n=11$ ). Facial scratches per 60 min were plotted against the dose. Values represent means and S.E.M. \* $p < 0.05$  when compared with saline (VEH).

モデルが中枢性の痒みを解析するのに有用であることが示された。

痒みが自覚的感覚であることや中枢性の痒みが存在することを考えると、痒みの感覚・知覚の制御に中枢神経系が関与することが考えられる。しかし痒みの、とりわけアトピー性皮膚炎などの慢性的な痒みの中枢性の機序を明らかにするには適切な動物モデルが必要である。そこで我々はアトピー性皮膚炎様の皮膚病変や血中 IgE 濃度の増加を示すことが知られている NC マウスに着目し、その痒みは関連行動や痒みに関与する中枢性の神経性因子について検討した〔原著 14〕。NC マウスの大部分は生後 2 カ月から 6 カ月の間に自然発症的に顔や上半身に脱毛・紅斑・出血といった皮膚病変を示した。皮膚病変を有するマウスと健常マウスの scratching を 24 時間観察したところ、皮膚病変を有するマウスの scratching 回数は常に多かった (Fig. 3)。この明らかな scratching 回数の差が痒みの程度を反映したものと考え、それに関与する因子を単離するために、皮膚病変を有するマウスと有しないマウスの脳を部位別に摘出し、両マウスの間で異なる発現量を示す mRNA を differential display 法により同定した。この方法で皮膚病変を有するマウスの大脳皮質で増加している因子として、転写因子の MEF2C が同定できた。皮膚病変を示すマウスでは scratching の有意な増加と連関するような、大脳皮質での MEF2C mRNA 量の有意な増加が RT

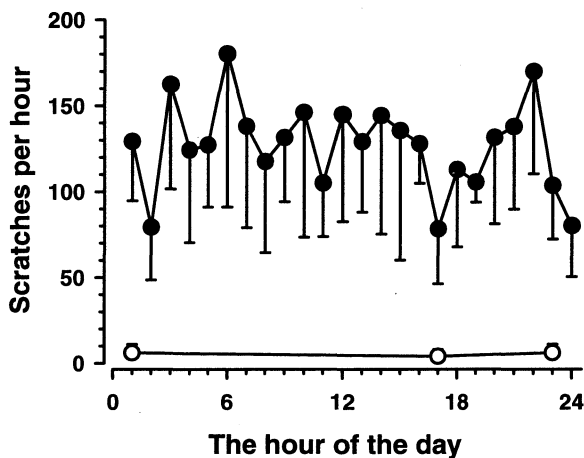


Fig. 3 Scratching of skin-lesioned and non-lesioned NC mice during a 24-h period. ●, male skin-lesioned mice (35 weeks old,  $n=4$ ); ○, male non-lesioned mice (14 weeks old,  $n=3$ ). Values represent the means and S.E.M.

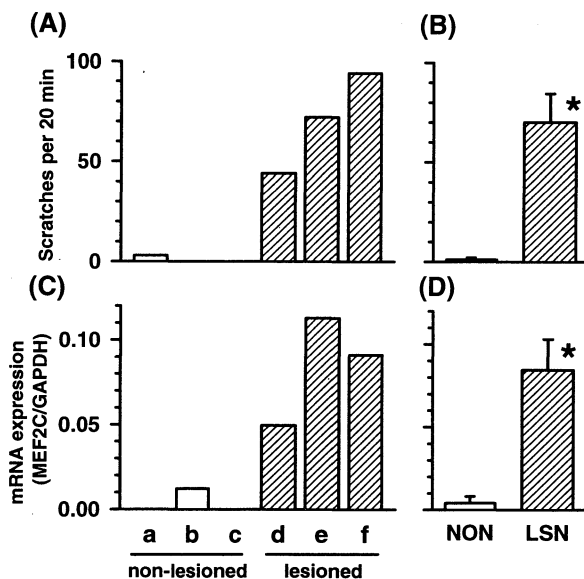


Fig. 4 The frequency of scratching and the expression level of MEF2C mRNA in NC mice. A) Individual data of scratching number for 20 min (a) and mRNA expression for MEF2C in the cerebral cortex (C) in non-lesioned (a-c) and skin-lesioned mice (d-f). The ratio of MEF2C mRNA to GAPDH mRNA was shown. Their sex and age (weeks) were as follows; (a) male 22, (b) female 48, (c) male 68, (d) male 22, (e) female 33, (f) female 48. Mice (a)-(f) were the same as in Fig. 3. Means together with S.E.M. of non-lesioned (NON) and skin-lesioned (LSN) are shown in (B) and (D). Values represent the means and S.E.M. \* $p < 0.05$  when compared with non-lesioned mice.

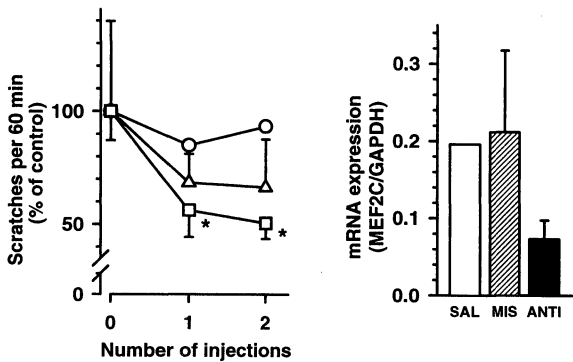


Fig. 5 Effects of i.c.v. injections of antisense oligomer for MEF2C on scratching and MEF2C mRNA expression. The mouse was given 10 $\mu$ l of the oligomer solution into the lateral ventricle twice at a 24-h interval. The scratching behavior was observed for 60 min before the first i.c.v. injection and 23 h after each i.c.v. injection. A) The frequency of scratching after i.c.v. injections of antisense (squares,  $n=3$ ), missense (triangles,  $n=3$ ) oligodeoxynucleotide for MEF2C or saline (circles,  $n=2$ ) was shown. Values represent the means and S.E.M. \*  $p < 0.05$  when compared with before injection. B) Expression levels of MEF2C in the cerebral cortex were detected 24 h after the final i.c.v. injections. Means together with S.E.M. of saline (SAL)-, missense (MIS)- and antisense oligomer (ANTI)- injected mice are shown.

-PCRにより確認された (Fig. 4)。また、脳内の MEF2C の発現を、MEF2C mRNA に対するアンチセンスオリゴの側脳室投与により抑制したところ、scratching は有意に減少した (Fig. 5)。以上の結果より、MEF2C は大脳皮質において痒みの感覚あるいは知覚の形成、制御に関与している可能性が示唆された。

末梢の痒みの信号を伝達する一次求心線維の同定やその伝達機構、またその神経の性質の詳細などについては明らかでない部分が多い。性質の異なる数種の神経が混在している一次求心線維に関してこれらのことを明らかにするには、一個一個の神経細胞の性質を調べる方法が必要である。我々は、分散培養した後根神経節細胞から個々の細胞質を吸引搾取し、total RNA を調製後、RT-PCR により mRNA を検出する方法を開発した〔原著 13〕。この方法により比較的簡便に且つ 1 度に多くの細胞に対して mRNA 発現の検討を行うことができ、半定量的な発現量の解析も可能であることが明らかになった。

#### 4. 世界の伝統医薬学の調査研究 (IV)

1) 雪蓮花類薬物 (資源開発部門との共同研究)：中国における仏教医学の調査研究 (国際学術研究 05045046) などにより、西藏自治区、四川省でチベット薬物「Bya-rgod sug-pa」を、新疆ウイグル自治区でウイグル薬物「Tage leylishi」などを入手した。これらはともにキク科の *Saussurea* 属植物に由来する。さらに漢薬の「雪蓮花」もまた同属由来である。これら民族薬物の基源並びに薬物間の関係を明らかにする目的で、同属の *Eriocoryne* 亜属 12 種〔原著 15〕、*Amphilaena* 亜属 5 種〔原著 16〕の全草を比較組織学的に検討し、チベット「雪蓮花」と「Bya-rgod sug-pa」の原植物として *S. medusa* を始めとする同亜属 5 種、「天山雪蓮花」と「Tage leylishi」の原植物として *S. involucrata* を確認した。中国及びチベット医学の本草書から、各民族薬物の正品を考察した。

2) *Swertia* 属に由来する民族薬物 (資源開発, 化学応用部門との共同研究)：リンドウ科 *Swertia* 属の全草はアジア各地で民間的に使用される。日本の「センブリ」、ネパールの「Chirayta」、青海省西寧市で入手

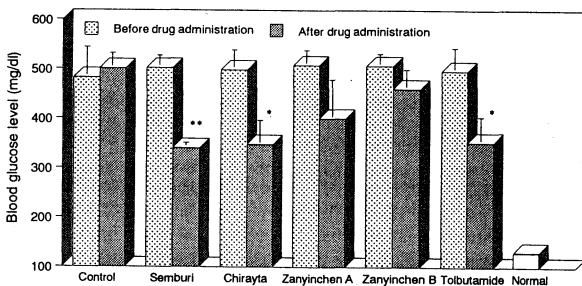


Fig. 6 Effects on Blood Glucose Levels of Extract of Four Samples of *Swertiae* Herba and Tolbutamide (Five *i.p.* Treatment with a Dose of 100 mg/kg, Twice a Day) in STZ-Induced Diabetic Rats Results are expressed as mean  $\pm$  SE,  $n=5$ . \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs control.

