



Title	化石由来生薬『竜骨』のサステイナブルユース研究
Author(s)	小栗, 一輝
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61681
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

化石由来生薬『竜骨』の サステイナブルユース研究

2017年

大阪大学大学院薬学研究科
医療薬学専攻 伝統医薬解析学分野
小栗一輝

目次

緒言	1
本論	
第一章 医療用市場品竜骨の基原生物同定	4
第一節 大阪大学所蔵竜骨関連標本の基原動物	4
第二節 日中医薬品市場流通品における基原動物の差異	12
小括	15
第二章 漢方薬 桂枝加竜骨牡蠣湯 における竜骨の存在意義	17
第一節 放射線を用いた竜骨の特性解析	18
第二節 無機成分プロファイルに対する竜骨の影響	25
第三節 GC フィンガープリントに対する竜骨の影響	33
小括	38
第三章 竜骨の煎液成分調節作用メカニズムの解明	39
第一節 煎後残渣竜骨の表面分析	39
第二節 有機成分吸着作用の立証	43
小括	56
総括	58
謝辞	62
参考文献	64
主論文・参考論文リスト	70

緒言

竜骨(longgu)は、日本薬局方(日局)に「大型ほ乳動物の化石化した骨で主として炭酸カルシウムからなる」と規定される¹⁻⁹生薬で、中国最古の本草書である「神農本草経」に上品(不老長寿薬)として収載されて以来、現代にいたるまで精神安定薬として臨床で使用されてきたが、なぜ化石骨を使用するのは未だ不明である。

薬用資源としての竜骨にどのような課題が存在しているのか。まず、化石であるため、将来的な枯渇が不可避であり、また栽培・培養などの手段により生産することが不可能であることがあげられる。現在、日本で流通する竜骨はすべて中国からの輸入品であるが、資源枯渇に際し自国需要を満たすために輸出を停止するであろうことは明白である。また、古生物学上の学術研究資料であるということも大きな問題である。竜骨の産地とされる地域の中に古生物研究者が恐竜化石を発掘した地点¹⁰が複数含まれている(Fig. 1)。現地の採薬人(竜骨の採掘で生計を立てる者)たちが何の化石であるか鑑定して市場に流通させることはなく、過去に中国や日本で竜骨として流通した化石の中に恐竜化石が混在していた可能性はある。また、中国殷王朝の全貌解明につながった発掘調査は、薬局で販売されていた竜骨から甲骨文字が発見されたことがきっかけである¹¹

し、北京原人(*Homo erectus pekinensis*¹²)も、竜骨産地の一つである周口店(Fig. 1)近郊の「竜骨山」において竜骨採集人が発見したものであるなど、考古学上の発見に竜骨が大きくかかわっていたことも忘れてはならない。

医薬品原料の安定供給と、学術資料である化石資源保護の両立、すなわちサステイナブルユースを実現させるためには、竜骨の代替品開発やリサイクル化が有効な手段となるが、前提として竜骨の基原動物や化石生成過程、埋蔵地質環境因子、配合意義などを解明しなければならない。しかし、PubMedにおいて「ryukotsu」「longgu」をキーワードとして検索可能な文献は、1986年から2016年の間で52報のみである。そのうち50報が竜骨配合漢方薬・中国伝統薬のヒト・動物への投与実験で、成分や薬理作用など竜骨に焦点を当てた検討は2報のみと非常に乏しい。

そこで、我々は基原動物・漢方薬中への配合意義解明など竜骨の薬用資源学的検討に着手した。我々はまず竜骨の実像を把握するため、大阪大学博物館所蔵の日中医薬品市場品竜骨関連標本について形態学的検討を行い、基原動物の同定を試みた(第一章)。次に、竜骨配合意義について検討するため、竜骨が配合された漢方薬：桂枝加竜骨牡蠣湯(KRB)の煎剤について、無機元素並びに有機成分プロファイルを網羅的に分析し、竜骨配合の有無による煎剤成分への影響を解析し、竜骨の配合意義について考察した(第二章)。さらに、KRB煎剤作成前

後の竜骨の物性変化を分析することにより、煎剤成分に対し竜骨が影響を及ぼすメカニズムについて検討を行った(第三章)。これらの結果を総合し、竜骨の持続的利用を可能とする、現実的かつ実効性のある対策について考察した。

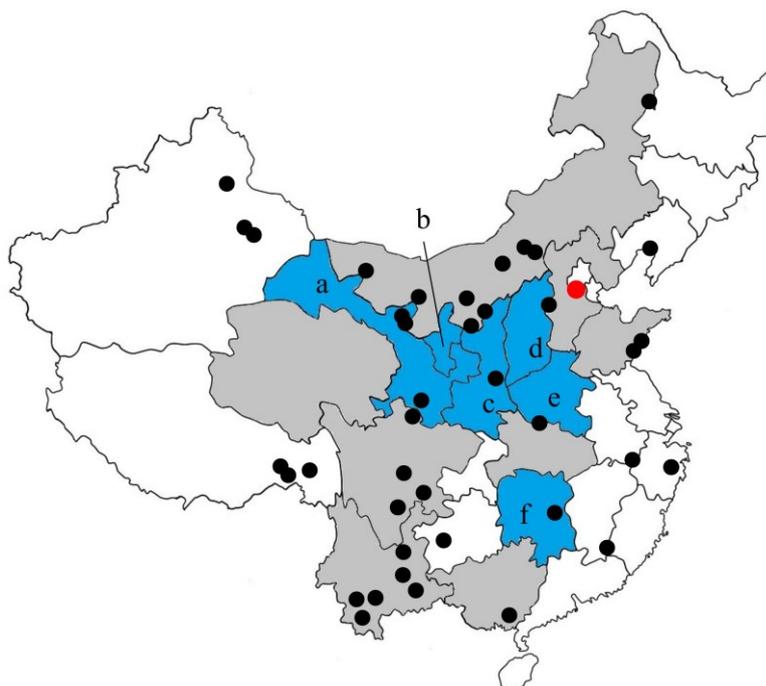


Fig. 1 Map of China indicating the main mining spot of dinosaur¹⁰ (black circle) and mining areas of longgu. Longgu in the current Japanese market are mined in blue area (based on the interview with Tochimoto Tenkaido Co., Ltd.): (a) Gansu Province, (b) Ningxia Hui Autonomous Region, (c) Shaanxi Province, (d) Shanxi Province, (e) Henan Province, (f) Hunan Province. In the past, longgu had been mined in gray area¹³. Red circle indicates the location of Zhoukoudian cave system in Beijing, China.

本論

第一章 医療用市場品竜骨の基原生物同定

竜骨の代替品の一つとして、現生生物骨を用いて化石化を再現した人工竜骨の創成が挙げられる。現行の竜骨市場品と近縁の動物種を原料とすることで、より物性・器質の類似した人工品が作成できると考えられる。竜骨は日局初収載以来哺乳類化石であるとされている¹⁻⁹が、我が国において実際に竜骨の基原動物を検討した事例は、8世紀に聖武天皇に献上された正倉院薬物に関する報告のみ¹⁴で、現代の市場品に関する報告は存在しない。そこで、大阪大学が所蔵する竜骨・竜歯関連標本について基原動物を同定した。

第一節 大阪大学所蔵竜骨関連標本の基原動物

【材料・方法】

1960~2011年に亘るフィールドワークにより蒐集された、大阪大学総合学術博物館所蔵の竜骨・竜歯関連標本33品目(「竜骨」24品目、「竜歯」5品目、化石骨3品目、化石歯1品目)を対象とした(Table 1)。標本は、日本市場流通品が11品目(標本1-11, 1960-2013年蒐集)、中国市場流通品が13品目(標本12-24, 1962-2014年蒐集)、由来市場不明品が9品目(標本25-33)で、長さ2-14 cm程度

Table 1 Overview of specimen groups examined in this study

No.	Name	Date	Area	Purchased from	Fragments	Weight(g)	Market
1	竜骨	Jan.21, 1960	China	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	19	52.5	Japan
2	土竜骨	May 23, 1960	Shaanxi Prov.	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	37	719.5	Japan
3	龍骨	Jun. 4, 1960	Shanxi Prov.	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	22	524.2	Japan
4	竜骨	Nov. 6, 1965	—	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	4	503.8	Japan
5	竜骨	May 14, 1972	—	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	2	261.9	Japan
6	竜骨	July 23, 2013	Gansu Prov.	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	80	2079.4	Japan
7	龍骨	Mar. 24, 1977	China	Mikuni.KK (Osaka)	3	123.6	Japan
8	JPリュウコツ	—	—	Nippon Funmatsu Yakuhin Co.,Ltd. (Osaka)	19	299.1	Japan
9	JPリュウコツ	Aug. 28, 2007	—	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	2538	162.6	Japan
10	JPリュウコツ	Aug. 2010	—	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	2845	179.5	Japan
11	JPリュウコツ	Sep. 4, 2010	—	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	2818	185.0	Japan
12	竜骨	July 14, 1962	—	Lung Tai Trading Co.(Hong Kong)	2	136.6	China
13	爰骨	—	Shanxi Prov.	China TUHSU Shanxi Branch	12	2016.8	China
14	爰骨	Aug. 15, 2007	—	Beijing Tong Ren Tang	9852	827.0	China
15	竜骨	Aug. 16, 2008	Shanxi Prov.	Anhui Jiren Pharmaceutical Co. Ltd.	160	73.2	China
16	生竜骨	Sep. 28, 2007	—	Shenyang Tong Ren Tang	93	100.4	China
17	竜骨	Oct. 2, 2007	—	Shenyang Shen-Rong-Pi-You market	27	184.3	China
18	竜骨	Oct. 2, 2007	—	Shenyang Wei Duo Pharmacy Co. Ltd.	90	20.5	China
19	焼竜骨	Aug. 15, 2007	—	Beijing Tong Ren Tang	1011	67.5	China
20	龍歯	July 1, 1963	China	Hong Kong Wing Tai Co.	348	447.5	China
21	龍歯	—	—	China TUHSU Hubei Branch	33	491.1	China
22	竜歯(白牙)	Feb. 18, 2014	Gansu Prov.	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	36	668.2	China
23	竜歯(青牙)	Feb. 18, 2014	Gansu Prov.	Tochimoto Tenkaido Co. Ltd.(Osaka)	45	1670.1	China
24	焼竜歯	Aug. 15, 2007	—	Beijing Tong Ren Tang	577	35.2	China
25	竜骨	—	—	—	6	298.4	—
26	竜骨	—	—	—	83	618.3	—
27	龍骨	—	—	—	52	39.4	—
28	龍首	—	—	—	55	285.0	—
29	龍首	—	—	—	28	251.8	—
30	化石骨	—	—	—	34	103.1	—
31	化石骨	—	—	—	1	301.6	—
32	化石歯	—	—	—	6	80.1	—
33	化石骨	—	—	—	1	767.0	—

JP: fit the criteria of the Japanese Pharmacopoeia, TUHSU: the abbreviation for the Chinese name of National Native Produce & Animal By-Products Import & Export Corporation

に粗く破碎され、化石の原形をとどめた検体を含む「原形」(標本 1-8, 12, 13, 16, 17, 21-23, 25, 26, 28-33)と、1 cm 程度に細かく砕かれた「砕」(標本 9-11, 14, 15, 18-20, 24, 27)の 2 剤型が存在した。

これら標本について、古生物研究者である北海道大学総合博物館 准教授 小林快次博士、並びに早稲田大学高等研究所 助教 西岡佑一郎博士の指導の下で大きさ・形状など外部形態に基づいて分類学的検討を行い、哺乳類化石につい

ては科レベルまでの同定を試みた。骨は Walker の哺乳類骨分類手引¹⁵ 及び現生生物(*Equus caballus*, *Bos taurus*, *Cervus nippon*, *Sus scrofa*, *Felis silvestris domesticus*, *Canis lupus familiaris*, *Hystrix brachyura*)の骨格標本、並びに学術文献に記載されている東南アジア、中国で発掘された絶滅生物(*Aceratherium porpani*, *Coelodonta nihowanensis*, *Hipparion sinense*, *Hipparion tchikoicum*, *Equus eisenmannae*, *Stegodon* spp., *Carnivora* spp.)¹⁶⁻¹⁹ 化石の性状と比較した。歯は直接骨格標本・文献と比較した。

また、日本市場品の産地、加工などの動向について株式会社栃本天海堂に聞き取り調査を行った。

【結果・考察】

標本は 20,939 検体の化石片(14.57 kg)から成り、内 19,894 検体(11.18 kg)が「竜骨」或は「化石骨」の名称が付いた標本で、1,045 検体(3.39 kg)が「竜歯」或は「化石歯」の名称が付いた標本であった。検討の結果、20,939 検体の化石片は、19,766 検体(10.84 kg)の化石骨片と 1,173 検体(3.74 kg)の化石歯片であることを明らかにした。標本 1, 9, 10, 11, 14, 18-21, 26, 28-30 は化石骨と化石歯が混在しており、「日局リュウコツ」とラベル表記のある標本 8 は全て化石歯片であった。標本 2-7, 12, 13, 15-17, 22-25, 27, 31-33 はそれぞれラベル記載の品名通り竜骨は

化石骨、竜歯は化石歯のみで構成されていた。各化石片検体は、小さいものは1 cm 角程度であったが、大きいものは14 cm × 12 cm ほどで、色は白・茶・濃藍など様々であった。

基原同定の結果、20,886 検体(14.54 kg)は哺乳類由来の化石片であると判明したが、53 検体(0.040 kg)については、断片化・摩耗により哺乳類であるか否かの鑑別点となる性状が喪失していた(Table 2)。哺乳類化石のうち246 検体(4.50 kg)は更に偶蹄目、奇蹄目、長鼻目、食肉目、齧歯目の5目に属する9科の動物由来であることを明らかにした。残る20,640 検体(10.03 kg)の哺乳動物化石については、科の同定は不可能であったが、一部は反芻類(18 検体)、有蹄類(51 検体)、食肉目(1 検体)であることが確認できた。

化石骨の種類として、頭蓋骨、角(Fig. 2d)、上下顎骨、脊椎骨、四肢骨(中手骨: Fig. 2a、手根骨: Fig. 2b、距骨: Fig. 2c、指骨: Fig. 2e)を発見した。化石歯は頬歯(大白歯: Fig. 2f, h, k, n, o、小白歯: Fig. 2i)が多くを占めたが、切歯(Fig. 2g, m)、犬歯(Fig. 2l)も存在した。

