

氏名	小此木 明
生年月日	
本籍	群馬県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第631号
学位授与の日付	平成16年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	生薬に付着する真菌類の実態と生薬品質への影響
論文審査委員(主査)	御影 雅幸(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	垣内 信子(薬学部・助教授) 太田 富久(薬学部・教授) 早川 和一(自然科学研究科・教授) 山下 克美(自然科学研究科・助教授)

学位論文要旨

Abstract

To study yeast contamination in crude drugs, I investigated the Bioburden of forty-three crude drugs and analyzed the thermal resistance of the yeasts contaminating them. High yeast counts (in the order of 10^4 cfu/g) were observed in *Artemisia Capillaris* Flower and *Asiasarum* Root. No correlation was observed between any two of the yeast count, the bacterial count and the fungal count. The species of yeast contaminating, in 8 crude drugs were isolated. Of the yeast species contaminating these crude drugs, especially those belonging to *Rhodospiridium* species or *Rhodotorula* species were found to have higher thermal resistance than standard yeast strains. Probably, they were survivors of heating during the crude drugs drying process.

In the next step, I isolated *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* from the underground part of the fresh plant of *Rheum officinale*, and *Aspergillus niger* spp., *Penicillium islandicum*, *P. rugulosum* from Rhubarb on the market. Incubation of Rhubarb extract with authentic *A. niger* resulted in decomposition of component such as sennoside A which was catharsis active ingredient of Rhubarb. On the other hand *A. niger* which I isolated did not affected sennoside A content. The result showed that among *A. niger*, there are varieties whose decomposing activity of sennoside A is different. Finally, I propose that processing with fungus may produce high quality Rhubarb, since it can be performed in ordinary temperature.

目的

生薬には土壌のみならず、自然界に由来する細菌や真菌などの微生物、また昆虫など、様々な異物が付着している。肉眼で確認できる土壌や昆虫などの不純物は除去できるが、微生物の除去は困難である。従って、生薬に適切な保管管理が行われないと、微生物による変質を引き起こし、品質の低下をもたらす恐れがある。とくに真菌の中には *Aspergillus flavus* のように発ガン物質のマイコトキシンを産生する菌株も存在する。一方で、生薬の伝統的な製薬技術である修治（加工調製）の中には麹類を用いて生薬の性質を改変させるなど、微生物を積極的に利用した生薬加工も行われている。近年、日本薬局方で生薬に付着する菌数の上限が規制されるなど、生薬の付着微生物に関する詳細な実態調査が行われるようになったが、酵母についての調査例や生薬に付着する微生物が品質に及ぼす影響についての検討はなされていない。

そこで、今回、『第十四改正日本薬局方』並びに『日本薬局方外生薬規格』に記載される常用生薬 43 品目について、付着酵母の実態とバイオバーデンの調査をした。さらに、生薬の調製加工時に行われる温風乾燥操作における酵母の生残特性を検討する目的で、熱抵抗性を調査した。また、生薬に付着する真菌類が生薬品質に及ぼす影響を検討する目的で、ダイオウを実験材料として、含有される瀉下活性物質のアントラキノン類に与える影響を調査した。

結果

1. 生薬のバイオバーデン

国内に流通する 43 品目に付着する細菌・かび・酵母数を Table 1 に示した。検出された細菌数はウイキョウ、サイシン、ニンジンにおいて 10^6 cfu/g レベル、かびはウイキョウが 10^5 cfu/g レベルであった。インチンコウ、ウイキョウ、オウバク、カンゾウ、サイシン、ビャクジュツ、マオウ、ヨクイニンの 8 品目から酵母が検出され、インチンコウとサイシンに 10^4 cfu/g レベルの酵母が確認された。付着微生物の検出率は、細菌で 100% (43/43)、かび 91% (39/43)、酵母 19% (8/43) であった。真菌（かび及び酵母）内のかび検出率は酵母に比較して高い結果であった。なお、細菌・かび・酵母の付着菌量にそれぞれ相関は認められなかった。

2. 生薬に付着する酵母の実態

(1) 酵母の形態観察

走査型電子顕微鏡による観察のため、分離酵母を前処理として 2%グルタルアルデヒド

溶液および1%オスミウム酸溶液に浸漬し、二重固定した。水洗、エタノール脱水、*t*-ブタノール置換、凍結乾燥を行い、オスミウムコーティング処理後、酵母表面の形態観察を行った。結果を Fig. 1 に示した。いずれも球形あるいは楕円形であり、その栄養増殖形式は多極性出芽増殖であった。