した「蔵茵陳」, 同省格爾木市人民医院使用の「蔵茵陳」(チベット名「rGya-gar tig-ta」)の計4点について, 形態学的に原植物を同定したのち, 70% エタノールエキス投与によるSTZ誘発性糖尿病ラットにおける血糖降下作用を検討した。各生薬の基源はそれぞれ *S. japonica*, 少量の *S. alata* が混入した *S. chirayta*, *S. mussotii* と *S. cincta* の約20:1の混合品, *S. mussotii* の全草であった。センブリ及びChiraytaエキスは血中グルコースレベルをそれぞれ32%, 31%減少させた (Fig. 6) [原著17]。

その他, パナマ産 *Cordia spinescens* の葉の水エキス中に含まれるカフェ酸誘導体の金属塩をX線マイクロアナライザーにより同定した [原著18]。

## 5. 伝統薬物に関するデータベースの構築 (I)

民族薬物資料館に保管されている生薬標本に関して, それらの画像情報を主体にしたデータベースを構築することを目的にして, ソフトを開発し, データの入力を行う。同時に各生薬について一般情報を付け加える。現在, サーバーシステムが揃い, ソフトの概略ができあがっている。また, 既存データの変換作業が終了し, 生薬標本画像及び本草書データの一部の取り込みを開始している。来年度, 基本ソフトを研究所の教職員に公開し, これに関するアンケートを実施する予定である。基本ソフトが固まり次第, 各種情報の入力を本格的に開始する。なお, サーバーシステムは以下のようである。

OS : MS Windows NT Server 4.0J, DB : MS SQL Server 6.5J, CPU : intel Pentium PRO 200MHz (cash 512 k), Memory : 128MB, Disk : ULTRA WIDE SCSI 12 GB. Interface : MS Access (但し, 画像を扱う部分等は別に開発している)。

## ◇ 原 著

### 1. 遺伝子解析による生薬の同定法開発に関する研究

#### 1) Application of PCR-RFLP and MASA Analyses on 18S Ribosomal RNA Gene Sequence for the Identification of Three Ginseng Drugs.

*Biol. Pharm. Bull.*, 20 : 765-769, 1997.

Fushimi H., Komatsu K., Isobe M., and Namba T.

In order to develop convenient and reproducible methods for the identification of Ginseng drugs at a DNA level, PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RELP) and Mutant allele specific amplification (MASA) analyses were applied, based on differences of the 18S rRNA gene sequence among three *Panax* species. The PCR product of each species on the 18S rRNA gene was digested with the restriction enzymes *Ban* II and *Dde* I. Each fragment gave unique electrophoretic profiles for each species (PCR-RFLP analysis). The extracted DNA of each species was amplified by PCR using a designed species-specific oligonucleotide primer. The expected size of the fragments corresponding

to each species were detected only when the optimum temperature and reaction time for annealing and extension were established (MASA analysis). These two analytical methods were carried out on three Ginseng drugs and the same results as in their original plants were obtained. The results suggest that PCR-RFLP and MASA analyses under the established conditions are convenient for identifying three Ginseng drugs. Moreover, to insure completion of the identification, a partial sequence of the plastid gene *matK* was determined in addition to the 18S rRNA gene. The gene sequences of three *Panax* species were of 1259 base pairs and that of *P. quinquefolius* was different from the other two at nucleotide position 102.

### 2. 生薬の基源と品質に関する研究

#### 2) Pharmacognostical Studies on the Chinese Crude Drug, "Shengma" (Part II) : "Shengma" Derived from Genus *Cimicifuga* Plants.

*Nat. Med.*, 51 : 148-161, 1997.

Li X-B., Komatsu K., Yamaji S., Takano A., and Namba T.

Anatomical characteristics of 8 *Cimicifuga* species were studied, summarized in a keytable and compared with those of *C. simplex*. Rhizomes of the

9 taxa could be distinguished from each other by the growth rings and arrangement of big vessels in the secondary xylem, number and diameter of vessels, appearance of endodermis and interfascicular cambium, thickness of cortex and appearance of sclereids in cortex and the maximum number of sclereids over each vascular bundle in the rhizomes, and by the sclerification of ray parenchyma in the stem residues. By using the keytable, 67 commercial samples of "Shengma" were examined for their origins: those in the north Chinese market were determined to be derived mainly from the rhizomes of *C. heracleifolia* and/or *C. dahurica* and those in the southwest and south Chinese market, of *C. foetida*. Some samples derived from rhizomes of *C. foetida* contained rhizomes of either *C. nanchuanensis* or *C. yunnanensis*. Japanese "Shoma" and South Korean "Sungma" were composed of one of or a mixture of two of *C. heracleifolia*, *C. dahurica* and *C. foetida*.

3) 漢薬「升麻」の生薬学的研究 (第3報): ユキノシタ科 *Astilbe* 属及びバラ科 *Aruncus* 属植物に由来する「升麻」について.

*Nat. Med.*, 51: 335-346, 1997.

李 曉波, 小松かつ子, 難波恒雄

Chinese crude drug "Shengma" is reported to be derived from *Cimicifuga* species of the family Ranunculaceae and several species of other families. In this paper, to identify the botanical origins of commercial samples of "Shengma," having reddish brown cut surface and sometimes called "Hong-Shengma" a comparative anatomical study was carried out on the rhizomes of *Astilbe* species of the family Saxifragaceae and *Aruncus* species of the family Rosaceae. The results were as follows: (1) 7 *Astilbe* species and 2 varieties could be distinguished from each other by the presence or absence of the bands composed of thin-walled xylem parenchyma cells and of distinctive growth rings, position of big vessels, number of vascular bundles, number of vessels within one growth ring, suberization of endodermal cell walls, presence or absence of interfascicular cambium, and sclerification of ray parenchyma. These *Astilbe* species were distinguished from *Aruncus sylvester* as *Aruncus sylvester* had vessels with simple perforation and no endodermis.

(2) "Hong-Shengma" sample of Yunnan Province was determined to be rhizomes of *As. rivularis* and its variety. "Shengma" from China and "Sungma" from South Korea examined were mainly composed of *Cimicifuga* rhizomes, mixed with a small amount of *Astilbe* or *Aruncus* rhizomes: samples from Jilin Province and the Xinjiang Uighur Autonomous region and from Teagu mainly of *C. heracleifolia* and *C. dahurica*, mixed with the rhizomes of *Ar. sylvester*, samples from Sichuan and Guizhou Provinces mainly of *C. foetida*, mixed with rhizomes of *As. chinensis* and *Ar. sylvester*, and of *Ar. sylvester*, respectively.

4) 漢薬「升麻」の生薬学的研究 (第4報): キク科 *Serratula* 属及びキツネノマゴ科 *Strobilanthes* 属植物に由来する「升麻」について.

*Nat. Med.*, 51: 408-416, 1997.

李 曉波, 小松かつ子, 周 光春, 難波恒雄

To identify the botanical origins of commercial samples of "Shengma," the fusiform root of *Serratula chinensis* of the family Compositae and the rhizome of *Strobilanthes forrestii* of the family Acanthaceae were anatomically examined. The root of *Se. chinensis* was found to be characterized by the existence of secretory canals and other anatomical characters such as the amount of xylem fibers and the diameters of vessel and secretory canal were found to vary at different levels sectioned. The rhizomes of *St. forrestii* had endodermal cells arranged in circle as in *Se. chinensis* and *Astilbe* species previously reported, however, those were distinguishable by the existence of collenchyma in cortex, phloem fiber and cystolith in parenchyma. On the basis of these results, "Shengma" samples available in Guangdong and Hongkong markets, called "Guan-Shengma," "Lu-Shengma" or "Bai-Shengma," including cut root samples were all determined to be the roots of *Se. chinensis*. Of the "Shengma" samples recently obtained in the markets of Sichuan, Guizhou, Yunnan Provinces and others, whose internal structures did not correspond to those of *Se. chinensis* and previously reported *Cimicifuga*, *Astilbe* and *Aruncus* species, 17 samples were found to be derived from the rhizomes of *St. forrestii*, and the two samples from Sichuan Province and Ningxia Autonomous Region, to be



mixtures of *St. forrestii* and *C. nanchuanensis* (20 : 1) and of *St. forrestii* and *C. foetida* (6 : 1), respectively.

5) 「花椒」及び「山椒」の生薬学的研究(第3報):

**Fagara** 亜属に由来する漢薬「花椒」について.

*Nat. Med.*, 51 : 194-204, 1997.

伊藤 親, 小松かつ子, 劉 玉萍, 施 大文, 難波恒雄

In the previous paper, nearly a half of commercial "Huajiao (花椒)" samples derived from the subgenus *Zanthoxylum* were determined to be mature pericarps of *Zanthoxylum bungeanum* and the latter half to be immature to slightly immature ones of *Z. armatum* var. *subtrifoliatum*. In this paper, the botanical origin of commercial "Huajiao" samples derived from the subgenus *Fagara* available in the markets in the north of China was examined by comparing the anatomical characteristics of the pericarps with those of 9 species of this subgenus. Among these taxa, differences were found in the circumference length at the mid point of pericarps, outlines of outer epidermis in oil sac area, presence or absence of hesperidin crystals, thickness of outer periclinal wall of outer epidermal cells, presence or absence of hypodermis and sclereids in mesocarp, thickness and number of layers of endocarp, appearance of inner epidermal cells, and the shape of cuticle on the surface of pericarps. According to which, 8 commercial samples were identified as the mature pericarps of *Z. schinifolium* of the subgenus *Fagara*. The characteristics of 9 species of the subgenus *Fagara*, added those of 8 species 3 varieties 1 form of the subgenus *Zanthoxylum*, are summarized in a keytable.

6) Pharmacognostical Studies on the Sino-Japanese Crude Drugs "Huajiao (花椒)" and "Sansho (山椒)" (Part 4) : Determination of Botanical Origin of Chinese Crude Drug "Jiaomu(椒目)" by Scanning Electron Microscopy.

*J. Jpn. Bot.*, 72 : 93-109, 1997.

Liu Y.-P., Ito C., Komatsu K., Tani T., Shi D.-W. and Namba T.