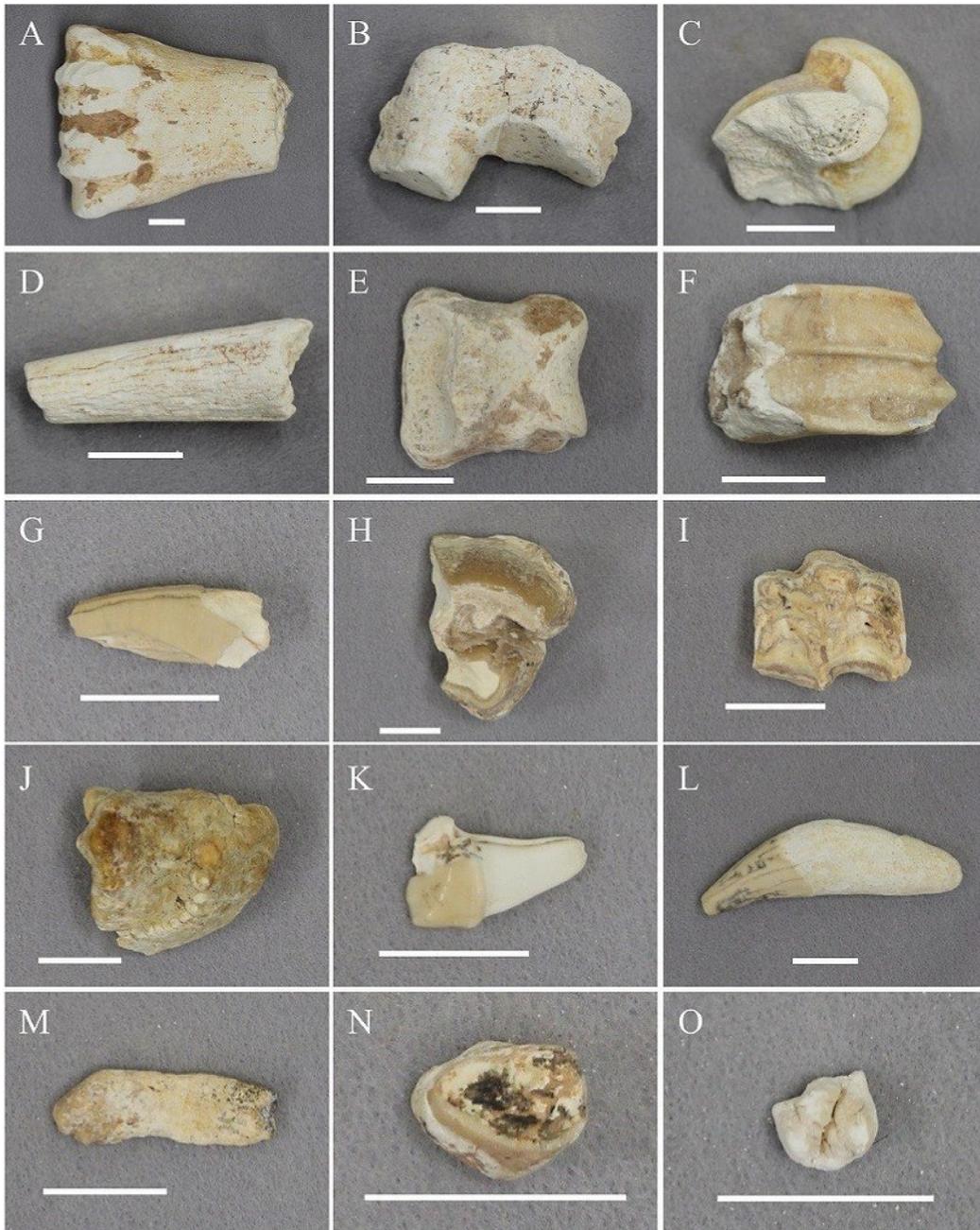


Fig. 2 Typical identified specimens: (a) metacarpal of bovid, (b) navicular-cuboid of bovid, (c) right astragalus of bovid, (d) antler of cervid, (e) phalange of equid, (f) left upper third molar of bovid, (g) left lower incisor of rhinocerotid, (h) left upper third molar of rhinocerotid, (i) left upper second or third premolar of equid, (j) tooth fragment of stegodon, (k) right lower first molar of hyaenid, (l) right upper canine of hyaenid, (m) left upper second incisor of ursid, (n) right upper third molar of histricid, (o) molar of suid. Scale bars represent 2 cm.

同定結果をまとめると、化石骨では、比較的原形をとどめた大型の化石片を主とする 54 検体(3.62 kg, 33.4 %)が目以下の下位分類可能で、偶蹄目(ウシ科、シカ科、反芻類, 計 20.1 %)、奇蹄目(ウマ科, 3.3 %)、食肉目(クマ科, 0.4 %)由来骨を発見した。化石歯では、262 検体(3.42 kg, 91.5 %)が下位分類可能で、偶蹄目(ウシ科、シカ科、イノシシ科、反芻類, 3.7 %)、奇蹄目(ウマ科、サイ科, 41.3 %)、長鼻目(ステゴドン科他, 45.8 %)、食肉目(ハイエナ科、クマ科他, 0.6 %)、齧歯目(ヤマアラシ科, 0.04 %)由来歯を発見した(Fig. 3)。

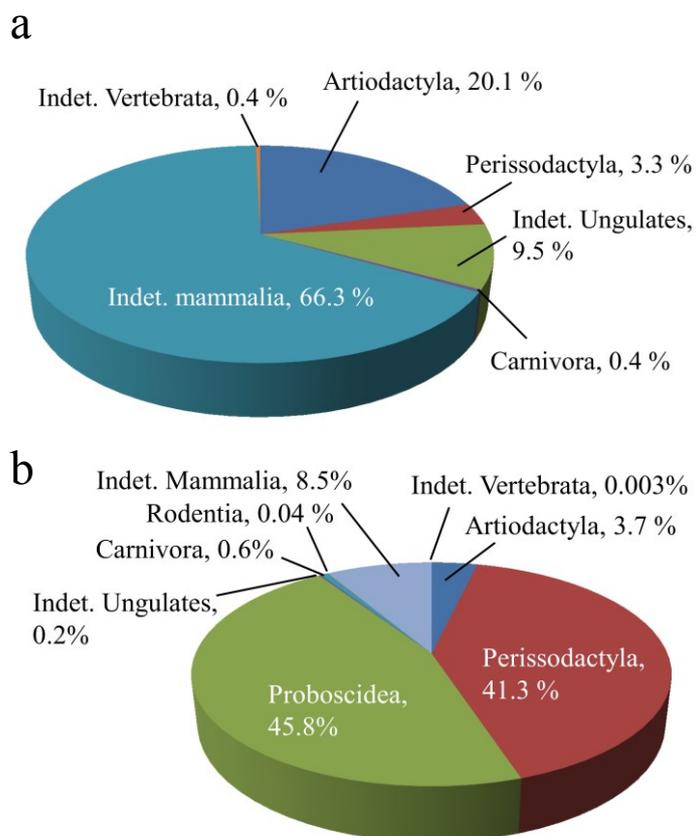


Fig. 3 The ratios of the total weight (g) of fossil fragments in each higher taxon: (a) fossil bones and (b) fossil teeth.

今回検討した標本に 96 検体と最も多くの化石片が含まれていたウマ科動物は、中国における新第三紀(約 2,303 万年前～約 258 万年前)、及び第四紀(約 258 万年前～現代)の代表的な哺乳類で、甘肅省や山西省、内モンゴルの後期中新世(約 1000 万年前～約 500 万年前)地層、甘肅省の前期更新世(約 258 万年前～約 78 万年前)地層が著名な産地である¹⁹⁻²²。本検討に供した標本のうち、甘肅省・山西省から入手したものは、これらの化石産地から採掘された可能性が高い。

我が国における竜骨・竜歯に関する唯一の基原検討事例である正倉院薬物(竜骨、白竜骨、竜角、五色竜歯)の検討では、「竜骨」「竜角」はシカ科の *Cervus punjabiensis* Brown の角、「白竜骨」は *Cervocerus novorossiae* Khomenko の歯・角・四肢骨断片、食肉目の *Ictitherium sinense* Zdansky の歯断片や鑑別不能断片の混合物、「五色竜歯」は長鼻目の *Palaeoloxodon namadicus* (Palc. et Caut.) 及び *Archidoskodon planifrons* (Palc. et Caut.) の歯であったことが報告されており¹⁴、約 1200 年以上前から中型・大型の哺乳動物化石を医薬品として用いていたことがわかる。

本検討では、現代の竜骨・竜歯がヤマアラシ科のような小型動物から長鼻目のような大型動物に至るまで、正倉院薬物に比べて多様な哺乳動物を基原とすることを明らかにした。一般に、「竜骨」として生薬市場に流通する化石骨は、採薬人と呼ばれる現地住民によって採掘される。彼らは自らの生活を守るため

に発掘地の情報を外部に秘匿し、採掘した化石を、学術的な調査・研究を経ることなく生薬市場において販売している。そのため、多様な動物の骨・歯が混在した状態で竜骨が流通していると考えられる。

第二節 日中医薬品市場流通品における基原動物の差異

【材料・方法】

前節で検討した各標本のうち、日本・中国市場流通品(標本 1-11 及び 12-24)について、基原動物を比較した。

【結果・考察】

日本市場流通品 8,387 検体(5.10 kg)では、下位分類可能な化石は 51 検体(1.81kg)で、ウシ科、シカ科、ウマ科化石などに由来した。一方、中国市場流通品 12,285 検体(6.75 kg)では、下位分類可能な化石歯 243 検体(4.35 kg)で、ウシ科、シカ科、ウマ科、サイ科、ステゴドン科、クマ科、ハイエナ科、ヤマアラシ科由来の化石などに由来した(Fig. 4)。これら市場品のうち、ラベル(竜骨・竜歯)に反して混在していた歯・骨はそれぞれ日本市場品で 63 検体(304.6 g)、中国市場品で 74 検体(87.1 g)であった。

比較的大型の哺乳類のみ同定された日本市場品に比べ、中国市場品の基原動物は多様で、小型哺乳類を含んでいた。これは日本の生薬流通業者が、現生生物骨をアルカリ処理した偽品等²³化石以外の物質の混入を防ぐため、比較的原形を保った、或は比較的大きな化石片を買い付け、日本国内で破碎後に流通させているためであると考察した。実際、1 cm 角程度に破碎された中国市場品標本の観察中に、樹脂片や植物片、貝殻などの混入を発見した。

日本市場品では中国市場品に比べ、ラベル(竜骨、リュウコツ)に反して混在した歯の量が多かった。これは主に標本 8(日本粉末薬品社製 日局リュウコ

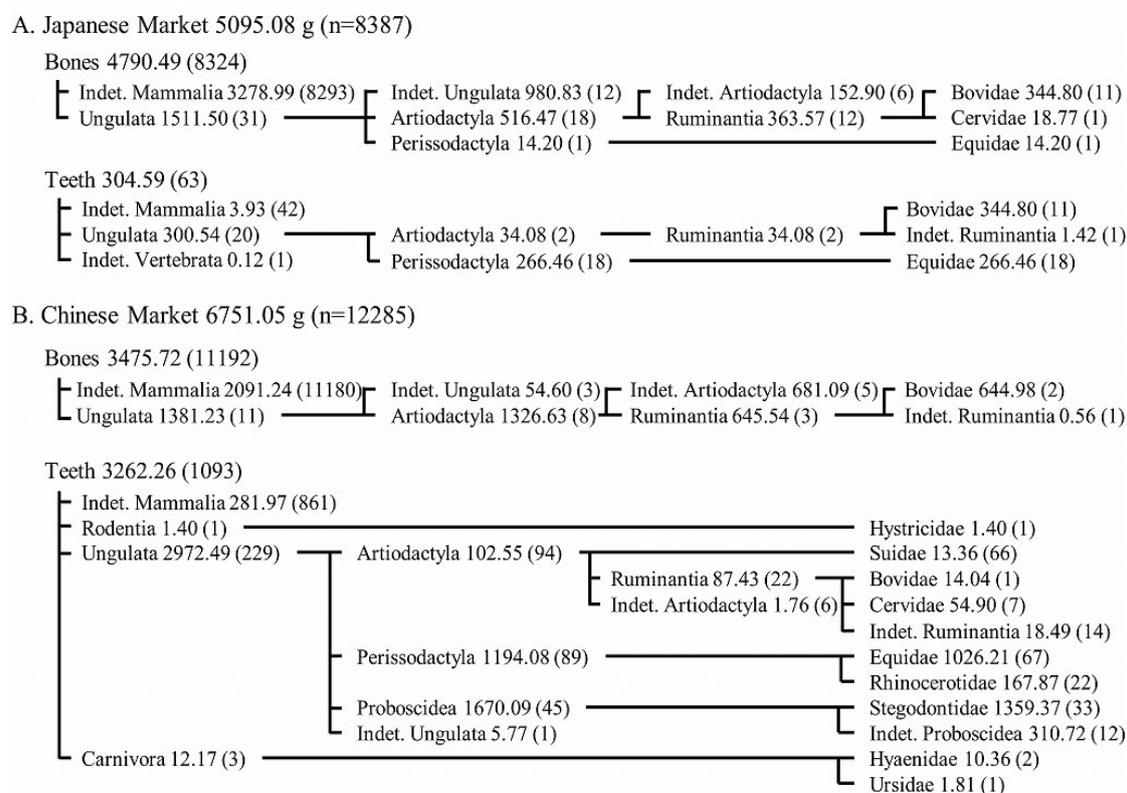


Fig. 4 Difference in taxa of original animals between specimens from Japanese and Chinese market.

ツ)299.1g、19 検体が全て化石歯であったことによる。これを除くと、日本市場品に混在した化石歯は 5.47 g、44 検体となり、混在量・数は中国市場品を下回る。

日中共に、化石骨、特に 2007 年以降に蒐集した標本 9-11, 14, 19 のように剤型が「砕」の市場品竜骨の基原同定が困難であった。他の標本の検討結果から、多様な動物化石の混合物であることが予想できる。通常、医療用「リュウコツ」は「砕」剤型で煎剤原料として用いられるが、これまで臨床上効果が見られない、あるいは有害作用が発生した、などの学術報告や学会での注意喚起などは行われていない。多様な動物に由来する骨・歯が混在していても臨床上問題は無いと考えられる。

小括

本章では、大阪大学総合学術博物館が所蔵する過去 56 年間に日中の生薬市場で流通していた竜骨・竜歯関連標本 20,939 検体を観察し、基原動物同定を試みた。その結果、5 目 9 科の動物を同定し、現代の医療用の竜骨・竜歯の基原について基原動物を初めて明らかにした。また医薬品市場品の竜骨が化石骨・歯が混在した状態で流通していることも明らかにした。これまで、偽品の混入や、重金属・ヒ素・放射性同位体含有量以外に竜骨に関して临床上の問題は報告されておらず、古来、本草綱目²⁴等の本草書において「舐めた時に舌に吸い着く」化石が良質な竜骨であるとされてきたことから、基原種や部位に関わらず、「化石化していること」が実地医療で重要な要因となることが示唆される。

竜骨の資源保護対策として、代替品の開発：現生生物骨を原料とした人工竜骨の創成が 1 つの手段となる。そのために必要な化石化の再現研究を行うに当たり、原料の均一性等の観点から、使用する現生生物を限定しておくことが望ましいと考えられる。基本的に、代替品開発において化石化メカニズム解明が最大の課題であり、化石化再現が容易な動物種の骨が最良な候補となる。しかし、今回同定された科のうち、食肉用に飼育されているウマ・ウシ科が安定供給の点で現実的である。

一方で、代替品開発には竜骨の薬能・配合意義を解明することが大前提である。そこで、次に日本薬局方適合竜骨を用いて漢方薬中での意義について検討を行った。

第二章 漢方薬 桂枝加竜骨牡蠣湯における竜骨の存在意義

竜骨が配合される処方には、「柴胡加竜骨牡蠣湯」、「桂枝甘草竜骨牡蠣湯」、「桂枝去芍薬加蜀漆竜骨牡蠣湯」、「桂枝加竜骨牡蠣湯」「竜骨湯」などがあるが、日本では「一般用漢方製剤承認基準」(全 294 処方)²⁵に収載された「柴胡加竜骨牡蠣湯」及び「桂枝加竜骨牡蠣湯」のみ医療用エキス製剤が製造販売され、前者は 10 社、後者は 5 社から販売されている。出荷金額はそれぞれ 2008 年に 12 億 5500 万円、1 億 7500 万円であったが、2014 年では 14 億 2600 万円、1 億 9300 万円と増加傾向²⁶にある。