(2) 酵母の同定

生薬分離酵母の同定は遺伝子解析により行った。鋳型 DNA を純培養酵母から Triton X-100 を含む処理液で抽出し、18S rRNA と 5.8S rRNA 間のスペーサー領域 (ITS1) を標的領域とした PCR 反応を行った。PCR 産物は電気泳動によりバンドを確認し、その遺伝子配列をデータベースと照合し解析した。その結果、インチンコウから *Rhodotorula slooffiae*, ウイキョウから *Cryptococcus magnus*, オウバクから *Rhodosporidium fluviale*, カンゾウから *Cryptococcus* sp., サイシンから *Rhodotorula mucilaginosa*, マオウから *Cryptococcus albidus*, ビヤクジュツから *Rhodosporidium kratochvilovae*, ヨクイニンから *Cryptococcus uzbekistanensis* を同定した。

3. 熱抵抗性

生薬付着酵母の湿熱処理に対する耐熱性は、50°C加熱処理では強いものから順に、*Rhodotorula mucilaginosa* > *Rhodotorula slooffiae* > *Rhodosporidium fluviale* > *Rhodotorula mucilaginosa* NBRC0891 > *Rhodosporidium kratochvilovae* > *Cryptococcus albidus* > *Cryptococcus uzbekistanensis* > *Cryptococcus* sp. > *Candida albicans* ATCC10231 > *Cryptococcus magnus* であった。また、60°C加熱処理では *Rhodosporidium fluviale* > *Cryptococcus albidus* > *Rhodotorula slooffiae* > *Rhodotorula mucilaginosa* > *Rhodotorula mucilaginosa* NBRC0891 > *Cryptococcus uzbekistanensis* > *Rhodosporidium kratochvilovae* > *Candida albicans* ATCC10231 > *Cryptococcus* sp. > *Cryptococcus magnus* の順であった。熱抵抗性は *Rhodosporidium* 属と *Rhodotorula* 属で強い傾向が認められた。一方、生薬付着酵母の乾熱処理に対する耐熱性は *Rhodosporidium fluviale* のみ減少傾向を示し、標準菌株およびその他の分離菌株に変化はみられなかった。

4. 生薬品質に及ぼす影響

ダイオウの新鮮株から *Botrytis cinerea* (分離菌株 A, B) と *Fusarium oxysporum* (分離菌株 C, D) を分離し、また、市販品から *Aspergillus niger* (分離菌株 E), *Penicillium islandicum* (分離菌株 F) および *Penicillium rugulosum* (分離菌株 G) を分離した。これら分離同定株及び標準菌株の *Aspergillus niger* ATCC16404, *Candida albicans* ATCC10231 をダイオウの抽

出液にそれぞれ添加し、23°Cのインキュベータに放置培養した。1週間毎に一定量の培養液を10週目まで秤取し、検液中の sennoside A, sennidine A, アントラキノン類を HPLC で測定した。菌株を接種したダイオウ抽出液において、*Aspergillus niger* ATCC16404 では5週間、*Fusarium oxysporum* では8週間で、それぞれ抽出液中の sennoside A を消失させたが、市販品ダイオウから分離した *Aspergillus niger* 菌株では sennoside A は消失しなかった。

Sennoside A の分解生成物と判断される sennidine A は、*Aspergillus niger* ATCC16404 株では9週間、また分離菌株 E および F では8週間後にそれぞれ最大値を示した。

Rhein の量については分離菌株 G では6週間、C では7週間、*Aspergillus niger* ATCC16404 株では9週間で、分離菌株 B, D, E, F では10週間で、それぞれ最大となった。分離菌株 A と *Candida albicans* ATCC10231 では rhein 含量に変化がなかった。

Emodin の量については分離菌株 C では6週間、*Aspergillus niger* ATCC16404 株および分離菌株 D では8週間、分離菌株 B, E, F, G では10週間で最大となった。

Chrysophanol の量については *Aspergillus niger* ATCC16404 株、分離菌株 C, D では8週間、B, E, F, G では10週間で最大となった。

Aloe-emodin の量については、分離菌株 G では2週間、C では6週間、*Aspergillus niger* ATCC16404 株および分離菌株 D では8週間、分離菌株 B, E, F では10週間で最大となった。