"Jiaomu," a traditional Chinese medicine used as a diuretic, is derived from the seeds of the genus *Zanthoxylum*, the family Rutaceae, and of the same

origin as "Huajiao." On the other hand, it is difficult to identify *Zanthoxylum* seeds because of their similar external morphology and the difficulty of sectioning them to observe the inner structure. In this paper, in order to develop a method for the identification of "jiaomu," we report a new anatomical method using a scanning electron microscope and an image analysis system on the seeds of 16 species, three varieties and one form, collected from China, Japan and Nepal. The results showed that 16 species and varieties could be distinguished from each other by the following characteristics : number of layers of epidermal cell, ratio of radial diameter to tangential diameter of epidermal cell, shape of closed curve which was drawn in between epidermis and sclerenchyma tissue (its degree of roughness shown by SFC value) ratio of average thickness of outer mesophyll to inner mesophyll, ratio of occupation of epidermis to outer seed coat, ratio of thickness of outer seed coat to the radius of transection of seed, etc. The commercial samples of Shanghai and Datong (Shanxi) market were the seed *Z. bungeanum* and that of Huhehaote (Inner Mongolia) market was a mixture of seeds and pericarps of *Z. schinifolium*.

7) 「花椒」及び「山椒」の生薬学的研究(第5報):

**Zanthoxylum** 亜属植物の果皮及び市場品の精油及び辛味成分.

*Nat. Med.*, 51 : 249-258, 1997.

伊藤 親, 片桐仁史, 佐藤昭子, 施 大文, 門田重利, 小松かつ子, 難波恒雄

Analysis of essential oils and pungent principles of pericarps of Subgen. *Zanthoxylum* (6 species, 2 varieties and 1 form) and commercial samples of "Sansho" and "Huajiao" from Japan and China by GC and HPLC methods showed that *Zanthoxylum piperitum* and its form from Japan contained higher levels of limonene and  $\beta$ -phellandrene, and that in 'Budo-zansho,' geranyl acetate was the main essential oil component. *Z. bungeanum* from China showed higher limonene contents but that from Sichuan prov. had linalyl acetate as the main component. There were some differences in the essential oil compositions among strains of *Z. armatum* var. *subtrifoliatum* : they might be classified to two types, according to the presence or absence of xanthox-

ylin. As regards the pungent principles, most species showed higher levels of hydroxy- $\alpha$ -sanshool. *Z. piperitum* and its form contained  $\alpha$ -sanshool, whereas *Z. bungeanum* showed lower contents. Commercial samples showed essential oil and pungent principle compositions similar to those of their respective original plants. The total amounts of both essential oils and pungent principles in "San-sho," derived from Asakura-zansho and 'Budo-zansho' of *Z. piperitum* f. *inermis* and "Huajiao derived from *Z. bungeanum* from Sichuan were higher than those in other samples. Most of the "Huajiao" samples derived from *Z. armatum* var. *subtrifoliatum* contained xanthoxylin.

#### 8) Amides of the Fruits of *Zanthoxylum* spp.

*Phytochemistry*, **44** : 1125-1127, 1997.

Kashiwada Y., Ito C., Katagiri H., Maze I., Komatsu K., Namba T., and Ikeshiro Y.

**Abstract**—Examination of the amide constituents in Budo-Zanthoxylum fruit, the most traded commercial *Zanthoxylum* fruit in the Japanese market, has led to the isolation of a new amide, along with  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, hydroxy- $\alpha$ -, hydroxy- $\beta$ - and hydroxy- $\gamma$ -sanshools. The structure of the new amide was assigned as (2*E*, 4*E*, 8*E*, 10*E*, 12*E*)-*N*-isobutyl-2, 4, 8, 10, 12-tetradecapentaenamide by spectral examination.

#### 9) Botanical Origins and Quality Evaluation of Crude Drugs Derived from *Citrus* and Related Genera (Part 2) : Chemical and Anatomical Characters during Fruit Ripening Period of Cultivars of *Citrus unshiu* and *C. natsudaidai*

*Nat. Med.*, **51** : 84-91, 1997.

Tsuchida T., Yamamoto T., Yamamoto K., Hitomi N., Kosaka N., Okada M., Komatsu K., and Namba T.

The polymethoxyflavonoid and coumarin contents and anatomical structures of fruits of 9 cultivars of *Citrus unshiu* and *C. natsudaidai* were studied during maturation. In the case of fruit peels of 5 cultivars of *C. unshiu* and 4 cultivars of *C. natsudaidai* tested their HPLC profiles were similar to each other within each species and they did not change during the fruit maturation. However, different cultivars of *C. unshiu* had different contents in a part of polymethoxyflavones and 'New Seven'

of *C. natsudaidai* generally had low contents. Moreover, different cultivars had different anatomical features, for example, in the thickness of peel, the shape and size of oil cavities and the distribution pattern of hesperidin crystals. Those cultivars having distinctively different chemical compositions were found to be distinguished very clearly also by the anatomical characters.

#### 10) 柑橘類生薬の基源と品質に関する研究(第3報) : *Citrus*, *Fortunella* 及び *Poncirus* 属の果皮の成分について.

*Nat. Med.*, **51** : 205-223, 1997.

土田貴志, 山本知枝, 山本恵一, 人見信之, 小坂昇, 岡田正道, 小松かつ子, 難波恒雄

The newly established 3 HPLC conditions, identify 34 components including 28 genins of flavonoids and coumarins and 6 flavonoid-glycosides in *Citrus* peels. By using the HPLC systems, fresh and dried peels of 27 species and 1 variety of the genus *Citrus*, 1 species of the genus *Fortunella*, 1 species and 1 variety of the genus *Poncirus*, and 4 hybrids of above genera were assayed. The results showed that these species might be divided into 14 types on the basis of their chemical compositions. Some compounds were apparently affected by drying, though the types of dried samples could still be identified. The HPLC profiles did not change as the fruit matured. The present HPLC systems may give valuable information to identification of crude drugs derived from *Citrus* fruits.

#### 11) 柑橘類生薬の基源と品質に関する研究(第4報) : 日本及び中国産「陳皮」, 「青皮」, 「枳実」, 「枳殼」, 「橙皮」の基源について.

*Nat. Med.*, **51** : 231-243, 1997.

土田貴志, 山本知枝, 山本恵一, 人見信之, 小坂昇, 岡田正道, 小松かつ子, 難波恒雄

In the present paper, chemical and comparative histological studies were carried out to identify the botanical origins of more than 100 commercial samples of "Chimpi (Chenpi, 陳皮)," "Seihi (Qingpi, 青皮)," "Kijitsu (Zhishi, 枳实)," "Kikoku (Zhiqiao, 枳殼)," "Tohi (橙皮)" etc., mainly from Japan and China. The chemical characteristics were found to be more useful guidelines for distinguishing these drugs as reported in previously. The main botanical origin of "Chimpi" produced in Japan was deter-

mined to be *Citrus unshiu*, and that produced in China was *C. unshiu* and *C. reticulata* or related species. The botanical origin of "Seihi" produced in China was *C. reticulata* or related species, "Kijitsu" and "Kikoku" produced in Japan *C. hassaku*, those produced in China *C. aurantium*, "Tohi" produced in Japan *C. iyo* and *C. hassaku* and foreign "Tohi" *C. aurantium*.

### 3. 痒みのメカニズムに関する研究

#### 12) Intracisternal injection of opioids induces itch-associated response through $\mu$ -opioid receptors in mice.

*Jpn. J. Pharmacol.*, **74**: 77-82, 1997.

Tohda, C., Yamaguchi, T. and Kuraishi, Y.

We examined whether opioids, especially morphine, would centrally elicit scratching in mice and determined some characteristics of the scratch-inducing action of opioids. When intracisternally (i.c.) injected, morphine (0.1-3 nmol/mouse) produced a dose-dependent increase in scratching of the face, but not of the ears, head and body trunk. When injected intradermally into the rostral part of the back, morphine (at most potent i.c. dose of 3 nmol/mouse or higher) did not increase the scratching of the injected site. Facial scratching of the mouse induced by i.c. injection of morphine (0.3 nmol/mouse) was almost abolished by distraction and by naloxone (1 mg/kg, s.c.). [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol] Enkephalin (DAMGO) (0.03-2 nmol), but not [D-Pen<sup>2,5</sup>] enkephalin (DPDPE) and U-50,488, dose-dependently elicited facial scratching by i.c. injection. These results suggest that morphine and DAMGO increased facial scratching, probably mediated by central opioid  $\mu$ -receptors in mice, and such scratching was due to sensation, probably itching. The present animal model may be useful for analyzing opioid-mediated central itching.

#### 13) Analysis of dissociated single neurons by simple semi-quantitative RT-PCR (reverse transcription and polymerase chain reaction).

*Jpn. J. Pharmacol.*, **74**: 121-123, 1997.

Andoh, T., Tohda, C. and Kuraishi, Y.

We have developed a simple and semi-quantitative method for mRNA determination in single cells using the reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). The distinct features of

this method are the highly efficient RNA harvest from whole dissociated cells and ability to perform all RT procedures in one tube that allowed semi-quantitative determination of mRNA in dissociated cells. This method revealed that histamine H<sub>1</sub>-receptor mRNA was highly expressed in 5/28 small and 1/26 large dorsal root ganglion neurons of the mouse.

#### 14) Increased expression of mRNA for myocyte-specific enhancer binding factor (MEF) 2C in the cerebral cortex of itching mouse.

*Neurosci. Res.*, **29**: 209-215, 1997.

Tohda, C., Yamaguchi, T. and Kuraishi, Y.

Since itch is a subjective sensation and markedly affected by psychological conditions and is sometimes central origin, the mechanisms of neuronal processing of itch signaling in the central nervous system should be studied. Therefore, we examined itch-related behaviors and nervous gene expressions of NC mice, which show severe dermatitis and atopy-like changes in inflammatory cells. Some NC mice spontaneously scratched their bodies and showed skin lesions, such as eczema, bleeding and alopecia from 2 to 6 months after birth. The mice with skin lesions scratched mainly face, ears and the rostral part of body by the hind paws all day long. An average of scratching frequency was  $126.7 \pm 36.8$  ( $n=4$ ) and  $5.3 \pm 4.7$  ( $n=3$ ) per hour in skin-lesioned and non-lesioned control mice, respectively. A differential display analysis of gene expressions in several regions in central and peripheral nervous systems was performed between these scratching and control groups. One of genes that were expressed at higher level in a scratching group than in control group was myocyte-specific enhancer binding factor (MEF) 2C in the cerebral cortex. The scratching was inhibited by intracerebroventricular injection of antisense oligodeoxynucleotide for MEF2C. These results raise the possibility that MEF2C may be involved in the sensation or perception of itch in the cerebral cortex.