これまで、竜骨単独の薬理作用として、竜骨粉末を経口投与することで健康マウスでの体温上昇作用・けいれんモデルマウスでの抗けいれん作用・ラットでの自発運動抑制作用などの中枢抑制作用²⁷が、竜骨の 80%メタノール抽出エキスをマウスへ経口投与することでジアゼパム様の抗不安作用が報告されている²⁸。しかし、竜骨は通常、漢方薬・中成薬の煎剤(熱水抽出製剤)・エキス製剤原料として使用される。熱水抽出後の残渣は破棄され、竜骨を直接内服することは無い。竜骨配合漢方薬の検討では、柴胡加竜骨牡蠣湯エキスの経口投与で、ウサギ・マウスにおけるアテローム性動脈硬化予防作用^{29,30}、ラットに対する慢性ストレスで誘導されるうつ症状の改善作用^{31,32}、ヒトの脂質異常症患者における血管障害予防効果³³などが確認されている。これら漢方薬エキスでの検

討は柴胡加竜骨牡蠣湯全体の薬理作用を評価・検証することに主眼が置かれたもので、漢方薬中での竜骨の役割・配合意義に焦点をあてたものではない。

そこで、漢方薬煎液の網羅的成分プロファイル分析を行い、竜骨の有無による煎液成分変化を解析することで竜骨の配合意義を検証した。検討対象として、竜骨を含む7種の生薬で構成される桂枝加竜骨牡蠣湯(KRB)を選択した。これは、構成生薬が11種(あるいは10種)である柴胡加竜骨牡蠣湯に比べ、竜骨の影響をより単純な系で検討できると考えたためである。

第一節 放射線を用いた竜骨の特性解析

竜骨は文化財的価値を有し、非破壊・微量分析が原則である。そこで、竜骨自体の組成について検討するため、粉末 X 線回折(XRD)による結晶構造解析、並びに熱中性子放射化分析(NAA)³⁴ による含有元素組成の網羅的検討を行った。両測定法は試料を消費しない分析法である。特に、竜骨にはケイ素化合物など酸不溶性成分が含有されていることが報告されている^{35, 36} ことから、化学的前処理が不要かつ高分解能、高感度、多元素同時分析が可能な微量分析手法である NAA を選択した。

【材料・方法】

生薬材料

日本薬局方適合品の医療用生薬を株式会社栃本天海堂(大阪)より購入した。購入品目は以下の通り：桂皮(*Cinnamomum cassia* Blume の樹皮又は周皮の一部)、芍薬(シヤクヤク *Paeonia lactiflora* Pallas の根)、生姜(ショウガ *Zingiber officinale* Roscoe の根茎)、大棗(ナツメ *Zizyphus jujube* Miller var. *inermis* Rehder の果実)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer 又は *G. glabra* Linne の根及びストロン)、牡蛎(カキ *Ostrea gigas* Thunberg の貝がら)、竜骨。但し、竜骨は3ロット(R1-3)用意した (Table 3)

煎液調製

各生薬を次に示す配合量で混合し、KRB、竜骨単独煎(R)の2種類の煎液を調製した。生薬の配合は、KRB煎では桂皮4g、芍薬4g、生姜1g、大棗4g、甘草2g、竜骨3g、牡蛎4gで、R煎では竜骨3gである(Table 3)。混合した生薬に400 mLの超純水を加え、漢方薬煎じ器(EK-SA10, 栃本天海堂社製)を用いて60分間加熱することにより煎液を調製した。抽出後の生薬残渣は煎液から分離した。KRB及びR煎残渣から竜骨を回収後、60℃で12hr乾燥した。

Table 3 Crude drug components of decoctions examined in present study:
Keishikaryukotsuboreito (KRB) and longgu alone (R)

生薬名	Medicine name	Original plants or animals	Medicinal part	Lot no.	Amount (g)	
					KRB	R
桂皮	Cinnamon bark	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	Bark	002810010	4	0
芍薬	Peony root	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	Root	005310009	4	0
生姜	Ginger	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Rhizome	005810001	1	0
大棗	Jujube	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>inermis</i> Rehder	Fruit	007110012	4	0
甘草	Glycyrrhiza	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisher or <i>G. glabra</i> Linne	Root and stolon	002010008	2	0
牡蛎	Oyster shell	<i>Ostrea gigas</i> Thunberg	Shell	010210010	3	0
竜骨	Longgu	Large mammals	Ossified Bone	010805006 (R1)	3	3
				010810002 (R2)		
				010810001 (R3)		

Medicine names are based on the Japanese Pharmacopoeia. All drugs conform to JP 16 criteria and were purchased from Tochimoto Tenkaido Co., Ltd. (Osaka, Japan)

粉末 X 線回折

煎じ操作を行っていない(煎前)竜骨(: R-bef)を粉末化し、粉末 X 線回折装置 Rigaku Rad-C(リガク社)を用いて測定した。使用 X 線は Cu-K α 線で、 $2\theta = 0^\circ \sim 80^\circ$ の範囲を 0.5 $^\circ/\text{min}$ (step scan) の速度で測定した。得られた回折パターンは、ICDD (International Centre for Diffraction Data) の標準データに基づくシミュレーションデータと比較検討した。

熱中性子放射化分析

R-bef、KRB 煎残渣(R-krb)、R 煎残渣(R-aft)の各竜骨試料について、粉末化した後、短寿命核種測定用試料として 20 mg 及び長寿命核種測定用試料として 40 mg を 1 cm \times 1 cm のポリエチレン製袋に封入した。試料は京都大学原子炉実験所

において、実験用原子炉で生成した熱中性子を、Pn-1 システム(試料を炉心近傍の照射位置へ移送するシステムの一つ)を用いて 1 min 照射し、試料を放射化した。放射化試料から放出される γ 線について、ゲルマニウム検出器を用いて 200 s 測定し、スペクトルを得た。

【結果・考察】

粉末 X 線回折

XRD の結果、 $2\theta = 32^\circ, 40^\circ$ にブロードなピークを持つ回折パターンが得られた(Fig. 5a)。ICDD の標準データを用いたシミュレーションによって解析したところ、 $2\theta = 32^\circ$ のピークは apatite, hydroxyapatite, aragonite のピークから成っており、 $2\theta = 40^\circ$ のピークは hydroxyapatite に由来することが示唆された(Fig. 5b)。ピークの分離度が低くブロードであるため、竜骨の結晶性が低いことが明らかとなった。これまで、竜骨の主成分として hydroxyapatite と炭酸カルシウムの存在が報告されている^{36, 37}が、炭酸カルシウムについて、calcite と aragonite の 2 種存在する結晶系のどちらであるかの検討は行われていなかった。今回初めて竜骨中の炭酸カルシウムの結晶系として aragonite が存在することを明らかにした。

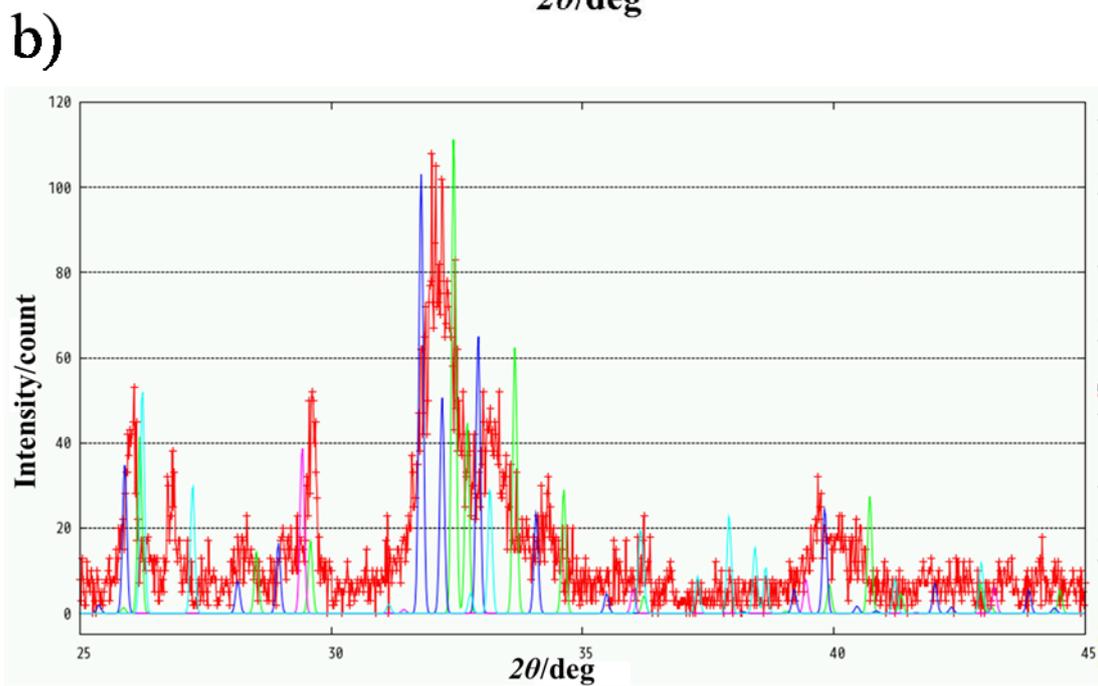
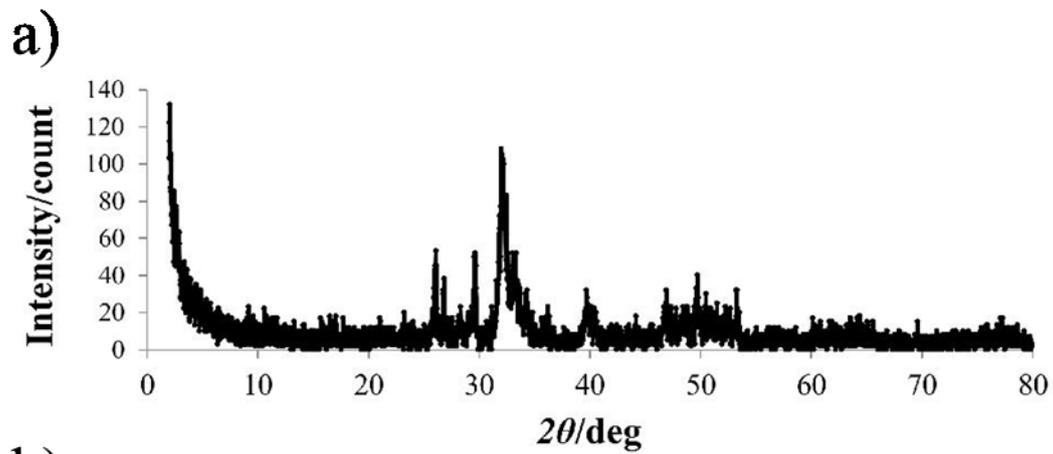


Fig. 5 The result of XRD: a) Typical diffraction pattern of non-processed longgu, b) simulated pattern with standard diffraction data of calcite (pink), aragonite (sky blue), hydroxyapatite (blue), and apatite (green).

熱中性子放射化分析

原子炉で生成した熱中性子を照射すると、試料中の一部の原子核が照射中性子を捕獲し、新たな核種が生成する。その核種が放射性であれば、壊変により放出される放射線から元素を同定することができる。本分析手法は、各放射線核種が放出する γ 線のエネルギーが一定であるので、各元素の存在を非常に高感度で検出可能で、非破壊的文化財研究に応用される。今回、16 元素(Na, Al, Si, K, Ca, V, Mn, Ni, Zn, Ge, Zr, Mo, I, Ba, Ir, Bi)に由来する γ 線を検出し、竜骨中にこれら元素が含有されていることを示唆した(Fig. 6)。しかし、NAA の測定中に生じる中性子捕獲・生成する核種(放射性 or 非放射性、放出する放射線の種類)・原子核の壊変・放射線検出は全て確率論的事象で定量性が低い。一方、各元素の検出生値は 0.005-12.6 cps (counts per second)と γ 線計数のオーダーは 1000 倍以上の幅があった(Table 4)。これは、壊変係数(微小時間に原子核が壊変：放射線を放出する確率)及び放出 γ 線の検出効率が元素ごとに異なるためである。測定原理上、相対値による量的比較を避けた。

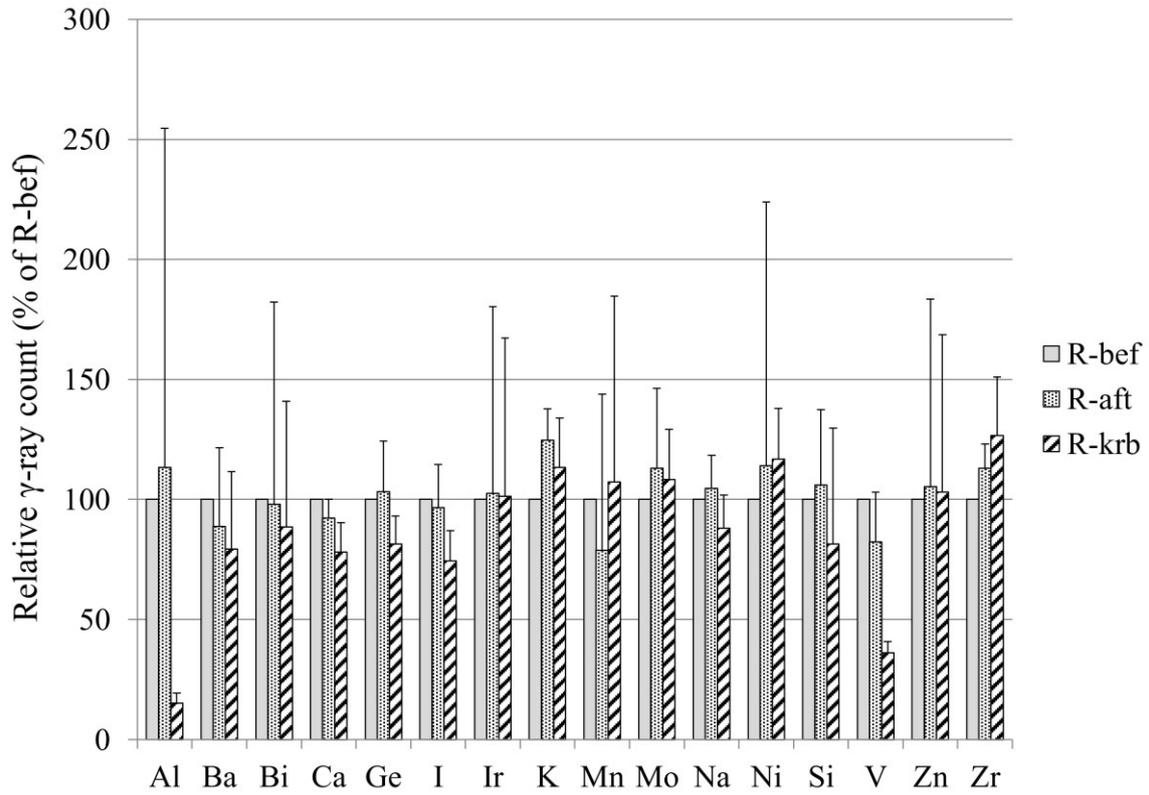


Fig. 6 Relative gamma-ray count detected by neutron activation analysis in longgu specimens: non-processed longgu (R-bef), longgu decocted in KRB (R-krb) and R (R-aft). The data are shown as mean + S.D.(n = 3) by setting the results for R-bef to 100.

Table 4 Gamma ray counts per second at measurement time.

	Al	Ba	Bi	Ca	Ge	I
R-bef	12.6±3.80	0.159±0.0361	0.122±0.0529	10.3±1.49	3.80±0.921	1.96±0.293
R-aft	11.4±12.4	0.178±0.0944	0.154±0.0472	9.60±2.03	3.91±1.03	1.89±0.402
R-krb	2.02±1.09	0.157±0.0844	0.129±0.0404	7.98±0.416	3.10±0.912	1.44±0.150
	Ir	K	Mn	Mo	Na	Ni
R-bef	7.35±3.62	0.649±0.163	4.20±4.44	0.392±0.106	0.860±0.0600	0.236±0.113
R-aft	5.78±1.93	0.796±0.128	1.46±0.901	0.435±0.142	0.905±0.168	0.186±0.161
R-krb	5.92±2.99	0.714±0.0715	2.31±0.668	0.417±0.0972	0.753±0.0636	0.262±0.0946
	Si	V	Zn	Zr		
R-bef	0.00501±0.00223	2.92±0.307	6.47±3.03	0.154±0.00853		
R-aft	0.00508±0.00193	2.44±0.811	5.37±1.86	0.175±0.0198		
R-krb	0.00471±0.00472	1.05±0.0655	5.37±2.49	0.197±0.0491		

The data are shown as mean ± S.D. (n = 3).