まとめ

1. 生薬に付着する真菌類の実態

繁用漢方生薬 43 品目について、酵母を中心にバイオバーデンを調査した。酵母は生薬 43 品目のうち 8 品目に付着していた。分離した酵母はいずれも担子菌系の酵母で、インチンコウから *Rhodotorula slooffiae*, ウイキョウから *Cryptococcus magnus*, オウバクから *Rhodospiridium fluviale*, カンゾウから *Cryptococcus* sp. サイシンから *Rhodotorula mucilaginosa*, マオウから *Cryptococcus albidus*, ビャクジュツから *Rhodospiridium kratochvilovae*, ヨクイニンから *Cryptococcus uzbekistanensis* を同定した。これらの酵母は 60°C でほぼ不活性化したことから、生薬の日本薬局方に準じた温風乾燥は、原材料の収穫後間もない水分活性の高い状態であれば微生物量の減少に有効であると考えられた。

2. 生薬品質に及ぼす影響

(1) ダイオウから分離された真菌の *Botrytis cinerea* および *Fusarium oxysporum* は、ダイオウの主たる瀉下活性成分である sennoside A を分解することが明らかになった。

ダイオウの瀉下活性を低下させないためには、収穫後完全に乾燥するまでの間、また生

薬の保管中に、*Aspergillus niger* や *Fusarium oxysporum* などの真菌被害を受けないように水分活性を低く維持する必要がある。一方、古来の中国医学におけるダイオウの本質は駆瘀血、消炎、健胃などであり、これらの薬効を高め、瀉下活性を低下させるために、乾燥時に強く加熱されてきたが、加熱はジアンスロン以外の他の成分をも分解することが予測される。真菌類によって修治すれば加工を常温で行うことができるため、加熱品とは異なった品質のダイオウを生産できる可能性がある。

(2) *Aspergillus niger* の sennoside A 分解能は、ATCC16404 株と分離菌株で異なった。すなわち、前者では sennoside A を 8 週間で完全に分解したが、分離株では分解傾向を示さなかった。また、ダイオウから分離した菌株が sennoside A を分解しなかった点については、微生物の酵素の働きが異なる結果と考察した。アントラキノン配糖体および誘導体に対しての影響は、*Aspergillus niger* の sennoside A 分解能に見られるように、菌種間および菌株間に差が認められた。

微生物を利用した生薬修治の検討は今後の課題であり、菌種間のみならず菌株間の特性をも調査することにより、新たなる修治法が開発できるものと期待される。

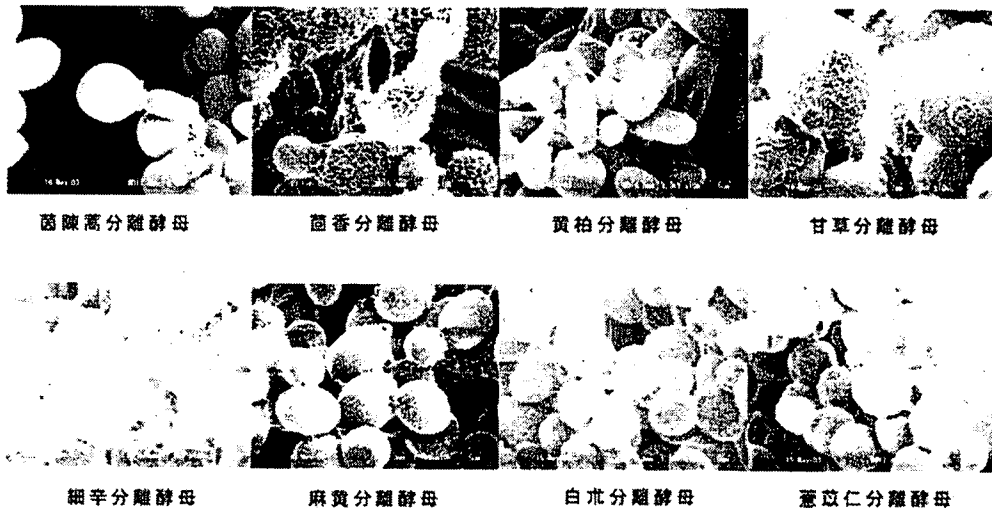


Fig.1.生薬から分離した酵母の電顕像

Table1. 生菌数試験結果 (cfu/g)