### 4. 世界の伝統医薬学の調査研究

#### 15) 「雪蓮花」類薬物の生薬学的研究(第2報): *Saussurea* 属 *Eriocoryne* 亜属植物に由来する漢薬「雪蓮花」及びチベット薬物「Bya-rgod sug-pa」の基源について.

*Nat. Med.*, **51** : 134-147, 1997.

楊 瑞萍, 山路誠一, 小松かつ子, 難波恒雄

The Chinese crude drug "Xuelianhua," which is known as "Bya-rgod sug-pa" in the Tibetan Medicine and as "Tage leylishi" in the Uygur Medicine, is used for rheumatoid arthritis, menoxenia, etc. The botanical origins of these drugs are said to be flowering whole plants or aerial parts of about 18 species of the subgenus *Eriocoryne* with long woolly hair and of subgenus *Amphilaena* with large and thin bract, of the genus *Saussurea* of the family Compositae. In most cases, it is almost impossible to identify their origins by their external morphologies, since the flowers and cypselae break easily during maturation after harvesting. In order to identify the botanical origins of about 50 commercial samples of "Xuelianhua" and its related ethnomedicines, a series of pharmacognostical studies were performed. In this paper, to identify 37 commercial samples of them, which are apparently derived from plants with long woolly hair, a comparative microscopical study was carried out on the leaves, stems and rhizomes of 12 species of *Eriocoryne* plants. These 12 species could be distinguished from each other by the differences in leaf [number of vascular bundles in the midrib, appearance of stomata on adaxial epidermis and glandular hairs on both epidermises, degree of roughness of anticlinal wall of epidermal cells], in stem [maximum diameter of vessels] and in rhizome [kind of tissue opposite to xylem, etc.]. On the basis of the results, all the 37 commercial samples examined were determined to be derived exclusively from one or two of the following species: *S. medusa*, *S. laniceps*, *S. tridactyla*, *S. namikawae*, and *S. gossypiphora*.

16) 「雪蓮花」類薬物の生薬学的研究(第3報): *Saussurea* 属 *Amphilaena* 亜属植物に由来する漢薬「雪蓮花」、ウイグル薬物「Tage leylishi」及びチベット薬物「gZa'-bdud」の基源について.

*Nat. Med.*, **51** : 347-357, 1997.

楊 瑞萍, 山路誠一, 小松かつ子, 難波恒雄

In order to identify the botanical origins of "Xuelianhua" and its related ethnomedicines, "Xuelianhua" and the related ethnomedicines derived from *Amphilaena* plants of the genus *Saussurea* of the family Compositae, which are generally char-

acterized by large thin bracts, were studied histologically, by comparing the bracts, foliage leaves and stems with those of 5 species of this subgenus. These 5 species could be distinguished from each other by the differences in the bract [thickness of the midrib, appearance of fibers opposite the phloem in the midrib, of palisade tissue in the mesophyll and of stomata on adaxial epidermis], foliage leaf [degree of roughness of anticlinal wall of adaxial epidermal cells and palisade ratio in surface view], and stem [number of vascular bundles]. Twelve commercial samples of Chinese "Xuelianhua" and Uighur "Khar leylishi" were found to be derived from *Sa. involucrata*, and two of Tibetan "gZa'-bdud," from *Sa. obvallata*. On the basis of the present findings and those of our previous studies on the plants of the subgenus *Eriocoryne* of the genus *Saussurea* and the genus *Sorooseris*, the key for identification of 17 species of *Saussurea* and 3 species 1 subspecies of *Sorooseris* was made.

17) A Comparative Study on *Swertiae Herba* from Japan, Nepal and China, and Their Hypoglycemic Activities in Streptozotocin (STZ)-induced Diabetic Rats.

*Nat. Med.*, **51** : 265-268, 1997.

Komatsu K., Basnet P., Yamaji S., Kadota S., and Namba T.

Four commercial ethno-medicines, "Semburi" from Japan, "Chirayta" from Nepal, and "Zanyinchen" (two samples) from China were identified morphologically to be the whole plants in flowering season of *Swertia japonica*, *S. chirayta* mixed up with small amounts of *S. alata*, and *S. mussotii* (one sample contained a trace amount of *S. cincta*), respectively. These crude drugs were extracted with 70% ethanol and these extracts were studied for the comparative hypoglycemic activities in the streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. "Semburi" and "Chirayta" significantly decreased the blood glucose level of STZ-induced diabetic rats, "Semburi" being the more active of the two.

18) Inhibitory Effects of *Cordia spinescens* Extracts and Their Constituents on Reverse Transcriptase and Protease from Human Immunodeficiency Virus.

*Phytother. Res.*, **11** : 490-495, 1997.

Lim Y.A., Kojima S., Nakamura N., Miyashiro H., Fushimi H., Komatsu K., and Hattori M.

By bioactive-guided fractionation of a water extract of *Cordia spinescens*, magnesium lithospermate, calcium rosmarinate and magnesium rosmarinate were isolated as potent inhibitory substances against HIV-1 reverse transcriptase (RT) with  $IC_{50}$  values of 0.8, 5.8 and  $3.1 \mu M$ , respectively. However, they were weak HIV-1 protease (PR) inhibitors with  $IC_{50} > 100 \mu M$ . The RT inhibition by these compounds was noncompetitive with respect to dTTP substrate.

#### ◇ 学会報告

1) 小松かつ子, 佐藤利江, 李 曉波, 山路誠一, 難波恒雄: 「丹参」類の生薬学的研究. 日本薬学会第117年会, 1997, 3, 東京. 講演要旨集2, p.119.

【目的】「丹参」は活血化癥, 養血安神薬として婦人科系疾患, 不眠症, 狭心症に用いられ, また心疾患治療薬とされる「冠心二号方」などの主薬である。その基源は『中国薬典』にシソ科の *Salvia miltiorhiza* の根及び根茎であるとされるが, 他に *S. bowleyana*, *S. przewalskii* とその変種, *S. yunnanensis* 等も報告されている。一方, 駆瘀血, 去風湿薬とされる「紅秦艽」も同属基源とされることから, 「丹参」の品質評価の一貫として両生薬の基源に関する研究を行った。

【実験及び結果】*S. miltiorhiza* (SM), *S. przewalskii* (SP), *S. yunnanensis* (SY), *S. deserta* (SD) の根を比較材料とした。「丹参」市場品には円柱状で赤茶色のものとやや円錐状で暗褐色, 空隙が目立つもの2タイプがあったことから, これらと同様な外形のSMとSPの根の各部位について内部形態の変化を検討した。SMの根の先端部1/5は一次組織のみで道管は放射状に配列し繊維がよく発達し, 内部は環状をなす。中央部に向かって二次木部が見られ, 内鞘にコルク層が現れ, 内皮は部分的に残り, さらに基部に向かって一次木部は2~3部分に分かれ, 二次木部の道管周囲の繊維が増える。SPでは通常の形成層の外側に不規則な形成層が形成されるため, 二次木部の道管は接線方向に並んで観察され, さらに木部柔組織及び放射柔組織中にコルク形成層(kix)が次々と新生されこれらが個々に環を形成するため木部は数部分に分断される。この構造は基部側ほど顕著である。根の中央部において, SYはSMに類似するが, 二次皮層中に厚壁細胞が散在し道管は小型, SDでは二次木部の道管及び繊維が多く, kixが放射組織中に発達して各維管束が分離

する傾向がある。市場品はSMが多く, 甘肅産「丹参」, 雲南産「紫丹参」及び四川産「紅秦艽」はSP, 「雲南丹参」はSYに由来していた。

2) 伏見裕利, 小松かつ子, 難波恒雄, 磯部正治: *Panax* 属植物及びその関連生薬の遺伝子解析 (2): 18S rRNA 遺伝子に着目したMASA法及び *matK* 遺伝子の塩基配列. 日本薬学会第117年会, 1997, 3, 東京. 講演要旨集2, p.119.

【目的】演者らはこれまでに3種の *Panax* 属植物に由来する18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し, 上流から500塩基付近にそれぞれの植物に特徴的な塩基配列を見出し, その同一配列が対応するそれぞれの人参類生薬にも存在することを報告した。今回, 人参類生薬の簡便な同定法を開発するため, この各種に固有の塩基配列に着目し, Mutant Allele Specific Amplification (MASA) 法の応用を検討した。また, 新たな遺伝子領域として, 葉緑体遺伝子上に存在する *matK* 遺伝子の塩基配列を決定し, その有用性についても検討した。

【実験及び結果】18S rRNA 遺伝子の塩基の置換が認められた499~501番目にプライマーの3'末端が位置するように, *Panax* 属3種に特異的なプライマーを合成した。このプライマーを用いて植物及び生薬材料から得られたDNAを鋳型としてPCR法を行い, PCR産物の有無を1%アガロースゲル電気泳動法により確認した。最適なプライマーのアニーリング及び伸長反応の温度と時間を検討した結果, 各々のプライマーに対応する植物及び生薬でのみDNAの増幅が生じる条件を決定した。*matK* 遺伝子については, 大井ら<sup>1)</sup>により報告されているプライマーを用いて植物及び生薬材料の当該領域を増幅し, 各々の塩基配列を決定した。*matK* 遺伝子の部分配列はすべて1259塩基対で, *P. ginseng* と *P. japonicus* 間の配列は同一で, この2種と *P. quinquefolius* の間では102番目に塩基置換を検出した。さらにこの置換は同種を基源とする広東人参にも確認された。

【文献】1) Ooi K., Endo Y., Yokoyama J., Murakami N., *Jpn. Bot.*, **70**, 328-331 (1995).