第二節 無機成分プロファイルに対する竜骨の影響

前節において竜骨の組成を検討し、16 元素の存在が示唆された。竜骨からこれらの元素が煎液中へ溶出するのか、竜骨の有無が KRB 煎液の無機元素プロファイルにどのように影響するか検討を行った。

過去、蛍光 X 線分析を用いて、竜骨単独煎エキスにごく微量の K, Ca, Fe, Cu, Br, Sr、柴胡加竜骨牡蠣湯水製エキスに K, Ca と微量の Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr が溶出していることが報告されている³⁵。当該検討では $\mu\text{g/L}$ 以下の微量元素の検討は行われていないことから、ppt レベルの高感度、かつ多元素同時分析が可能な誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)を用いた、煎液中の元素プロファイルの網羅的分析を行った。

【材料・方法】

生薬材料

前節と同一材料を用いた。

煎液調製

前節と同様の KRB 煎液、R 煎液に加え、竜骨非配合の KRB(KB)煎液を調製日を変えて 3 回調製した。KB 煎液の生薬配合量は、KRB 煎液より竜骨のみを除

いた構成(桂皮 4 g、芍薬 4 g、生姜 1 g、大棗 4 g、甘草 2 g、牡蛎 4 g)である。調製方法は前節と同様である。各煎液は、生薬残渣除去後、超純水を用いて 400 mL にメスアップした。作成した煎液は、実験に供するまで-20 °C で保存した。

ICP-MS 分析

各煎液 800 μ L に濃硝酸(特級、Nacalai Tesque)400 μ L を加えてボルテックスにより混合した。そのうち 300 μ L を取って超純水 9.7mL へ加え 50 倍希釈溶液とし、ボルテックス後に孔径 0.45 μ m の PTFE シリンジフィルター(Millipore, Billerica, MA, USA)により濾過し、測定試料とした。煎液調製 3 回分の試料を測定に供した(KRB, R: n=9, KB: n=3)。

ICP-MS システムは Agilent 7500series (Agilent Technologies Japan, Ltd. Tokyo, Japan)を用いた。なお、1 つの測定値は 3 回の測定の平均値を表す。本検討では、網羅的な無機元素パターンを検討するために、68 元素について半定量的に分析した。

得られた網羅的元素プロファイルは、Pirouette ソフトウェア(Infometrix, Bothell, WA, USA)を用いた主成分分析によって解析した。

【結果・考察】

ICP-MS 分析により、検討した 68 元素中 25 元素を検出した(Fig. 7)。KRB 煎液及び KB 煎液における主要な溶出元素は Na, Mg, K, Ca であったが、R 煎液においては Na, Mg, Ca はそれぞれ KRB、KB 煎液の約 18 %、0.6 %、13 %で、K は溶出しなかった。KRB 煎液と KB 煎液の総溶出元素量は同程度であったが、R 煎液における総元素溶出量は KRB/KB 煎液の約 2.5 %であった。KRB 煎液の主要溶出元素である Mg, K, Ca は、植物内において C, H, O, N といった有機元素に次いで含有量の多い元素である³⁸ こと、主要溶出元素のプロファイル(Fig. 8a)は KRB/KB 煎液で類似していることから、KRB 煎液で溶出が確認された元素の大部分は竜骨以外の生薬、特に植物生薬由来であったと考えられる。

KRB/KB 煎液の間で、I など微量元素のプロファイル(Fig. 8b)が異なっていることから、竜骨の有無による無機元素プロファイルの変化を検討するため、主成分分析(PCA)を実行した。PCA スコアプロットにおいて、第一主成分に沿って KRB/KB 煎液のクラスタが分離し、両者の無機元素プロファイルが異なっていた(Fig. 9a)。ローディングプロット(Fig. 9b)の検討から、第一主成分と I, U, Ba, V, Mg, Mn の関連が強く、これら元素が竜骨の影響を大きく受けていることを示唆した。過去に、三野らは柴胡加竜骨牡蠣湯エキスを対象に蛍光 X 線分析を行い 9 元素を検出した。竜骨配合の有無による元素溶出量変化を検討し、竜骨の配合

によって Mn の溶出量が低下することから、竜骨による吸着を考察していた³⁵。今回の検討でも同様に竜骨による Mn の吸着が生じていた可能性はある。また、前節において、竜骨中に hydroxyapatite, aragonite が存在することを明らかにした。hydroxyapatite, aragonite はそれぞれ水溶液中の Mg^{2+} 、 Mn^{2+} をはじめとする無機イオンを Ca^{2+} とのイオン交換により結晶構造中に可逆的に取り込むことが報告されており^{39,40}、この現象が竜骨配合による無機元素プロファイル変化に関与している可能性がある。

以上、竜骨配合により、煎液中の無機元素プロファイルが変化することを明らかにした。竜骨の成分として、アミノ酸や低級脂肪酸などが検出⁴¹ されていることから、竜骨の有機成分に対する影響も考慮しなければならないと考え、検討を行った。

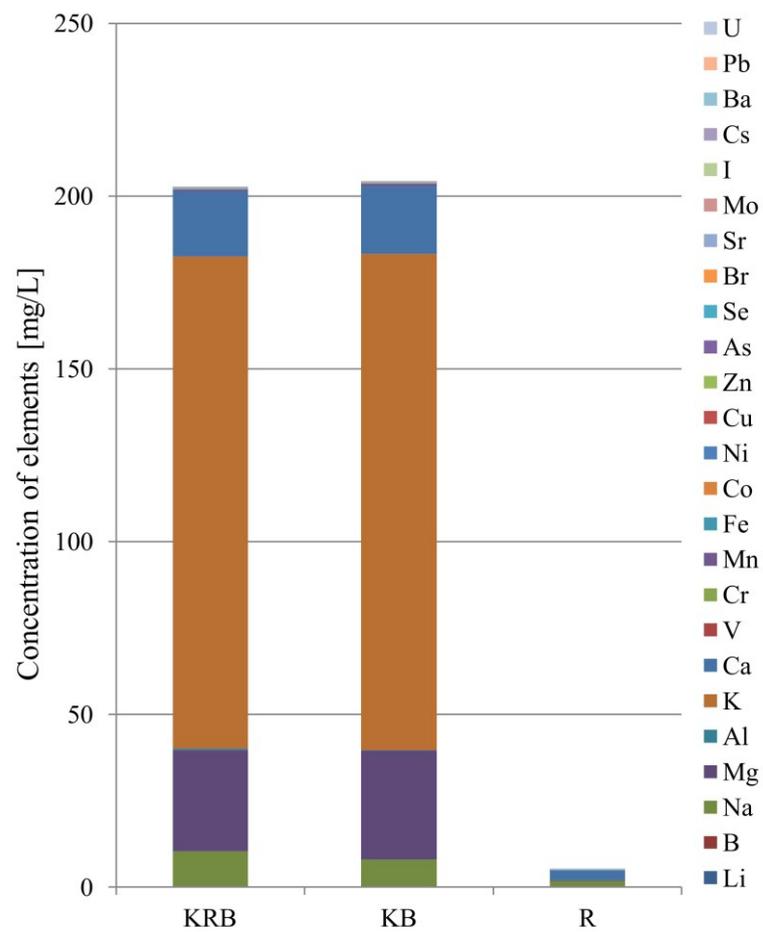


Fig. 7 Results of ICP-MS: concentration of eluted elements in each specimen. The data are shown as mean (n=3-9).

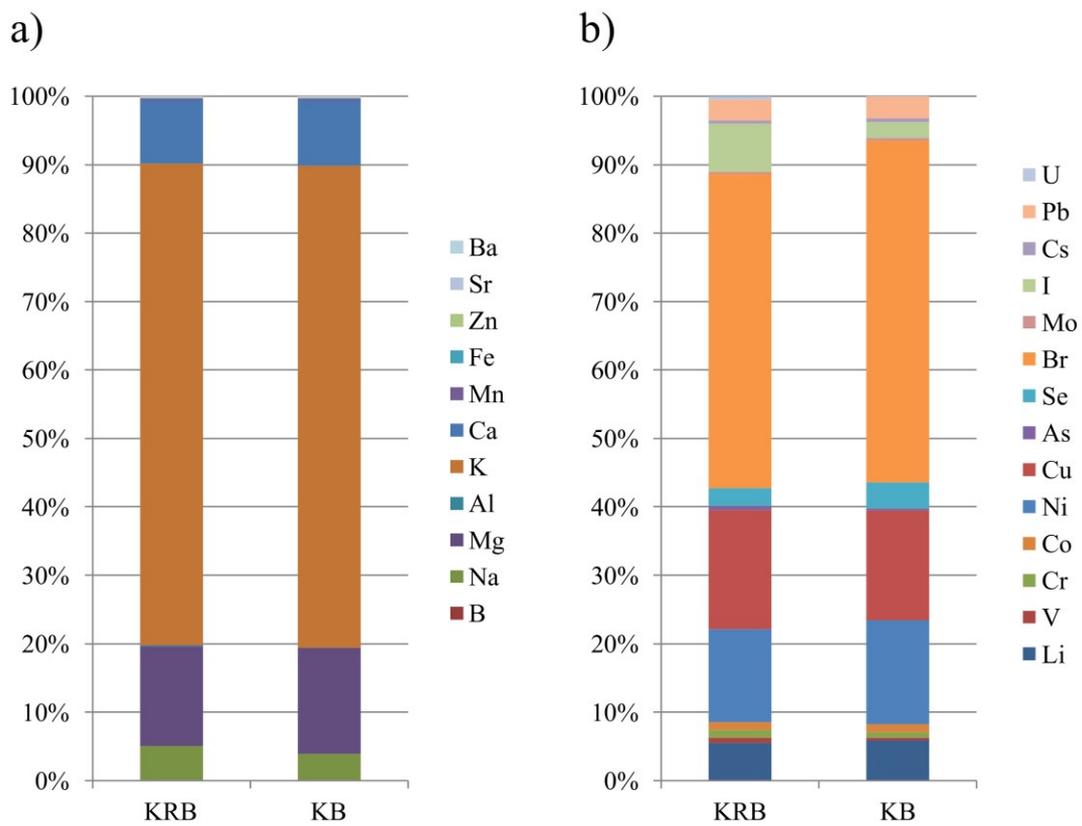


Fig. 8 Results of ICP-MS: ratio of eluted elements in KRB and KB decoction: more (a) or less (b) than 0.1 mg/L. The data are shown as mean (n=3-9).

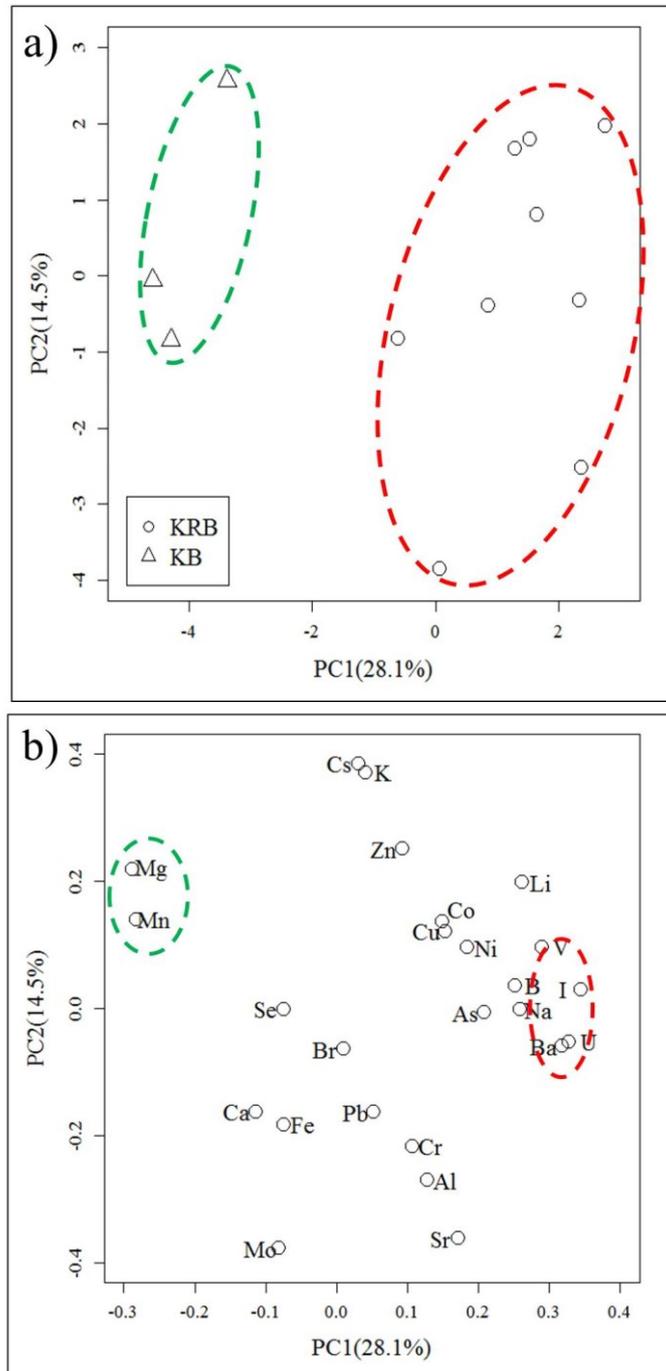


Fig. 9 Results of PCA: score plot (a) and loading plot (b) of first and second principal components

第三節 GC フィンガープリントに対する竜骨の影響

前節において、竜骨の存在により無機元素プロファイルが変化することを明らかにした。次に、有機成分についても、竜骨からの溶出、煎液中の成分に対する竜骨配合の影響を検討した。今回、竜骨の影響について検討するため、低分子有機化合物のフィンガープリントを得る強力な手段の一つである、ガスクロマトグラフィー/水素炎イオン化検出法(GC/FID)を用いて検討を行った。

【方法】

生薬材料

前節と同様の材料を用いた。

煎液調製

前節と同様の方法により KRB、KB、R 煎液を調製日を変えて 6 回調製した。

試薬

Ribitol (特級)、ピリジン(infinity pure)を和光純薬株式会社(大阪)より、methoxyamine hydrochloride (MAHC, 98 %)を Sigma-Aldrich Inc.(MO, USA)より、N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA)を GL Sciences(東京)よりそ

れぞれ購入した。

GC/FID 分析のための誘導体化

各煎液及び Blank 試料用の超純水 1mL を取り、内部標準として 80 μ L の 0.4mg/mL Ribitol 水溶液を添加した。添加後 16,000 \times g、20 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離 (Centrifuge 5418R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) を行い、上清を回収した。回収した上清 240 μ L を凍結乾燥した後、MAHC のピリジン溶液(20 μ g/mL) 40 μ L を加えて再度溶解した。Eppendorf 社のサーモミキサーを用いて 30 $^{\circ}$ C で 90 分間振動させ、カルボニルの誘導体化を行った。続いて、MSTFA を 40 μ L 添加し、サーモミキサーを用いて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間振動させることによりシリル化を行った。シリル化後、GC 用ガラスバイアルに反応液を 45 μ L 取り、測定に供した。調製 6 回分の煎液から各 6 つの測定試料を作成した(各煎液につき n=36)。

GC/FID 分析

GC システムは GC-4000(GL Sciences)、オートサンプラーシステムは ASI 240(GL Sciences)を用いた。分析条件は以下のとおりである。

Column : InertCap5 (i.d.: 0.25 mm, length: 30 m, film thickness: 0.25 μ m, GL Sciences, Inc.)