	生薬	産地	細菌数	真菌数	酵母数		生薬	産地	細菌数	真菌数	酵母数
1	茵陳蒿	浙江	4.3×10^5	4.2×10^4	3.1×10^4	22	センナ	イト	1.3×10^5	2.2×10^4	—
2	茴香	北海道	2.9×10^6	1.9×10^5	1.9×10^3	23	蘇葉	広東	4.7×10^4	5.8×10^3	—
3	黄芩	山東	1.2×10^4	8.2×10^2	—	24	大黄	四川	8.0×10^2	6.3×10^2	—
4	黄柏	岩手	9.3×10^3	3.4×10^3	2.8×10^3	25	沢瀉	四川	1×10^1	10↓	—
5	葛根	湖北	1.2×10^3	2.5×10^3	—	26	地黄	湖南	1.3×10^4	9×10^1	—
6	滑根	福建	1.6×10^5	5.1×10^4	—	27	大腹皮	外	3.5×10^1	10↓	—
7	甘草	寧夏	5.0×10^3	7.0×10^3	1.0×10^2	28	知母	河北	5.3×10^3	4×10^1	—
8	桔梗	湖北	1.7×10^2	1.8×10^2	—	29	当帰	浙江	3.5×10^5	9×10^1	—
9	杏仁	広東	7.5×10^3	1.4×10^3	—	30	桃仁	貴州	2.5×10^3	7.5×10^3	—
10	荆芥	河北	4.1×10^4	2.4×10^3	—	31	人參	吉林	1.7×10^6	1.3×10^4	—
11	桂皮	広東	8.0×10^2	4.0×10^2	—	32	薄荷	上海	4.3×10^3	2.5×10^2	—
12	厚朴	四川	1×10^1	1.0×10^2	—	33	半夏	貴州	1.6×10^2	10↓	—
13	五味子	黒龍江	5.3×10^3	1×10^1	—	34	白朮	黒龍江	3.9×10^5	6.0×10^3	2.0×10^3
14	細辛	吉林	2.7×10^6	3.7×10^4	2.6×10^4	35	白芷	浙江	6.9×10^4	4×10^1	—
15	山梔子	湖南	1.3×10^3	2.0×10^4	—	36	茯苓	安徽	8×10^1	4.0×10^4	—
16	山茱萸	河南	1.1×10^3	1×10^1	—	37	防風	内蒙古	1.6×10^5	1×10^3	—
17	山薬	河南	7.9×10^2	10↓	—	38	牡丹皮	安徽	5.1×10^3	3×10^1	—
18	芍薬	安徽	9.5×10^2	2×10^1	—	39	牡蛎	遼寧	1×10^1	1×10^1	—
19	生姜	貴州	1.8×10^2	1×10^1	—	40	麻黄	内蒙古	6.5×10^5	3.1×10^4	2.2×10^3
20	石膏	山東	2.2×10^3	1.5×10^2	—	41	薏苡仁	湖南	9×10^1	3×10^1	1×10^1
21	川芎	日本	7.3×10^3	2×10^1	—	42	竜骨	山西	1.6×10^2	4×10^1	—
						43	連翹	陝西	8.0×10^3	9.4×10^3	—

学位論文審査結果の要旨

生薬に付着する微生物の実態調査については、これまで細菌に関しては種々論議されてきたが酵母に関してはなかった。本研究は、生薬に付着する酵母を含む真菌類の実態および真菌類が生薬品質に与える影響を実験科学的に証明したものである。

発表者はまず、繁用生薬 43 品目の付着酵母の検討を行った結果、*Cryptococcus magnus* を始めとする 8 種の菌株を分離同定した。さらに、これらの生薬分離酵母の耐熱性を検討し、60℃ではほぼ不活性化したことから、現行の日局に準じた生薬の温風乾燥は、微生物量の制御に有効であると考察した。

次いで、真菌類が生薬品質に与える影響を実験科学的に証明するため、ダイオウを実験材料として、瀉下活性物質に与える影響を検討した。その結果、付着真菌の中に主たる瀉下活性成分である sennoside A を分解する菌株が存在することを見出し、瀉下活性を低下させないためには生薬の調製中あるいは保管中に真菌被害を受けないようにする必要があることを示唆した。一方、ダイオウには駆お血、消炎、健胃などの薬能もあり、これらの薬効を高め瀉下活性を低下させるなど、目的に則した品質のダイオウを得るために、今後は真菌類を利用した加工調製が期待できることを提唱した。

以上、本研究はこれまで解明されていなかった生薬付着酵母の実態を解明し、また真菌類を用いた生薬修治という新たな方向性を提示したもので、業績は博士論文（薬学）として高く評価される。