3) 東田千尋, 倉石 泰: NCマウスの痒み関連行動とそう痒マウスにおける遺伝子発現のディフェレンシャルディスプレイ解析. 第70回日本薬理学会年会, 1997, 3, 千葉.

The effective control of atopic dermatitis, contact-type dermatitis and so on which are not ameliorated by anti-histamine drugs, has not been possible yet. To regulate the severe pruritus, it is necessary to

clarify the mechanism of itch sensation. The present experiments were conducted to identify several factors involving the itch sensation and/or itch-related behaviors. NC mice begin to scratch their body and face about 2 to 5 months after birth, and appear loss of hair, bleeding and injury of skin. We observed skin-injured and uninjured NC mice for 24 hr under the unmanipulated conditions. The skin-injured mice scratched all day mainly their back and face by the hind paws, and the average of scratch number per 1 hr was 126.7. On the other hand, that of uninjured mice was 5.3. A differential display of several regions in central and peripheral nervous systems was performed between these two groups, scratch and control. One of fragments which highly expressed in a scratch group than control was 3'-non coding region of myocyte-specific enhancer factor 2C (*Mef2C*) in cerebral cortex. Then, expression level of *Mef2C* mRNA was investigated by a RT-PCR method in other individual NC mice. The *Mef2C* mRNA in cerebral cortex of scratch mice was expressed at about 20 times as high as control. These results suggest that a transcriptional factor, *Mef2C*, in cerebral cortex may be involved in the mechanism of the itch sensation.

4) 佐々木美和, 東田千尋, 倉石 泰: ラット腰髄からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離のホルマリン性痛覚過敏下での増加. 第70回日本薬理学会年会, 1997, 3, 千葉.

We have shown that capsaicin evokes the release of glutamate (Glu) in superficial laminae of the spinal cord slice, using a confocal laser scanning microscope, in which we determined the fluorescence of NADH generated from Glu and NAD<sup>+</sup> by glutamate dehydrogenase. This study was conducted to determine whether the release of Glu from superficial dorsal horn would be increased in a state of inflammatory hyperalgesia. Male Sprague-Dawley rats (4-5 weeks old) were used. To produce hyperalgesia, animals were s.c. given 5% formalin (50  $\mu$ l) into the unilateral hind paw. Nociceptive threshold of the treated hind paw was decreased to  $62.7 \pm 2.9\%$  ( $n=17$ ) 2 h after formalin injection. Immediately after this algesic test, the lumbar enlargement of spinal cord was removed and transverse slices of 1-mm thickness were prepared.

Although stimulation of the slice by capsaicin (10  $\mu$ M) increased the release of Glu from laminae I and II on both sides ipsilateral and contralateral to formalin treatment, the concentration was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in ipsilateral side ( $16.1 \pm 0.9 \mu$ M) than in contralateral side ( $10.1 \pm 2.4 \mu$ M,  $n=8$ ). The area of apparent Glu release was not significantly different between ipsilateral and contralateral dorsal horn ( $n=8$ ). These results suggest that the amount of Glu released from capsaicin-sensitive primary afferent terminals in the superficial dorsal horn was increased in a hyperalgesic state. The area of Glu release may not be altered in a such state.

5) 鶴見里佐, 東田千尋, 倉石 泰, 安東嗣修: Single-cell RT-PCRによるマウス1次求心線維上のNK1受容体 mRNA の解析. 第70回日本薬理学会年会, 1997, 3, 千葉.

There are growing experiments which examine the effects of pharmacological manipulations on the functions (for example, intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup>) of a heterogeneous population of dissociated cells at once. In these experiments, we often need to detect mRNAs expressed in individual cells and to determine their expression levels. Therefore, in this study, we tried to develop RT-PCR method to determine the expression level of mRNA in individual dissociated cells. Dorsal root ganglia (DRG) were isolated from male ICR mice (3 weeks old), and DRG neurons were dissociated by treated with collagenase (2.5 mg/ml) at 37 °C for 30 min. Single neurons that responded to substance P with an increase in intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> were sucked into a glass capillary and expelled into test tubes. Each neuron was treated with proteonase K (200 mg/ml) at 37 °C for 30 min. After treated with DNase I (7 U/ $\mu$ l) at 37 °C for 20 min, mRNA of NK<sub>1</sub> receptor and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in single cell were determined by RT-PCR. The mRNAs could be detected by 45 cycle PCR. The results indicate the expression of NK<sub>1</sub> receptor mRNA in at least some primary sensory neurons. This single-cell RT-PCR is simple and be used for semi-quantitative determination of the expression level of target mRNA.

6) 佐々木美和, 東田千尋, 倉石 泰: ラット脊髄からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離の3種炎

症下での部位特異的增加, 第20回日本神経科学会, 1997, 7, 仙台.

ラット脊髄後角からの capsaicin 誘発 glutamate 遊離の carrageenin, formalin 及び adjuvant 処置による炎症下での変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。いずれの炎症刺激でも glutamate の遊離量が I, II 層で増加し, adjuvant 処置では X 層でも有意に増加した。末梢組織の炎症状態では, 脊髄後角 I, II 層 (及び X 層) における capsaicin 感受性一次求心線維からの glutamate 遊離が増加していると考えられる。

7) 東田千尋, 倉石 泰: NC マウスの引っ掻き行動と大脳皮質における MEF2C mRNA の増加, 第7回痒みシンポジウム, 1997, 8, 大阪.

痒みの感覚・知覚の中樞性の制御機序を明らかにする目的で, アトピー性皮膚炎のモデルとなる可能性がある NC マウスに着目し, その痒み関連行動の観察と痒みに関与する神経性因子の同定・解析を行った。

NC マウスは生後2ヶ月から6ヶ月の間に自然発症的に, 顔面・耳介を中心に紅斑, 脱毛, 出血といった皮膚病変を示した。これらの病変の発現時期や程度には同腹子間でも差異があった。皮膚病変を示したマウスは1日中高頻度で scratching を示したが, 皮膚病変を示していないマウスはほとんど scratching を示さなかった。この2群間の脳各部位で異なる発現量を示す mRNA を differential display 法により解析した結果, 転写因子として知られている MEF2C が scratching 群の大脳皮質で増加していることが明らかになった。Scratching を示す NC マウスの側脳質に, MEF2C 遺伝子に対する antisense oligomer を注射し, 脳内の MEF2C 発現量を減少させたところ, 有意に scratching が減少した。以上, 自然発症的に皮膚病変と激しい引っ掻き行動を示す NC マウスは, アトピー性皮膚炎などの痒みの研究に有用な動物モデルとなる可能性がある。また, 大脳皮質の MEF2C が痒みの感覚あるいは知覚に関与していることが示唆される。

8) Fushimi H., Komatsu K., Isobe M., Kimura T., and Namba T.: Genetic Heterogeneity of Ribosomal RNA Gene in *Panax notoginseng*. International Symposium on Natural Medicines, 1997, 10, Kyoto.

We have succeeded to extract the total DNAs from Ginseng drugs, i.e. Ginseng Radix, *Panax japonicus* Rhizoma and *Panax quinquefolii* Radix and to determine their 18S ribosomal RNA gene sequences and partial sequences of the plastid gene

*matK* that corresponded with those of original plants, *Panax ginseng*, *P. japonicus* and *P. quinquefolius*, respectively (each sequence determined: RgMg, RjMj, RqMq; Mg=Mj).<sup>1,2)</sup> Between *Notoginseng Radix* and its source, *P. notoginseng*, however, 5 base substitutions were observed in the 18S rRNA gene and *matK* gene sequences, respectively (the sequence of crude drug shown as R2M2 and that original plant as R1M1; R2=Rg, M2=Mg). In order to clarify the genetic heterogeneity in *P. notoginseng*, a sequence analysis of 10 samples of the same lot of *Notoginseng Radix* from Wenshan County of Yunnan Prov., China was performed on the two genes. The restriction enzyme, *Dde* I was selected on the basis of each sequence of the 18S rRNA gene from the 2 strains, one with R1 sequence and another with R2 sequence. In the electrophoretic profile, the PCR products on the 18S rRNA gene of 8 samples of the 10 samples digested with the enzyme *Dde* I showed the same fragment pattern as that of the R2 strain, while in 2 samples, the products showed the same pattern as that of the R1 strain. Their gene sequences around the region of 491-730 base pairs (bps), where 3 base substitutions were present between R1 and R2 sequences, showed that the former (8 samples) did not correspond with that of the R2 strain because 22 base substitutions were observed, whereas the latter (2 samples) corresponded with that of the R1 strain. Moreover, in one sample of the former, the total sequence of the 18S rRNA gene was determined to be 1809 bps (R3) and its homology with the R2 sequence was 96.5%. On *matK* gene, the partial sequence of this sample was found to be 1259 bps and to correspond with the M1 sequence.

In conclusion, there were 3 strains on *Notoginseng Radix* derived from *P. notoginseng*, having R1M1, R2M2 and R3M1 sequences, respectively, and each strain was mixed up within the same lot. Thus, the genetic heterogeneity of 18S rRNA gene was revealed. This heterogeneity can give valuable informations on the origin of cultivated species, *P. notoginseng*. The 18S rRNA gene sequence of the other *Notoginseng Radix* obtained from Vietnam market will be reported.

1) Fushimi H., Komatsu K., Isobe M. and Namba

T., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**(11), 1530-1532 (1996).

2) Fushimi H., Komatsu K., Isobe M. and Namba T., *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

9) Tohda C., Komatsu K., Kuraishi Y.: Increased expression of mRNA for myocyte-specific enhancer binding factor (MEF) 2C in the cerebral cortex of the itching mouse. 27th Society for neuroscience, 1997, 10, New Orleans, USA.