Oven temperature program : 80 °C (held for 2 min), raised to 325 °C at 10 °C/min (held for 12 min)

Injection volume : 1 μ L (スプリット比 1:20)

Injection temperature : 230 °C

Detector temperature : 320 °C

Carrier gas (helium) flow: 1 mL/min

統計解析

GC/FID 分析によって得られたクロマトグラムデータは、LineUp プログラム (Infometrix, Bothell, WA, USA)を用いて保持時間の補正を行った。更に、PiroTrans プログラム(GL Science)を用いてデータの変換を以下のように行った : Transform メニューの "Delete Variable"により、溶媒に由来するピークを削除し、更に "Divided by Variable"を用い、内部標準物質のピーク強度によって標準化を行った。以上のように前処理を行ったデータを用い、Pirouette プログラム (Infometrix)を用いて部分最小二乗法判別分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis: PLS-DA)による解析を行った。なお、飽和したピークは除外して解析を行った。

【結果・考察】

各試料の典型的なクロマトグラムを Fig. 10 に示す。R 煎液は空白サンプルと同等で、有機物の溶出は認められなかった。一方、KRB/KB 煎液では、ピークが多数認められ、KRB 煎液に存在する有機成分は植物生薬に由来すると考えられる。KRB/KB 煎液のクロマトグラムでは、保持時間 17~20 分、及び 26 分におけるピークに飽和が見られた。

竜骨の有無が GC フィンガープリントに影響を及ぼすのか検討するため、KRB/KB 煎液の測定結果に対し PLS-DA を行った結果、クラス予測プロットでは KRB 煎液試料が 1 付近に、KB 煎液試料が 0 付近に収束し、両者が判別された(Fig. 11a)。また、各ピークの判別への寄与度を表す回帰ベクトルを Fig. 11b に

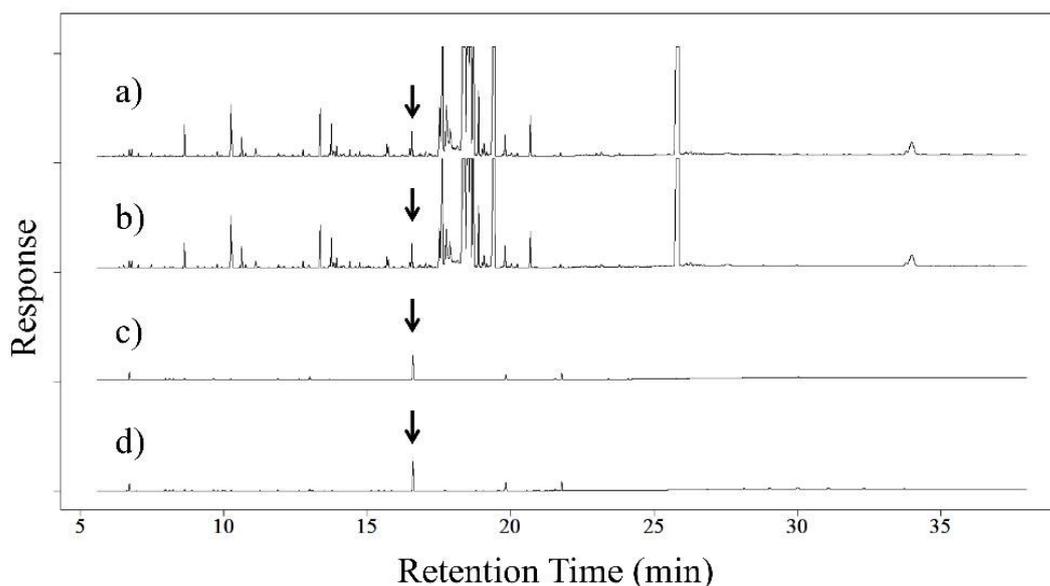


Fig. 10 Typical chromatograms of GC/FID: a) KRB, b) KB, c) R, and d) blank solution. The arrows indicate the peak of ribitol (internal standard).

示した。回帰係数が正の値であれば KRB 煎液としての判別に、負の値であれば KB 煎液としての判別に寄与しており、絶対値が大きいほど判別への寄与が大きいことを表している。回帰ベクトルから、保持時間が 6.5, 9.5, 10.5, 13, 14, 16 min 付近のピークが判別に大きく寄与していること、保持時間 20 min 以上のピークは比較的判別への寄与が低いことが読み取れる。竜骨の存在は有機成分プロファイル全体に影響を及ぼすが、特に比較的早期にカラムから流出する成分に対する影響が大きいことがわかる。本検討で用いたカラムは低極性カラムであるので、極性のある成分が竜骨に影響を受けたと考えられる。本検討では、竜骨の存在が成分プロファイルに影響を与えるかどうかの主眼を置いたため、検出された個々の有機成分のピーク同定は行っていないが、橋本らによる HPLC を用いた KRB 構成生薬の指標成分を分析した結果が報告されている⁴²。KRB 煎液中には albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, 6-shogaol などが含まれていた。これらのうち、比較的極性の高い paeoniflorin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid などが竜骨の影響を受けやすいと考えられる。

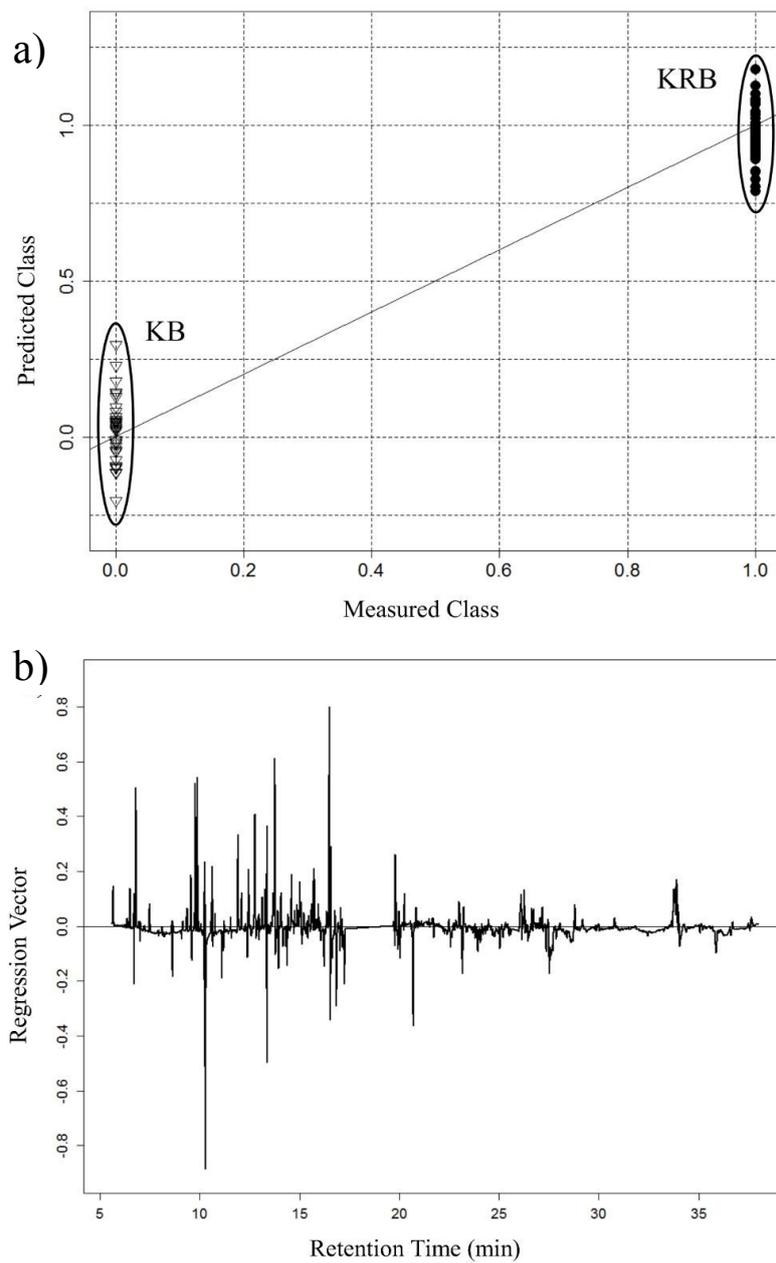


Fig. 11 The Results of PLS-DA: class prediction plot (a) and regression vector (b). Class values were added for each sample type (0 for KB, and 1 for KRB).

小括

本章では、日本薬局方適合生薬を用い、漢方薬：桂枝加竜骨牡蠣湯煎液中の成分プロファイルに対する竜骨の影響から竜骨の配合意義について検討を行った。まず、竜骨自体の組成を検討するため、粉末 X 線回折、熱中性子放射化分析を適用し、竜骨中に動物骨由来と考えられる hydroxyapatite, apatite, aragonite、並びに 16 元素の含有を確認した。次に、竜骨からの無機成分溶出、竜骨配合による漢方薬煎液の無機成分プロファイル変化を検証するため、ICP-MS による網羅的元素分析を行い、竜骨からの元素溶出は限定的であるが、成分プロファイルを変化させていることを明らかにした。また、有機成分プロファイルについても GC/FID 分析を用いた GC フィンガープリントを多変量解析により検討し、竜骨からの有機成分溶出が無いにもかかわらず、竜骨の配合により煎液全体の有機成分プロファイルが変化していたことを明確にした。

過去の検討で竜骨による成分吸着が示唆されていたことから、竜骨の物性・構造が煎液成分プロファイル調節作用に関与しているか検討を行った。

第三章 竜骨の煎液成分調節作用メカニズムの解明

前章において明らかにした、竜骨の漢方薬煎液成分調節作用の機序を解明するためには、煎じ加工前後で竜骨の物性に变化が生じているか検討することが必要と考えた。そこで、煎前後の竜骨試料 R-bef、R-aft、R-krb 群を対象として、煎じ加工前後の竜骨の変化を複数の分析手法を用いて多角的に検討した。

第一節 煎後残渣竜骨の表面分析

煎液成分調節作用に関与していると考えられる竜骨表面の構造を観察すると共に、KRB 煎後の竜骨表面の状態を検討するため、走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型 X 線分析(SEM/EDX)を施行した。SEM/EDX は、SEM 光源(電子銃)からの電子線を照射することで励起される、試料表面の元素から放出される特性 X 線を検出し、そのエネルギーから元素を特定する測定手法であり、非破壊的多元素分析が可能である利点を有する。

【方法】

生薬材料

前章と同様の生薬材料を用いた。

煎液調製・残渣竜骨回収

前章第一節と同様の方法で KRB 煎液を調製し、残渣竜骨を回収、乾燥した。煎液調製 1 回分の竜骨を分析に供した。

走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型 X 線分析(SEM/EDX)

R-bef 群、R-krb 群について、走査型電子顕微鏡 S3400N (株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京)に Apollo XP (アメテック株式会社、東京)検出器を装着し、SEM 観察・EDX 測定を行った。SEM 観察時の加速電圧は 6.5 keV である。

【結果・考察】

骨は通常、外側部に 2-10mm 程度の質の緻密な層が存在しており(緻密質)、内部の 1~数 mm の孔が多数存在する多孔質部(海綿質)を包囲している。R-bef の SEM による二次電子(SE)像を観察した結果(Fig. 12)、緻密質、海綿質と部位が異なっても、竜骨表面には凹凸や短径 20 μ m 程度の細孔が多数存在していることが明らかとなった。

細孔は、その径の大きさによりマクロ孔(50 nm 以上)、メソ孔(2-50 nm)、ミクロ孔(2 nm 以下)に分類される⁴³。本観察結果より、竜骨表面にマクロ孔が存在していることが確認された。

KRB 煎後の竜骨残渣 R-krb について、EDX を用いて細孔の周囲における元素分布を測定した(Fig. 13)。SE 像(Fig. 13a)の同一視野内において、炭素(青)、酸素(緑)、リン(黄)、カルシウム(赤)の分布を Fig. 13b-e に示した。酸素、リン、カルシウムは左中部の細孔付近、及び中央やや下部を除く全域に分布しており、それぞれの分布域は重複していた(Fig. 13d-f)。この領域には炭素も分布している(Fig. 13b)ことから、これら元素が重複している領域には竜骨の主成分である hydroxyapatite 及び炭酸カルシウムが存在していることを示唆した。一方で、酸素、カルシウム、リンが分布していない SE 像左中部に存在する細孔の内部に炭素原子が特異的に分布していた(Fig. 13c)。このことから、有機成分が細孔内に存在している、すなわち竜骨が煎じ操作中に KRB 煎液中の有機成分を細孔に捕獲していると考察した。

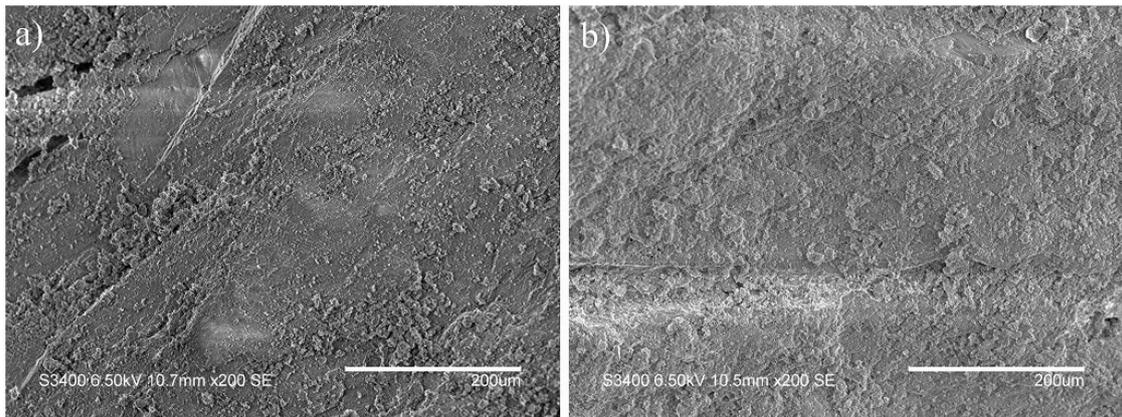


Fig. 12 Typical secondary electron image of longgu with scanning electron microscopy (SEM): compact bone (a) and spongy bone (b). The acceleration voltage for SEM was 6.5 keV. Scale bars represent 200 μm .

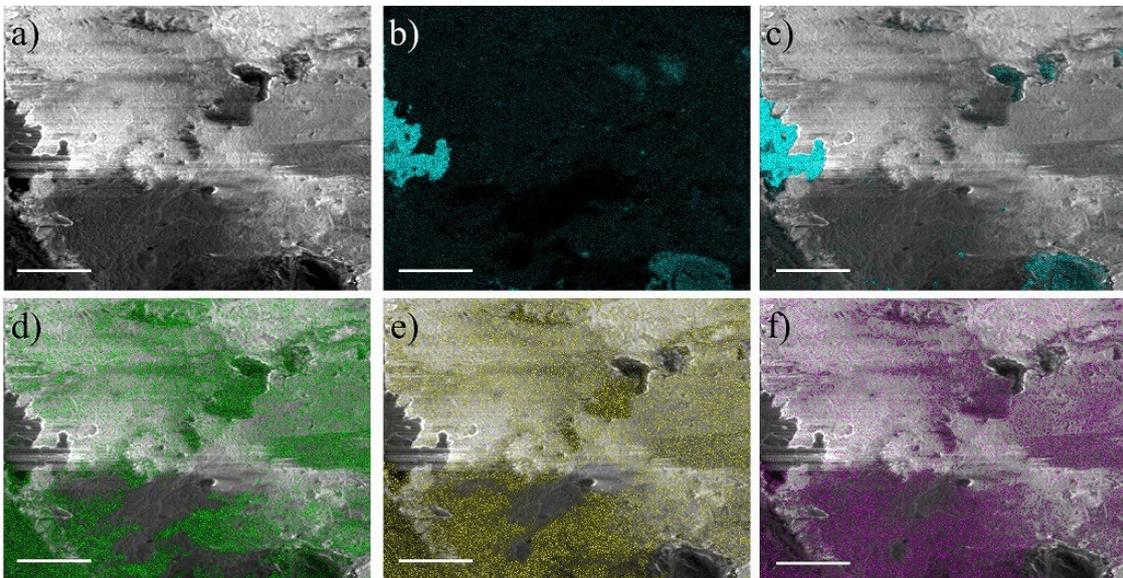


Fig. 13 Results of SEM/EDX for the longgu decocted in KRB. The data are shown as secondary electron (SE) image (a), and maps of carbon (b). The maps with SE image are shown: carbon (c), oxygen (d), phosphate (e), and calcium (f). Colored dots indicate the presence of each element. Scale bars represent 50 μm .

第二節 有機成分吸着作用の立証

前節の結果から、竜骨が発揮する煎液成分調節作用の機序として、煎液調製の際、竜骨表面に存在する凹凸や細孔に有機成分を吸着しているという仮説を立て、吸着モデルを考案した(Fig. 14)。すなわち、R-befやR煎加工後残渣(R-aft)の竜骨表面の細孔には、空気中の水分や煎じ加工による水が吸着する一方、KRB煎後(R-krb)の場合は、配合生薬から溶出した有機成分が細孔に入り、水の吸着が阻害されると考えた。このモデルを基に、遷移放射テラヘルツ分光法(THz 分析)、固体マジック角回転(MAS)¹H-NMR、熱重量分析(TG)、窒素吸着等温線測定を行い、水・有機成分の動態の両側面から竜骨に対する有機成分吸着の検証を行った。まず水の動態の検討結果について述べる。

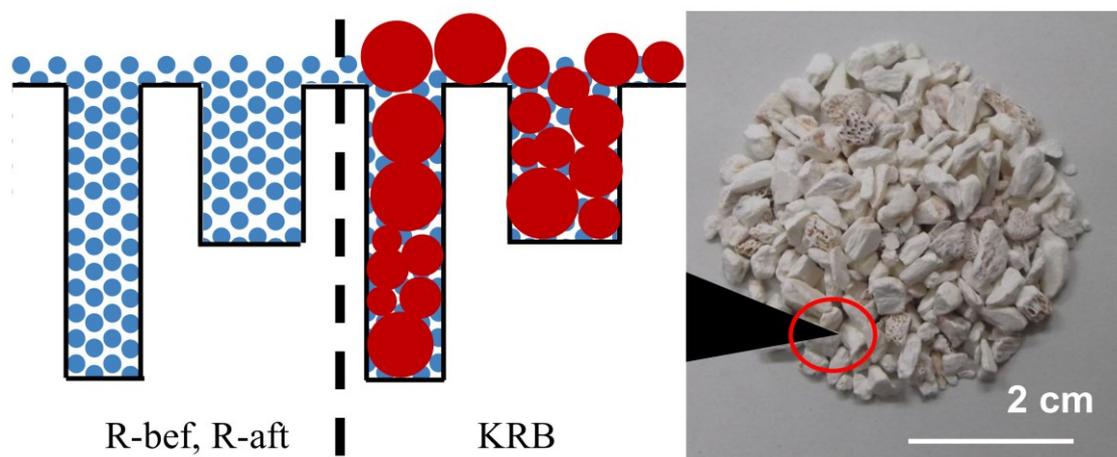


Fig. 14 Hypothetical model of longgu surface before/after decocting process. Blue and brown circles indicate water and organic compounds, respectively.

【材料・方法】

竜骨試料調製

前章と同様の方法で KRB 並びに R 煎液を調製し、竜骨残渣を得た。実験に供した竜骨試料は煎前(R-bef 群)、R 煎後残渣(R-aft 群)、KRB 煎後残渣(R-krb 群)の3群である。

遷移放射テラヘルツ分光分析

各竜骨試料を粉末化し、20 mg をアクリル樹脂フィルムに1 cm 角となるように封入した。また無処理及び超純水を添加した Hydroxyapatite 粉末(Sigma-Aldrich Inc., MO, USA)も同様に20 mg をフィルムに封入した。光源として京都大学原子炉実験所の L バンド線型加速器を用い、得られた遷移放射光(直径 8.0 mm)を試料に照射し、 $10\text{-}25\text{ cm}^{-1}$ の波数領域における吸収スペクトルを測定した。分光分析装置として Martin-Puplett 型フーリエ変換干渉分光計⁴⁴および液体ヘリウム冷却シリコンボロメータを用いた。

固体マジック角回転 $^1\text{H-NMR}$

竜骨試料をメノー乳鉢で 0.15 mm 篩過するように粉碎し、4 mm ジルコニア製 MAS ローターに充填した。ASX-200、DSX-200 分光器(Bruker Analytik GmbH,

Germany)と超伝導マグネット(4.7 T)を用いて $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。マジック角回転は $8 \text{ kHz} \pm 0.01 \text{ kHz}$ の回転を加えた。測定周波数は 200.13 MHz 、加えた高周波パルス幅は $4 \mu\text{s}$ 、繰り返し時間は 4 s で、FID シグナルの積算回数は 256 回で測定を行った。得られた NMR スペクトルのピークフィッティングには `dmfit program`⁴⁵ を用い、解析により得られた各ピークの高さ(amplitude)、線幅(半値幅, width)からピーク面積を以下の計算式により算出した。

$$\text{area(Lorentzian)} = \frac{\pi}{2} \times \text{width} \times \text{amplitude}$$
$$\text{area(Gaussian)} = \frac{\sqrt{2\pi}}{2\sqrt{2\ln 2}} \times \text{width} \times \text{amplitude}$$

熱重量分析

R-bef, R-aft, R-krb 群を粉砕(0.075 mm 篩過)し、アルミパンに 10 mg とり、測定を行った。測定装置は差動型高温示差熱天秤 TG-DTA2000SA(Bruker AXS 株式会社、神奈川)を用い、窒素流下($200 \text{ cm}^3/\text{min}$)で室温から $500 \text{ }^\circ\text{C}$ まで昇温($5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$)した。標準物質として $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (アルミナ) 10 mg を用いた。

窒素吸着等温線

R-bef, R-aft, R-krb 群を粉砕 (0.15 mm 篩過)し、Gemini 2375 v5.00 (Micromeritics Inc., GA, USA)を用いて 77 K で窒素吸着等温線を測定した。比表面積の算出には

Brunauer–Emmett–Teller (BET)法⁴⁶を用いた。BET法は、低相対圧(0.3以下)範囲において、窒素が試料表面に単一の層状に吸着している状態での窒素吸着量から試料の表面積を算出する方法である。

【結果・考察】

テラヘルツ分光分析

THz分析で用いるテラヘルツ波とは、一般的に0.1–100 THzの周波数範囲の電磁波で、格子振動や高分子の分子内振動、分子間相互作用などに関連する、物質固有の情報が得られる⁴⁷。今回使用した試料では、波数5~25 cm⁻¹ (波長200~40 μm, 周波数1.5~7.5 THz)の領域で吸収スペクトルが観測できた(Fig. 15)。通常、本波数域では多くの物質(半導体、プラスチック、セラミックスなど)が光を完全透過、または完全吸収するため、吸収スペクトルは得られない。本検討において、竜骨のような無機物の複合体でスペクトルが得られることが初めて明らかとなった。

R-bef群及びR-aft群のスペクトルを比較すると(Fig. 15a, b)、R-aft群でスペクトル全体の吸光度が上昇していた。当該波数領域において、試料の水分含量が吸光度に大きく影響する⁴⁸ことから、R煎操作による吸着水の増加の影響であると考えた。竜骨は多成分の複合体であるので、試料中の水の影響をより単純

な系で検討するため、竜骨の主成分の一つである hydroxyapatite 試料について、水の影響を検討した。無処理群(Fig. 15d)に比べ、水添加群(Fig. 15e)でスペクトル全体の吸光度上昇が再現できた。R-aft 群における吸光度上昇は、R 煎加工による水の吸着であることを示唆した。一方、R-krb 群のスペクトル(Fig. 15c)では、R-aft 群のような大幅な吸光度上昇は見られなかった。R-aft 群に比べ、R-krb 群では含水量が低下していると考えられ、有機物による水吸着の阻害を示唆した。

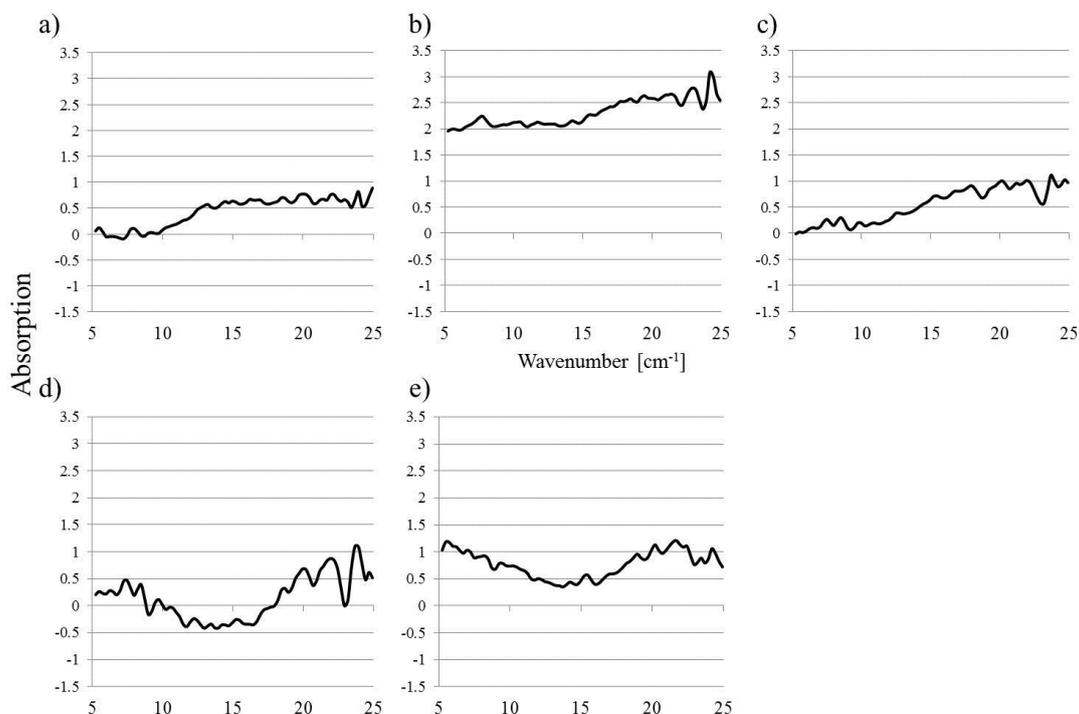


Fig. 15 Typical terahertz wave absorption spectra of longgu samples (a: raw, b: decocted in R, and c: decocted in KRB) and hydroxyapatite samples (d: raw and e: water saturated). The spectra are shown as absorption per 1 mm sample by defining that of an acrylic resin film as 0.

固体 $^1\text{H-NMR}$

$^1\text{H-NMR}$ 測定により、試料中に存在する ^1H (プロトン)を高感度で検出することができ、細孔内に吸着した水の動態を直接観測できる。

測定の結果、全群に共通して 5 ppm, および 0 ppm にピークを持つスペクトルが得られた(Fig. 16a-c)。各ピークはそれぞれ、竜骨への吸着水(5 ppm)と、竜骨の主成分の一つである hydroxyapatite のヒドロキシ基(OH 基, 0 ppm)のプロトンに由来するものであった^{49,50}。各ピークの詳細を解析したところ、水のピークは2つのローレンツ型ピーク(peak 1, 2)、OH 基のピークは2つのガウス型ピーク(peak 3, 4)から成っていた(Fig. 16d-f, Table 5)。

各群のスペクトル・解析ピークを比較すると、OH 基のピーク(peak 3, 4)は各群で同等の高さ・線幅・面積であったが、水のピークは R-krb 群で減弱していた(Fig. 16c)。ピーク解析の結果、peak 2 は高さ・線幅・面積に有意な差は見られなかった。一方で、peak 1 は R-bef, R-aft 群の高さ・面積はそれぞれ約 15,700、約 110,000 であるが、R-krb 群では約 5,400、約 68,000 と有意に減弱しており、THz 分析の結果と同様、吸着水量が R-bef 群、R-aft 群よりも少なく、有機成分吸着による水吸着の障害が明白であった。

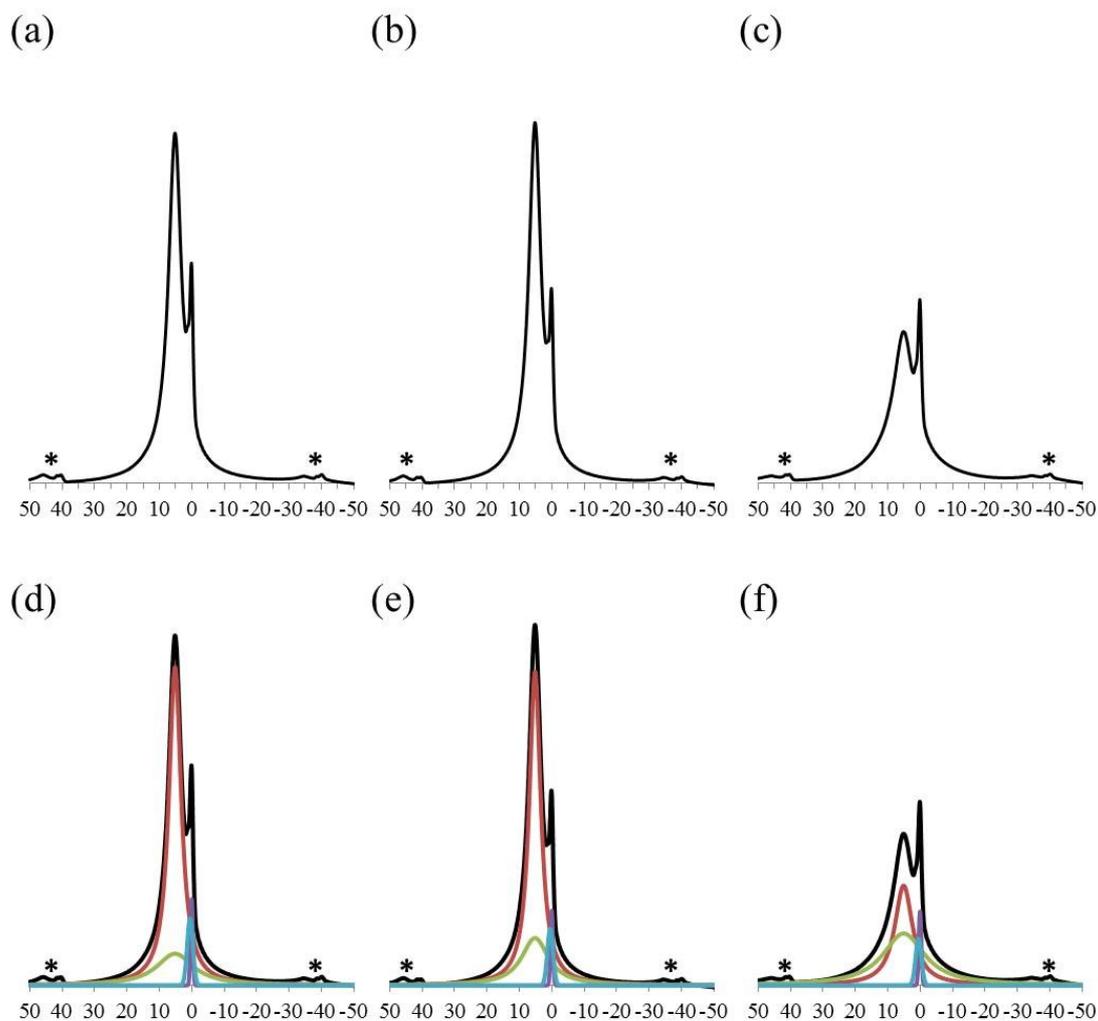


Fig. 16 Typical ^1H -NMR spectra of longgu samples (a, b, c) and fit simulated peaks for them (d, e, f): raw longgu(a, d), longgu decoupled in R (b, e), longgu decoupled in KRB (c, f). The spinning side bands are indicated by asterisks. The spectra of longgu have two peaks at 5 and 0 ppm that are derived from H_2O and OH^- , respectively. Each peak is simulated with two peaks: lorentzian peak1 (red) and 2 (green) for H_2O , and gaussian peak 3 (purple) and 4 (blue) for OH^- .