To elucidate factors which might be involved in the sensation or perception of itch, we examined itch-related behaviors and neuronal gene expression of NC mice which show severe dermatitis and atopic dermatitis-like changes in inflammatory cells. Some NC mice spontaneously began to scratch their bodies and showed skin lesions, such as eczema, bleeding and alopecia at 2-6 months after birth. The mice with skin lesions scratched mainly the face, ears and the rostral part of body by the hind paws all day long. An average of scratching frequency was  $126.7 \pm 36.8$  ( $n=4$ ) and  $5.3 \pm 4.7$  ( $n=3$ ) per hour in skin-lesioned and non-lesioned control mice, respectively. A differential display analysis of gene expressions in several regions in central and peripheral nervous systems was performed between these scratching and control groups. One of fragments which were expressed at higher level in a scratching group than in control group was 3'-non-coding region of myocyte-specific enhancer factor (MEF) 2C in the cerebral cortex. RT-PCR analysis of MEF2C mRNA in NC mice revealed that the expression level of this mRNA in the cerebral cortex was about 20 times as high in scratching mice ( $n=3$ ) as control ones ( $n=3$ ). Knockdown of MEF2C in the cerebral cortex by antisense oligo inhibited the frequency of scratching in NC mice. These results suggest that MEF2C may be involved in the sensation or perception of itch in the cerebral cortex.

10) 小松かつ子：漢薬の基源に関する研究—組織形態学の展開と分子生物学的手法の応用。日本薬学会北陸支部第97回例会，研究奨励講演，1997，11，富山。

現在我国で見られる疾病構造の変化は，和漢薬方剤のニーズを徐々に増やしている。方剤の効果はそれを構成する生薬の品質の優劣に係わっているが，生薬は天産物に由来するため種々の品質のものが存在し，治

療効果にバラツキを生じさせる原因になっている。この品質を左右する第一の要因が生薬の基源であり，各国の公定書においても先ずこれが規定されている。しかし，実際の各国市場においては規定された生薬以外にも流通し，規定品をも含めそれら市場品の原植物が同定できない場合が多々ある。これまで生薬を同定する目的で組織形態学的手法が用いられてきたが，生薬とその原植物であるといわれている種を含む同属植物数種との比較のみで，その時限りの報告で終わることがしばしばであった。また，漢薬の場合中国に産する植物も材料にすべきであるが，それらの入手が困難であったため日本産の植物で代用し，形態の地域変異を考慮していない観察になることもあった。一方，公定書などの原植物に関する記載が現状の生薬を十分に認識し研究された後に規格が設けられているかという点，矛盾する生薬も認められる。以上から，比較組織学的研究を行うには種々の文献をあたって地域使用品，代用品，偽品の報告のある種をも含めた多種，多個体の比較植物を集めることが前提となる。これらを材料にして各種の特徴に基づいた組織分類法を確立して初めて生薬の同定が確実になる。このような観点から，繁用生薬で公定書の記載に若干の矛盾がある漢薬「黄精」及び「升麻」について検討した。次に，比較組織学的手法では客観性の点で問題が生じることがあることから，分子生物学的手法の応用を「川芎」及び人参類生薬で検討した。

#### 1. 比較組織学的研究

「黄精」はユリ科の *Polygonatum* 属植物の根茎に由来し，補気強壯薬として，同類の「玉竹」と区別して使用される。近年血糖低下作用が報告されているが原植物に関する記載はない。『中華人民共和国薬典』には「黄精」は *P. kingianum*, *P. sibiricum* 及び *P. cyrtoneuma*, 「玉竹」は *P. odoratum* の根茎であると規定されているが，中国の地方薬物誌などをまとめると，それぞれ17種，14種が記載される。一方，日本の『日本薬局方外生薬規格』では「黄精」は *P. falcatum*, *P. sibiricum* または近縁植物の根茎であるとされる。各種間の薬効上の差異は不明であるが，研究上，使用上では原植物が明確である必要がある。そこで，両生薬の市場品の同定を目的として，上記の種を含む中国，韓国，日本産 *Polygonatum* 属26種3変種について根茎の組織形態に基づく分類法を検討した。各種は中心柱内の維管束の種類により3大別され，さらに粘液細胞の密度と径，維管束の径，道管の種類などの形質に特徴が見出され，若干の例外を除いて区別可能となった。この結果から，各50点余の市場品の基源を明らかにし，薬典



取載品以外に「黄精」では *P. zanlanscianense*, 「玉竹」では *P. macropodium*, *P. prattii* の流通量が多いこと、及び「黄精」では各地で *P. odoratum* の混入が見られ、香港市場の「玉竹」は黄精とすべき種であることが判った。

「升麻」は発疹性、熱性、化膿性疾病に繁用され、抗炎症、抗骨粗鬆症作用などが報告されている。基源として中国ではキンポウゲ科の *Cimicifuga heracleifolia*, *C. dahurica* 及び *C. foetida*, 日本では *C. simplex* またはその他同属植物の根茎が規定される。古来異物同名品が多い薬物とされ、正品は *Cimicifuga* 属に由来するが、その他にキク科の *Serratula* 属, ユキノシタ科の *Astilbe* 属, バラ科の *Aruncus* 属及びキツネノマゴ科の *Strobilanthes* 属などにも及ぶとされる。そこでこれら5科5属の18種3変種の根茎について各種の組織学的特徴を精査した。始めに *C. simplex* の形態変異を調べて比較材料, 比較部位を設定した。形態観察では常法の他, 画像解析装置を用いて木部の年輪様構造を数値化した。*Cimicifuga* 属は内皮がないか不連続でシュウ酸カルシウムの集晶がないこと, *Astilbe* 属は二次木部に柔細胞が存在し道管は階紋穿孔, *Aruncus* 属は内皮がなくかつ集晶が存在し, *Strobilanthes* 属は炭酸カルシウムの鐘乳体が存在し, *Serratula* 属は離生分泌道があることで, 各属間は分けられた。*Cimicifuga* 属, *Astilbe* 属の各種間は二次木部の年輪様構造, 大型道管の配列様式などの形質により区別された。この組織分類法に基づいて市場品の基源を検討し, 中国では北部の市場で *C. heracleifolia* 及び *C. dahurica* に由来する市場品が, 西南部から南部の市場で *C. foetida* 及び偽品である *St. forrestii* の根茎が流通していることが判った(出現率は約2:1)。雲南市場の「紅升麻」は *As. rivularis* とその変種の根茎, 広州及び香港市場の「広升麻」, 「緑升麻」などはすべて *Se. chinensis* の根であった。現在日本では中国産「升麻」が使用されており, 通常北部から入手するため *C. heracleifolia* 及び *C. dahurica* の根茎が主で, 若干 *C. foetida* も認められた。生薬は基源のみならず成分化学, 生化学, 薬理学的な品質評価が不可欠であり, 今回それらの研究の基礎固めができた。

## 2. 分子生物学的手法の応用

生薬は乾燥後長期間保存されまた微生物汚染の可能性のあることから, RELP 分析及び RAPD 分析の適用には問題がある。そこで, 科さらには種のレベルで遺伝子の塩基配列に違いがあることが報告されている18S ribosomal RNA 遺伝子及び *matK* 遺伝子について, これらの領域の塩基配列の異同から生薬が同定で

きないかを検討した。

### 1) 18S ribosomal RNA 遺伝子の塩基配列

日本産及び中国産「川芎」, 及びそれらの原植物の新鮮な根茎から CTAB を用いる方法により全 DNA を抽出した。新鮮な材料からは 20kb 以上の DNA が得られたが, 生薬からは種々の長さに切断されたスメア状の DNA が確認された。これらの DNA を鋳型にして PCR 法で 18S rRNA 遺伝子領域を増幅したところ, とともに 1.8kb の PCR 産物が得られた。塩基配列を決定した結果, 両国産の「川芎」及びそれらの原植物の 18S rRNA 遺伝子はすべて 1808 塩基対で, 塩基配列は完全に一致した。日本産及び中国産「川芎」はそれぞれセリ科の *Cnidium officinale*, *Ligusticum chuanxiong* に由来するが, 前者は結実しないため植物分類学上の位置付けが不明であるとされる。今回の結果から同種は *Ligusticum* 属に極めて近縁な種といえる。このように生薬からも DNA が抽出可能で, PCR 法により 18S rRNA 遺伝子領域が増幅できたことから, 次にウコギ科 *Panax* 属植物の地下部に由来する人参類生薬に応用した。人参類生薬には「人参」, 「竹節人参」, 「広東人参」, 「三七人参」があり, それぞれ *P. ginseng*, *P. japonicus*, *P. quinquefolius*, *P. notoginseng* を基源とする。上記と同様な方法により, 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定したところすべて 1809 塩基対であった。*P. ginseng*, *P. japonicus* 及び *P. quinquefolius* の3種間では, 497, 499, 501, 712番目の塩基の位置で置換が認められ, これら3種の塩基配列は各々対応する人参類生薬と完全に一致した。富山県, 宮崎県及びインドのアルナチャールで採集した *P. japonicus*, 日本産及び韓国産の「人参」では当該遺伝子領域の塩基配列は各々の種で一致し, 産地による差異はなかった。次に3種間の簡便な鑑別法を開発する目的で, 塩基配列の差異に基づいて制限酵素 *Ban* II 及び *Dde* I を選び PCR-RFLP 分析を行い良好な結果を得た。さらに, 499~501番目にプライマーの3'末端が位置するように3種に特異なプライマーを合成し, これらを用いて *Panax* 属植物及び人参類生薬から得られた DNA を鋳型として PCR 法を行い, 各々のプライマーに対応する植物及び生薬でのみ増幅が認められるプライマーのアニーリング及び伸長反応の温度と時間を設定した。

### 2) *matK* 遺伝子(葉緑体遺伝子)の塩基配列

*Panax* 属3種の *matK* 遺伝子の部分塩基配列はすべて 1259 塩基対で, *P. ginseng* と *P. japonicus* は相同であったが, *P. quinquefolius* は 102 番目の塩基の位置で置換が認められ, この置換は「広東人参」でも確

認された。

### 3) *Panax notoginseng* の遺伝子の多形性

*P. notoginseng* と「三七人蔘」の間では 18S rRNA 遺伝子, *matK* 遺伝子ともに塩基配列が 5ヶ所で異なった (R1M1, R2M2)。そこで新たに雲南省文山県産「三七人蔘」の同一ロットから 10 個体を選んで遺伝子解析を行った結果, *matK* 遺伝子 (母性遺伝) は相同であるが, 18S rRNA 遺伝子の塩基配列が異なる 2 系統が確認された (R1M1, R3M1)。

以上, 生薬の遺伝子解析が種の同定に有力な手段となること, 及び遺伝子解析が栽培植物の起源を考える上で有益な情報を与えることを示唆できた。

11) 伊藤 親, 小松かつ子, 難波恒雄: 「花椒」及び「山椒」の精油及び辛味成分. 第 17 回漢方学術大会, 1997, 11, 東京.