Table 5 The result of NMR peak analysis: chemical shift, amplitude, width and area.

Peak1(Lorentzian)			
	R-bef	R-aft	R-krb
Chemical Shift [ppm]	5.16 ± 0.0058	5.18 ± 0.010	5.09 ± 0.017
Amplitude	15806.39 ± 1627.52	15652.52 ± 1537.84	5374.64 ± 237.48*
Width [ppm]	4.52 ± 0.16	4.49 ± 0.28	8.09 ± 1.20
Peak Area	112322.55 ± 14629.93	110089.29 ± 7664.59	68091.15 ± 8424.08*
Peak2(Lorentzian)			
	R-bef	R-aft	R-krb
Chemical Shift [ppm]	5.16 ± 0.0058	5.18 ± 0.010	5.09 ± 0.017
Amplitude	1986.72 ± 313.46	2207.30 ± 602.93	1803.94 ± 935.01
Width [ppm]	13.32 ± 1.33	12.85 ± 3.49	21.72 ± 5.27
Peak Area	41151.29 ± 2588.79	42378.36 ± 2930.26	56398.37 ± 12522.73
Peak3(Gaussian)			
	R-bef	R-aft	R-krb
Chemical Shift [ppm]	0.053 ± 0.021	0.037 ± 0.023	0.063 ± 0.021
Amplitude	4366.39 ± 369.39	3961.11 ± 175.74	3683.22 ± 395.29
Width [ppm]	0.87 ± 0.021	0.88 ± 0.021	0.90 ± 0.020
Peak Area	4053.89 ± 246.89	3694.90 ± 132.11	3531.96 ± 435.04
Peak4(Gaussian)			
	R-bef	R-aft	R-krb
Chemical Shift [ppm]	0.51 ± 0.035	0.50 ± 0.032	0.48 ± 0.029
Amplitude	3143.4 ± 502.03	2961.05 ± 249.43	2613.4 ± 134.46
Width [ppm]	2.02 ± 0.056	2.03 ± 0.078	2.07 ± 0.066
Peak Area	6777.97 ± 1273.4	6391.71 ± 482.31	5755.46 ± 258.81

The data are shown as mean ± S.D. (n = 3). **P* < 0.05 vs R-bef and R-aft (Tukey's test)

熱重量分析

次に、THz 分析及び NMR で観測された R-krb 群における吸着水の減少が有機物吸着によることを裏付けるため、TG 測定を行い、加熱に伴う重量変化によって竜骨へ吸着した物質の脱離を観測した。典型的な TG 曲線を Fig. 17 に示した。全群に共通して 100 °C、350 °C の 2 ヶ所に傾きの変化、変曲点が存在した。一方、R-krb 群(Fig. 17 c)では、250 °C 付近にも変曲点が存在しており、他群には存在しない吸着物を検出した。これら吸着物は、仮説モデルから水と有機成分と予想されるが、TG のみでは判別できない。そこで、再度 $^1\text{H-NMR}$ を用い、吸着物について検討した。

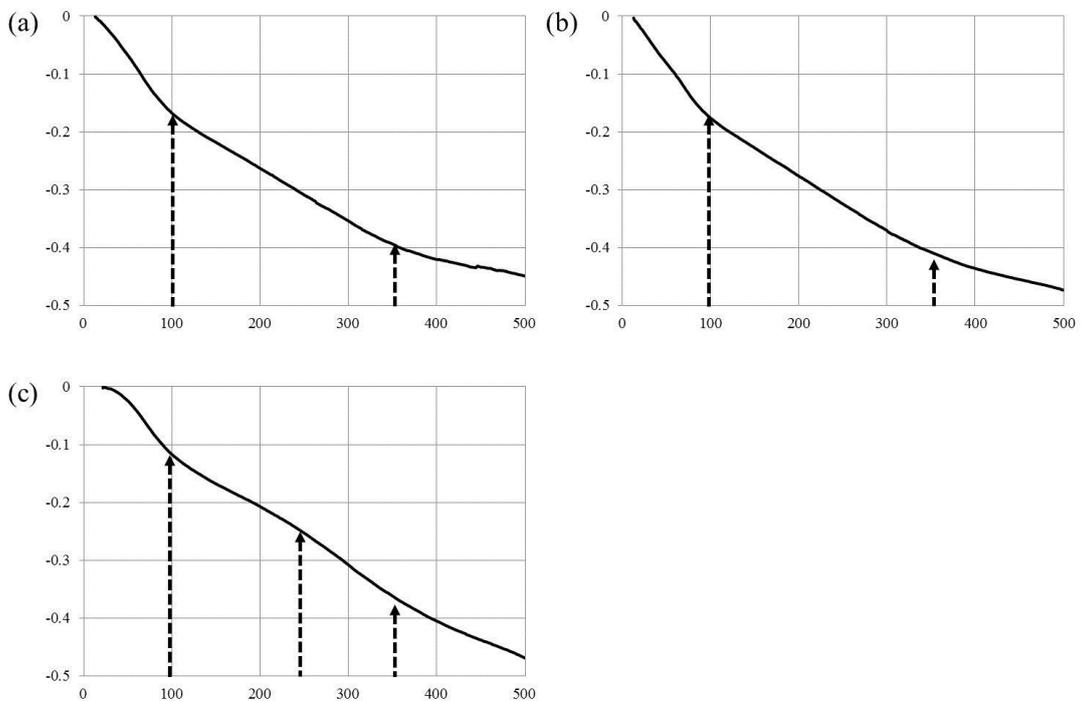


Fig. 17 Typical thermogravimetric (TG) curves of (a) raw longgu, (b) R residue, and (c) KRB residue. The broken arrows indicate the inflection points of TG curves.

固体 NMR

TG で変曲点の存在した各温度(100, 250, 350 °C)で 30 min 加熱した各試料群について NMR 測定を行った(Fig. 18)。加熱により R-bef 群、R-aft 群で共通して水のピークのみが減弱した(Fig. 18a, b)ことから、両群の TG(Fig. 17a, b)で観測された重量減少は水の脱離によるものであり、100 °C, 350 °C における変曲点は存在位置の違う水の脱離であることが示唆される。竜骨表面や細孔の開口部付近の水が 100 °C までに脱離し、細孔深部に存在する水の脱離は 350 °C まで徐々に進行したと考察した。R-krb 群の NMR スペクトル・ピーク解析結果(Fig. 18c,f)では、250 °C において R-bef, R-aft 群と異なる変化は認められなかった。TG 曲線の 250 °C における変曲点は、¹H-NMR スペクトルに影響しない有機成分の脱離によるものと考えられる。R-krb 群の TG 曲線は 250 °C の変曲点で傾きが大きくなっており(Fig. 17 c)、250 °C 以上で吸着物の脱離が加速している。有機成分が細孔に吸着する際に細孔内に残存・封入された水が、有機成分の脱離(250 °C)後に脱離を開始し、最終的に R-bef, R-aft 群と同様に 350 °C まで徐々に脱離したと考えられる。

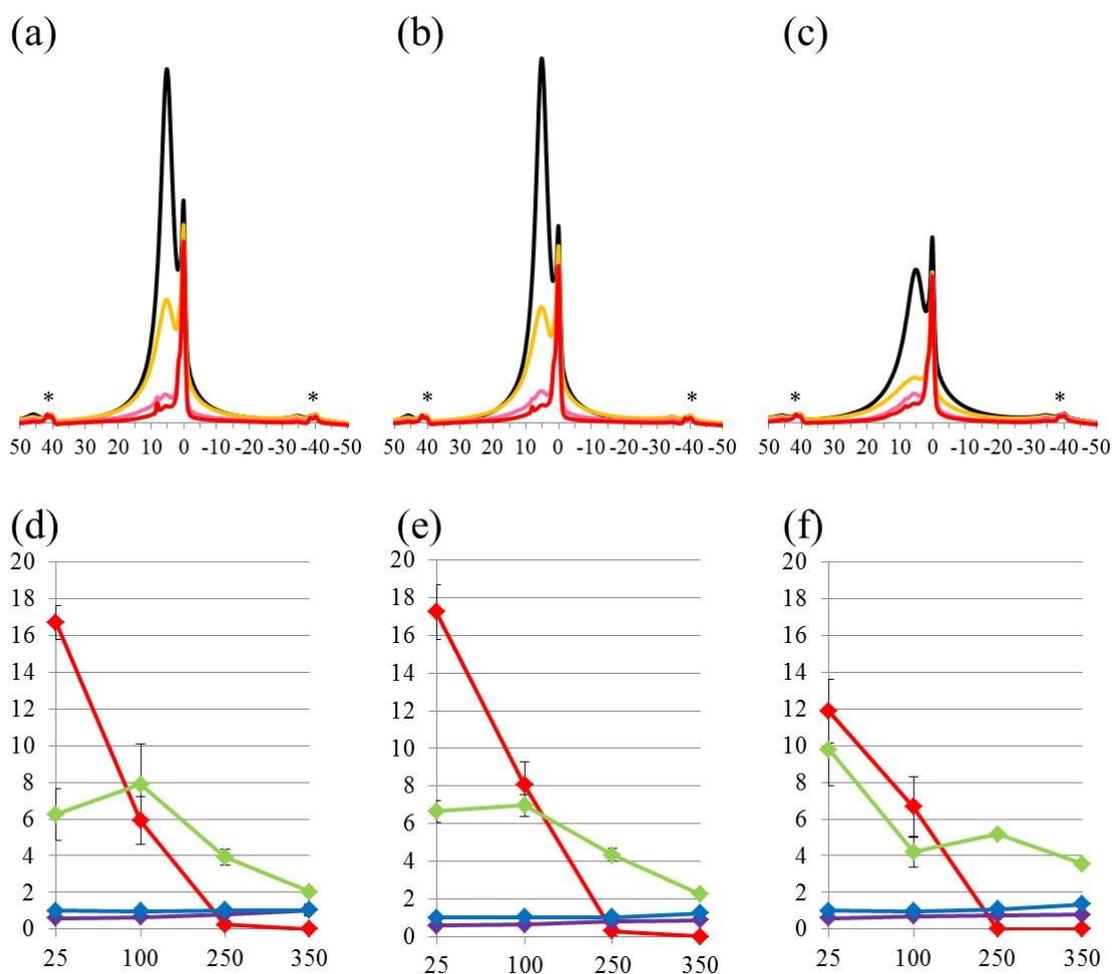


Fig. 18 Typical solid state ¹H-NMR spectrum in each temperature and their relative peak areas of simulated peaks shown at Fig. 8a for raw longgu (a, d), R residue (b,e), and KRB residue (c, f). The spectrum of each sample was measured at room temperature (black line), 100 °C (orange line), 250 °C (pink line), 350 °C (red line). The spinning side bands are indicated by asterisks. The peak areas (d, e, f) are shown by defining that of peak 4 at room temperature as 1: each peak indicated as mean ± S.D. with red (peak1), green (peak2), purple (peak3), and blue diamonds (peak4).

窒素吸着等温線

仮説通り竜骨表面に有機物が吸着すると、表面の凹凸や細孔が狭窄し、比表面積が低下することが予想されることから、窒素吸着等温線測定による比表面積の検討を行った。竜骨試料の典型的な窒素吸着等温線として R-bef 群の等温線と、比表面積の算出結果を Fig. 19 に示した。吸着等温線は、形状によって I 型から VI 型の 6 つに分類されており (IUPAC の分類⁴³)、試料中の細孔の大きさによって等温線の形状が異なる。竜骨の窒素吸着等温線 (Fig. 19a) は相対圧 0 付近で立ち上がった後、なだらかに上昇し、相対圧 1 付近で再び立ち上がる。これは IUPAC の分類における II 型の等温線である。II 型はマクロ孔を持つ試料で見られる等温線であり、本章第一節の SEM/EDX において確認された細孔の大きさと矛盾しない結果である。

BET 法により算出した比表面積を各群間で比較したところ (Fig. 19b)、R-bef 群では $39.9 \text{ m}^2/\text{g}$ 、R-aft 群では $38.2 \text{ m}^2/\text{g}$ であるが、R-krb 群においては $33.2 \text{ m}^2/\text{g}$ と有意に低下していた。吸着物による窒素吸着の阻害が明白であり、KRB 煎操作によって有機成分が細孔内に侵入・吸着することによって細孔が狭窄していることがわかる。

現生生物骨を $800 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上の高温で乾留し、有機物を炭化させて製造する骨炭は、比表面積 $40\sim 50 \text{ m}^2/\text{g}$ 程度^{51, 52}の吸着材である。竜骨の比表面積は骨炭と同

程度であることから、竜骨が有機成分を吸着していると考えるのは妥当である。

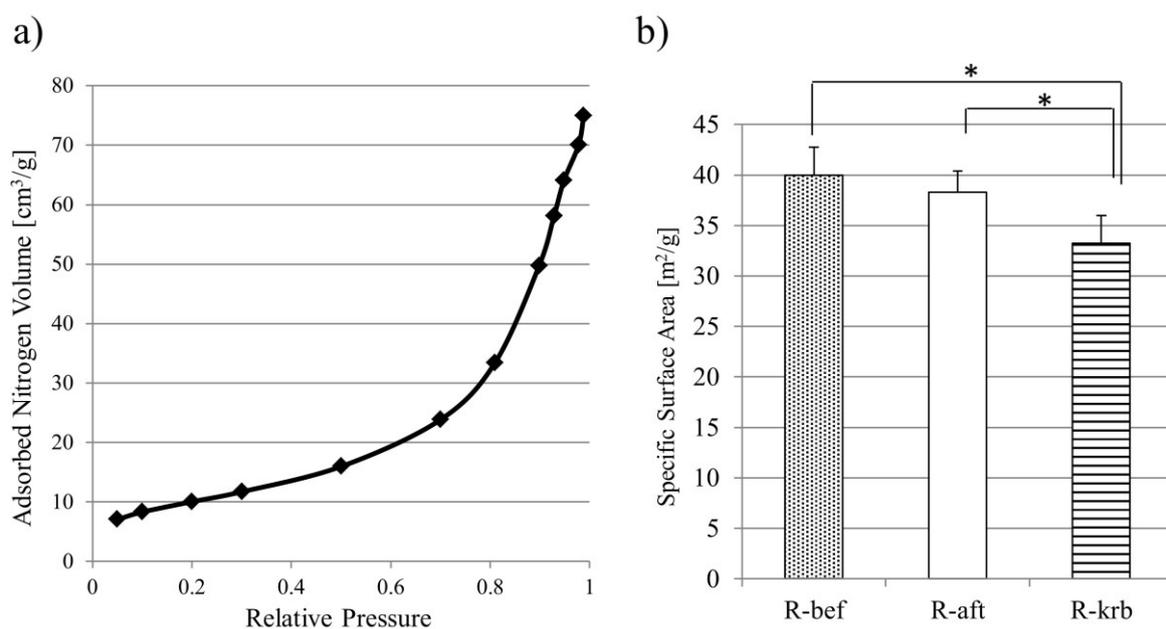


Fig. 19 The results of nitrogen adsorption isotherm measurement. (a) Typical nitrogen adsorption isotherms of R-bef sample. (b) Specific surface area of each sample type (mean \pm S.D.). The asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$, $n = 5-10$, Tukey's test).