【目的】「花椒」及び「山椒」はミカン科の *Zanthoxylum* 属植物の果皮に由来する生薬で, 中国・日本でそれぞれ芳香性健胃, 消炎, 利尿, 駆虫薬として消化不良, 胃内停水, 心腹の冷痛, 回虫症などに応用され, また, 「大建中湯」の処方中に「蜀椒」として配合されている。漢薬「花椒」の基源は『中華人民共和国薬典』に *Z. schinifolium* Sieb. et Zucc. 及び *Z. bungeanum* Maxim. の成熟果皮であると規定されているが, 他の成書では 2 種のほかに 10 数種の同属植物の果皮も薬用に供するとされている。一方, 日本では「蜀椒」の代用として日本産の *Z. piperitum* サンショウを充て, 江戸期以来 *Z. piperitum* f. *inerme* アサクラザンショウを良品としてきた。現在の『第十三改正日本薬局方』では *Z. piperitum* DC. サンショウまたはその他同属植物の成熟した果皮であると規定され, 中国及び日本では基源植物が異なっている。そこでこれまでに「山椒」及び「花椒」市場品の基源であることを確証した *Zanthoxylum* 亜属の各種を中心にして, 日本産, 中国産及びネパール産 6 種 2 変種 1 品種について, 先ず精油及び辛味成分を明らかにし, その後, 原植物の判明した各地市場品も同様に検討してそれぞれを比較した。

【材料】日本産: *Z. piperitum* サンショウ, *Z. piperitum* f. *inerme* (アサクラザンショウ, ‘ブドウザンショウ’), *Z. armatum* var. *subtrifoliatum* フユザンショウ, 中国産: *Z. bungeanum*, *Z. armatum* var. *subtrifoliatum*, *Z. simulans*, *Z. acanthopodium* var. *timbor*, *Z. piasezkii*, ネパール産: *Z. armatum*. 日本市場品 4 点, 中国市場品 17 点.

【方法】安田ら\*の方法に準じて試料を調整した。精油成分として  $\alpha$ -pinene(1), sabinene(2), myrcene(3), limonene(4),  $\beta$ -phellandrene(5), ocimene(6),

linalool(7), citronellal(8), linalyl acetate(9),  $\beta$ -caryophyllene(10), geraniol(11), geranyl acetate(12), methyl cinnamate(13), xanthoxylin(14) を GC で定量した。また辛味成分の  $\alpha$ -sanshool (I),  $\beta$ -sanshool (II),  $\gamma$ -sanshool (III), hydroxy- $\alpha$ -sanshool (IV), hydroxy- $\beta$ -sanshool (V), hydroxy- $\gamma$ -sanshool (VI) を HPLC で定量した。

【結果】精油成分では, 日本産のサンショウ及びその品種ではともに 4, 5 が高い成分組成を示した。しかし, 主成分が若干異なり, サンショウは 5, アサクラザンショウは 4, ‘ブドウザンショウ’では 12 が高含量であった。精油の総含量は母種に比べて品種が高い値を示し, アサクラザンショウと‘ブドウザンショウ’では後者がやや高い傾向を示した。中国産の *Z. bungeanum* も 4, 5 の含量が高かったが, さらに四川省産のものでは 9 も高含量で 2.37% を示した。*Z. armatum* var. *subtrifoliatum* には 14 が高含量のもの (A タイプと称す: 中国産の一部) と 14 はなく 2, 4, 7 などからなるもの (B タイプと称す: 中国産の一部と日本産) があった。B タイプの成分組成は基本的には母種である *Z. armatum* に類似したが, 母種のみ 13 が検出された。14 が高含量である成分組成は *Z. piasezkii* でも認められた。*Z. simulans* では保持時間 16 分付近に顕著な未同定ピーク a が認められた。*Z. acanthopodium* var. *timbor* は精油含量が少なく, またその主成分は 5 であった。辛味成分では *Z. armatum* var. *subtrifoliatum* の A タイプ, *Z. simulans*, *Z. acanthopodium* var. *timbor*, *Z. piasezkii* を除いた種で IV が高含量であった。6 成分の総含量及び IV の含量はサンショウとその品種で高く, 特に‘ブドウザンショウ’が高い値を示した。*Z. bungeanum* は I, II, III が検出されないかまたは微量である点でサンショウ及びその品種と異なっていた。*Z. armatum* var. *subtrifoliatum* の A タイプ及び *Z. piasezkii* は I, *Z. simulans* は II, *Z. acanthopodium* var. *timbor* は VI が高含量であった。「山椒」及び「花椒」市場品は原植物とほぼ同様の成分パターンを示した。精油成分では‘ブドウザンショウ’とアサクラザンショウの混合品に由来する「山椒」市場品, 及び四川省産の *Z. bungeanum* に由来する「花椒」市場品に精油成分が多く, 両者の間では前者の総含量が高い値を示した。成分組成では, ‘ブドウザンショウ’を多く含む市場品は 12 が多く, *Z. bungeanum* からなる市場品は 9, 7, 4 を多く含有していた。*Z. armatum* var. *subtrifoliatum* の単一品または同種と *Z. bungeanum* の混合品からなる市場品は多くが A タイプであり, 14 が高含量であった。辛味成分では‘ブドウザンショウ’とア

サクラザンショウの混合品に由来する「山椒」市場品、及び四川省産の *Z. bungeanum* に由来する「花椒」市場品に辛味成分が多く、特に後者の総含量が高い値を示した。辛味成分をほとんど含まない3市場品を除いて、すべてIVが主成分であった。‘ブドウザンショウ’とアサクラザンショウの混合品からなる「山椒」市場品は、Vに次いでIが多いのに対し、*Z. bungeanum* 及び *Z. armatum* var. *subtrifoliatum* に由来する「花椒」類市場品ではIが微量であった。

【考察】「山椒」及び「花椒」類の基源として確証した *Z. piperitum* サンショウ及びその品種と *Z. bungeanum* 及び *Z. armatum* var. *subtrifoliatum* では、共通する精油及び辛味成分もあるが、一部の組成及び個々の含量が異なっていた。このことから、両者は別生薬としての認識が必要であり、「花椒」の2種類も分けて考えるべきである。

\*安田一郎, 竹谷孝一, 糸川秀治, 生薬, 36, 301 (1982).

12) 佐々木美和, 東田千尋, 倉石 泰: 炎症性および反復低温ストレス性痛覚過敏感受性状態におけるラット腰髄切片からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離の部位特異的増加: 画像解析法による検討. 第19回日本疼痛学会, 1997, 12, 長崎.

Glutamate (Glu) は、中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質の1つであり、脊髄後角における痛覚の伝達に関与する。我々は、 $\text{NAD}^+$  存在下に遊離Gluを glutamate dehydrogenase で代謝する過程で生成する NADH の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で検出することにより、脊髄切片からの Glu 遊離の分布を視覚化する方法を確立した。今回、この方法を用いて、炎症あるいはストレス負荷により痛覚過敏感受性状態にあるラットの脊髄からの Glu の capsaicin 誘発性遊離の変化について比較検討した。雄性 SD 系ラット (4-5 週令) から腰髄を摘出して、約 1 mm の厚さの切片を作製した。脊髄中に分布する一次求心線維終末を特異的に興奮させる目的で切片を capsaicin (10  $\mu\text{M}$ ) で刺激し、刺激前後の蛍光強度の差から Glu 遊離量を算出した。炎症は、5% formalin, 1% carrageenin あるいは Freund's complete adjuvant (FCA) をラットの右後足に皮下注射 (50  $\mu\text{l}$ ) して惹起し、各々 2 時間、4 時間あるいは 3 日後に Glu の遊離量を調べた。3 種の炎症性刺激で、炎症側腰髄からの Glu の capsaicin 誘発遊離量が反対側に比較して第 I-II 層で有意に増加した。FCA 処置では第 X 層でも増加が認められた。一方、ラットを 30 分毎に 4  $^{\circ}\text{C}$  と 24  $^{\circ}\text{C}$  の環境に曝すことを 3 日間繰り返し反復低温ストレスを負荷して痛覚過敏感受性を惹起すると、腰髄切片の第 I-II, III-

IV, V 層で Glu の capsaicin 誘発遊離量が健常ラットに比較して有意に増加した。以上の結果は、炎症あるいは反復低温ストレスで生じる痛覚過敏感受性状態では capsaicin 感受性一次求心線維からの Glu 遊離量が増加するとの考え方を支持する。反復低温ストレスによる Glu 誘発遊離増加の分布が炎症性の分布と異なったことは、これらの遊離量増加のメカニズムが異なる可能性を示唆する。

13) 田中愛子, 半明敬子, 斎藤智裕, 大杉瑞恵, 門田重利, 小松かつ子, 川西千恵美, 田澤賢次: ミネラルウォーターの活性酸素消去能. Japanese Society for Food Factors 第 2 回学術集会, 1997, 12, 京都.

【目的】最近活性酸素の生体への影響について注目されている。ビタミンやミネラルは体によいとされ、還元剤として体に作用しているといわれている。そこで、近年おいしい水、安全性が高い水ということで消費量が増加しているミネラルウォーターについて活性酸素消去能の有無を比較検討した。

【材料と方法】9種類の国産品と5種類の輸入品の合わせて14種類のミネラルウォーター(サンプル)を実験に用いた。サンプルは、室温(22 $^{\circ}\text{C}$ )、70 $^{\circ}\text{C}$ で30分加熱したもの、100 $^{\circ}\text{C}$ に煮沸したものを一度室温に戻してから測定に用いた。試薬として、2 mM のヒポキサンチン溶液 (HPX) 50  $\mu\text{l}$ , Diethylene triaminepenta acetic acid (DETAPAC) 35  $\mu\text{l}$ , 9.2M55-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) 15  $\mu\text{l}$ 。サンプルの原液 50  $\mu\text{l}$  を混和させ、0.4 U/ml のキサンチンオキシダーゼ溶液 (XOD) 50  $\mu\text{l}$  を入れ、1 分後 ESR 装置に試料管を入れた。そして、20 秒後に SOD 活性値として測定した。また、マンガン (Mn) ラジカルを内部標準として用い、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) ラジカルの相対ピーク比 (RI) と、 $\text{O}_2^-$  ラジカル補足率を求めた。なお ESR 装置には日本電子株式会社の JES-FR30 フリーラジカルモニタを使用した。

【結果】ミネラルウォーターにおける活性酸素消去能は、温度の変化別にみると、22 $^{\circ}\text{C}$  のものでは、 $\text{O}_2^-$  ラジカル補足率が平均 -11.9% (最小 -49.7% ~ 最大 16.1%)、70 $^{\circ}\text{C}$  で 30 分加熱のものでは、平均 28.8% (14.8% ~ 44.1%)、100 $^{\circ}\text{C}$  に煮沸したものでは、平均 -5.4% (-14.5% ~ 4.3%) であった。また原産国別にみると、国産品では 22 $^{\circ}\text{C}$  で平均 16.0%、70 $^{\circ}\text{C}$  で 22.8%、100 $^{\circ}\text{C}$  で -4.7% であり、輸入品は、それぞれ -29.0%、39.6%、-6.7% であった。全てのミネラルウォーターで 70 $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間加熱したものが、 $\text{O}_2^-$  ラジカル補足率が高く、平均 40.7% (最小 4.4% ~ 最大

88%)の上昇がみられた。100℃に煮沸したものは、22℃のものよりもO<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル補足率は高いものが14品目中7品目で、その内国産品は、9品目中6品目と多かったのに比べ、輸入品は1品目だけであった。

【結語】今回、ミネラルウォーターについて活性酸素消去能の有無を比較検討した。全てのミネラルウォーターで70℃で30分間加熱したものが、活性酸素消去能が高かった。また、100℃に煮沸したものは、22℃のものより半数が活性酸素消去能が高く、その大半が国産品であった。

#### ◇ 著 書

- 1) 森 望, 東田千尋, 野村靖幸: GAP-43, ノックアウトマウス・データブック, 中山書店, 1997.

#### ◇ 総説その他雑報

- 1) 小松かつ子, 難波恒雄: 中国における仏教医学の調査研究, アーユルヴェーダ研究, 27:28-44, 1997.

#### ◇ 講演等

- 1) 小松かつ子: 体験実習(1)～和漢薬鑑定に挑戦; 富山医科薬科大学和漢薬研究所夏期セミナー「和漢薬に触れる」(於インテック大山研修センター),

1997年7月24日

- 2) 小松かつ子: 野外で薬草を勉強する会; 富山県薬事研究所(於立山町吉峰), 1997年7月29日
- 3) 小松かつ子: 中国の仏教医学について—青海と敦煌を中心に—; アーユルヴェーダ研究会東京月例会(於東京・神楽坂エミール), 1997年12月20日

#### ◇ 国際会議及び調査活動等に関連した海外出張(研修を含む)

- 1) 小松かつ子: インド, インド産黄連の調査, 1997年4月26日～5月7日
- 2) 小松かつ子: ベトナム・タイ・ミャンマー, 「ベトナム, タイ, ミャンマーにおける伝統医学並びに天然薬物資源の調査研究」, 1997年9月6日～10月31日(科学研究費・国際学術, 分担)
- 3) 東田千尋: 27th Annual Meeting, Society of Neuroscience (New Orleans, USA), 1997年10月25日～30日
- 4) 東田千尋: アメリカ合衆国, National Institute of Health の National Institute of Mental Health にて共同研究, 1997年11月4日～1998年2月27日

#### ◇ 民族薬物資料館来館者記録

## 民族薬物資料館 来館者記録

| 年度   | 来館者総数<br>(人) | 案内総回数<br>(回) | 日本人数<br>(人) | 日本人回数<br>(回) | 外国人数<br>(人) | 外国人回数<br>(回) | 国数 | 国名 (人数)  |
|------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|----|--|
| 1983 | 48           | 27           | 40          | 22           | 8           | 5            | 4  | 中国(4), 韓国(2), スウェーデン, ネパール(各1)   |
| 1984 | 157          | 69           | 116         | 54           | 41          | 15           | 7  | 中国(8), ミャンマー(3), 台湾, ネパール(各2), アメリカ, イギリス, インド(各1)   |
| 1985 | 164          | 65           | 104         | 42           | 60          | 23           | 7  | 中国(4), 台湾, ネパール(各3), アメリカ(2), イギリス, イタリア, トルコ(各1), 不明(5)   |
| 1986 | 52           | 24           | 43          | 17           | 9           | 7            | 5  | 中国(4), インドネシア, 韓国, ドイツ, パキスタン(各1), 不明(1)   |
| 1987 | 150          | 85           | 112         | 64           | 38          | 21           | 9  | 中国(5), スリランカ(4), トルコ(2), アメリカ, インド, 韓国, ソロモン諸島, ネパール, ブラジル(各1), 不明(1)  |
| 1988 | 332          | 129          | 287         | 108          | 45          | 21           | 9  | 中国(3), 台湾(4), 韓国(2), オーストラリア, スイス, スリランカ, チェコスロバキア, ドイツ, ネパール(各1)  |
| 1989 | 355          | 126          | 320         | 112          | 35          | 14           | 4  | 中国(2), 韓国(7), アメリカ(2), 台湾(1), 不明(3)  |
| 1990 | 430          | 172          | 376         | 152          | 54          | 20           | 11 | 中国(8), 韓国, タイ(各4), アメリカ, ブラジル(各3), カナダ, 台湾(各2), インド, オーストリア, スリランカ, ロシア(各1), 不明(1)   |
| 1991 | 384          | 153          | 346         | 134          | 38          | 19           | 7  | 中国(2), ネパール(4), タイ(3), アメリカ, インド(各2), スイス, 台湾, ロシア(各1), 不明(2)  |
| 1992 | 449          | 184          | 404         | 153          | 45          | 31           | 15 | 中国(11), 台湾(9), ネパール, ブラジル(各4), イギリス(3), アメリカ, インドネシア, 韓国, タイ(各2), インド, エジプト, スウェーデン, フランス, ミャンマー, ロシア(各1)  |
| 1993 | 457          | 191          | 395         | 159          | 62          | 32           | 11 | 台湾(3), 中国(14), 韓国(7), タイ(6), アメリカ, ドイツ, ネパール, ブラジル(各2), カナダ, パキスタン, ベルー(各1), 不明(1)   |
| 1994 | 670          | 135          | 598         | 107          | 72          | 28           | 14 | 中国(24), タイ(12), 韓国(11), フランス(5), アメリカ(4), エジプト, カナダ, ドイツ, ネパール(各2), ウズベキスタン, ザイール, ブータン, ベトナム, ベルー(各1), 不明(3)  |
| 1995 | 549          | 180          | 460         | 143          | 89          | 37           | 15 | 韓国(6), 中国(11), タイ(7), ブラジル, ベトナム(各4), エジプト, ドイツ(各2), アメリカ, イギリス, インド, オーストリア, カナダ, スコットランド, 台湾, チェコ(各1), 不明(1)   |
| 1996 | 569          | 185          | 485         | 155          | 84          | 30           | 19 | 韓国(3), 中国(11), タイ(10), アメリカ, 台湾(各4), インド, インドネシア, ドイツ, フィリピン, ベトナム, ミャンマー(各2), エジプト, カナダ, ケニア, ネパール, バングラデシュ, ベルー, モンゴル, ラオス(各1), 不明(2)  |
| 1997 | 437          | 172          | 382         | 153          | 55          | 19           | 20 | 韓国(17), 中国(9), インドネシア(5), タイ(3), アメリカ, スリランカ, ブラジル, カメルーン(各2), バングラデシュ, ザンビア, ケニア, フィリピン, タンザニア, ヨルダン, ルワンダ, イラン, スリナム, メキシコ, エジプト, インド(各1), 不明(1)   |
| 計    | 5203         | 1897         | 4468        | 1575         | 735         | 322          | 45 | 中国(296), 韓国(137), 台湾(50), タイ(47), アメリカ(20), ネパール(21), ブラジル(16), ドイツ, インドネシア, インド(各10), スリランカ(8), カナダ, ベトナム, エジプト(各7), イギリス, フランス, ミャンマー(各6), トルコ, ベルー, ロシア, フィリピン(各3), オーストリア, スイス, スウェーデン, チェコ, パキスタン, カメルーン, バングラデシュ, ケニア(各2), イタリア, ウズベキスタン, オーストラリア, ザイール, スコットランド, ソロモン諸島, ブータン, モンゴル, ラオス, ザンビア, タンザニア, ヨルダン, ルワンダ, イラン, スリナム, メキシコ(各1), 不明(2) |