小括

本章では、前章で明らかとなった竜骨による煎液成分調節作用について、竜骨の物性・基質的側面から検討を行った。初めに SEM を用いて R-bef 群竜骨の表面分析を行い、竜骨表面に細孔が存在することを明らかにした。また、R-krb 群の SEM/EDX 分析を行い、細孔に有機成分が吸着されていることを示唆した。そこで、有機成分吸着を裏付けるため、遷移放射テラヘルツ分光分析、固体プロトン NMR、熱重量分析、窒素吸着等温線測定と、複数の分析手法を用いて多角的に検討を行った。その結果、KRB 煎加工によって、竜骨表面の細孔構造内に存在した吸着水が、他の配合生薬に由来する有機成分によって吸着を阻害されていることを見出した。

以上の結果から、竜骨の煎液成分調節作用機序を以下のように考察した。破碎された市場品竜骨には骨の緻密質・海綿質に由来する細片が混在しているが、その表面には共通して μm レベルの細孔が存在する。KRB として煎じると、水が細孔内に吸着するが、やがて竜骨以外の生薬から溶出した有機成分が細孔内に侵入、水と置き換わり竜骨に吸着する(Fig. 20)。これにより煎液中の有機成分プロファイルが変化する。

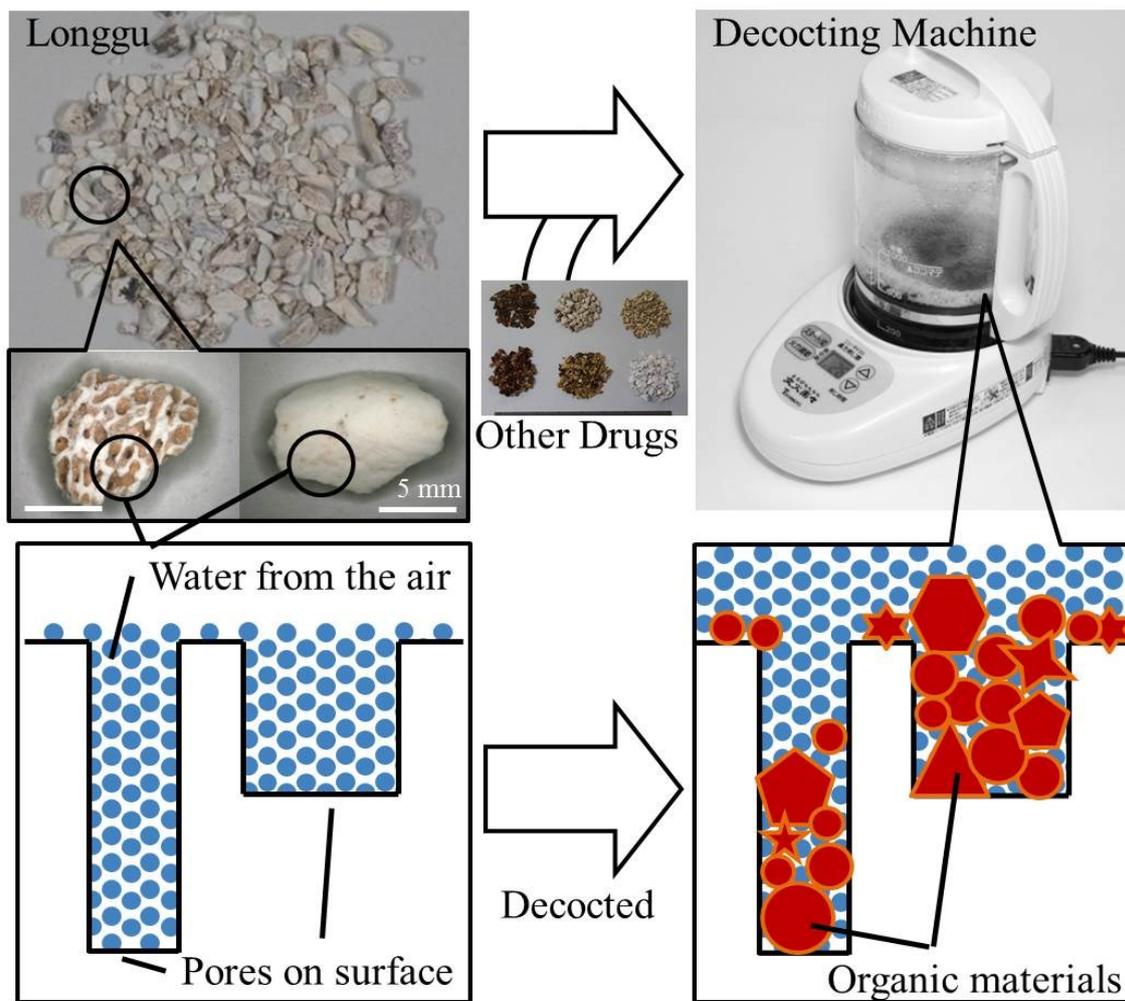


Fig. 20 Schematic diagram of the role of longgu in KRB decocting process. Longgu captures organic materials from other crude drugs in its pores during the decocting process.

総括

本研究では、有限資源である化石由来生薬「竜骨」の医療ニーズと化石資源保存の共生のため、生薬材料学的視座で竜骨の基原動物同定及び実地臨床での配合意義と作用メカニズムの解明について検討を行い、以下の結果を得た。

1. 大阪大学博物館所蔵の竜骨・竜歯関連標本 20,939 検体の基原動物同定を行い、5 目 9 科の哺乳類由来化石を発見した。中国市場品では、日本市場品に比べ多くの動物種由来の化石を確認した。竜骨が多様な動物化石の混合物であることが明らかとなり、哺乳類化石に共通する性状が薬能に関与することを示唆した。
2. 竜骨を含む 7 生薬から構成される漢方薬・桂枝加竜骨牡蠣湯において、煎剤中の無機・有機成分を網羅的に分析し、竜骨からの成分溶出は極めて微量かつ限定的であることを確認した。更に竜骨は、他の配合生薬類からの成分溶出パターンを変化させることを示し、その配合意義が成分調節であることを明確にした。
3. 竜骨の煎剤成分調節作用について吸着制御の視座で検討し、遷移放射テラヘルツ分光法・NMR 分析・熱分析・窒素吸着等温線測定の多角的分析手法を用

い、竜骨表面の細孔構造に存在する吸着水及び物性・器質性に基づく現象から立証した。即ち、竜骨の細孔構造に存在する吸着水が煎剤処理により、竜骨以外の配合生薬由来有機成分に置換されることで発現する吸着現象であることを裏付けた。

本研究の最終目的である、医療ニーズと化石資源保護という相反する要求の共生実現(Fig. 21)は、枯渇が目前に迫っている現在では喫緊の課題である。実際、竜骨は中国の医薬品公定書である中華人民共和国薬典（中国薬典）の1985年版で削除されており⁵³⁻⁵⁵、国家レベルで化石を保護しようとする意図が窺える。また現在、採掘権の問題などから企業などが自由に採掘できなくなっており、いよいよ竜骨の供給が危うくなっている。

理論的には化石化過程を解明し、現生哺乳類骨を原料に化石化を再現できれば、竜骨の代替品を作製できるが、生物遺骸の分解過程、遺骸が運搬され堆積物に包埋される過程、堆積物中における以外の物理・化学的変質過程、という生物圏から岩石圏へ変化移行する全過程を包括するタフォノミー(Taphonomy)研究は複雑で、中でも化石化機序(遺骸の物理・化学的変質の過程)は未解明の領域である。化石化再現研究、代替品の臨床試験などを含め、膨大な学際的検討が必要で、現在の逼迫した状況を打破するには迅速性に欠けている。

一方、今回竜骨の漢方薬中での配合意義が表面細孔への成分吸着調節であることを明確にした。そこで、竜骨が吸着した成分を除去することができれば、リサイクル化が可能であるという着想に至った。本法でも環境面・コスト面などを考慮した実用上適切な吸着物除去法の開発、竜骨の可逆性・連用可能性の担保、臨床上の同等性試験など多くの検討が必要である。しかし、本アプローチは既に医薬品として使用された竜骨を再生するため、人工代替品に比べ漢方医からの忌避感が小さく、臨床試験の協力が得やすいと考えられ、将来的な臨床適用の実現性が高い、即効性・実効性のある合理的対応策であると確信している。

薬用資源としての竜骨の課題を解決するには、代替品開発・リサイクル化の両面から並行してアプローチしなければならない。しかし、双方の課題克服には膨大な研究量が予想される現状から、現実性のある竜骨の再利用化を提案したい。今後、竜骨リサイクル化のための吸着物除去法・連用可能性・臨床上の同等性の検討を重ねると同時に、代替品構築を志向して古生物学・理工学・医学の各分野が共同し、化石化機序の解明及び再現研究を行い、知見を蓄積し、リサイクル・代替品の実用化によって、竜骨のサステイナブルユース実現につながることを期待する。

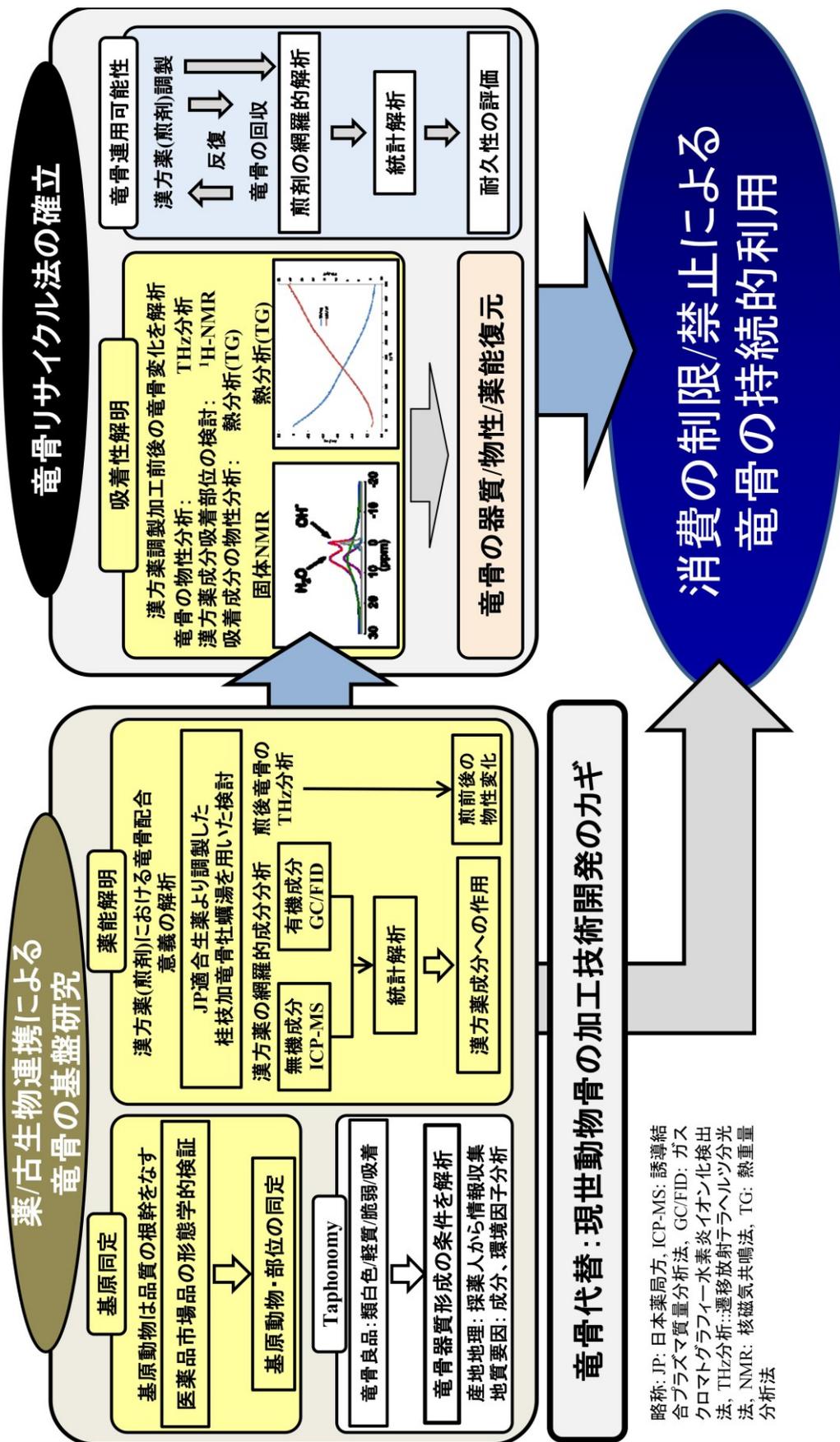


Fig. 21 The problems to solve for our goal: sustainable use of longgu.

謝辞

本研究、本稿を終えるにあたり、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました、大阪大学総合学術博物館 資料基礎研究系(兼)大学院薬学研究科 准教授 高橋京子先生、同助教 高浦(島田)佳代子先生に厚く御礼申し上げます。

本研究において、基原動物同定に際し、多大なるご助力、ご指導を頂戴いたしました、北海道大学総合博物館准教授 小林快次先生、早稲田大学高等研究所助教 西岡佑一郎先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、ICP-MS 装置による分析及び統計解析に関して、終始、丁寧なご指導、ご教授をいただきました、長浜バイオ大学教授 川瀬雅也先生に深謝致します。

本研究において、GC/FID による分析・解析に関してご指導・ご協力を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授 平田收正先生、講師 原田和生先生に心より御礼申し上げます。

本研究において、NMR 測定に関してご指導、ご助言を賜りました、大阪大学総合学術博物館 資料先端研究系教授 上田貴洋先生に感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、様々なご協力を頂きました伊藤謙先生をはじめとする大阪大学総合学術博物館の皆様感謝申し上げます。

最後に、数々の苦勞を共にした大阪大学薬学部/大学院薬学研究科 伝統医薬解
析学分野の皆様へ心より感謝致します。

(本研究は2010-12年度日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究B「薬用
資源の文化財分析法を用いた新規標準化インデックスの探索」(研究代表者 高
橋京子 課題番号 22300310)による成果の一部である。)

参考文献

1. Ministerial Notification No. 44 (1976) Japanese Pharmacopoeia, 9th edn. Ministry of Health and Welfare, Tokyo (in Japanese)
2. Ministerial Notification No. 49 (1981) Japanese Pharmacopoeia, 10th edn. Ministry of Health and Welfare, Tokyo (in Japanese)
3. Ministerial Notification No. 58 (1986) Japanese Pharmacopoeia, 11th edn. Ministry of Health and Welfare, Tokyo (in Japanese)
4. Ministerial Notification No. 51 (1991) Japanese Pharmacopoeia, 12th edn. Ministry of Health and Welfare, Tokyo (in Japanese)
5. Ministerial Notification No. 73 (1996) Japanese Pharmacopoeia 13th edn. Ministry of Health and Welfare, Tokyo (in Japanese)
6. Ministerial Notification No. 111 (2001) Japanese Pharmacopoeia 14th edn. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo
7. Ministerial Notification No. 285 (2006) Japanese Pharmacopoeia 15th edn. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo
8. Ministerial Notification No. 65 (2011) Japanese Pharmacopoeia 16th edn. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo
9. Ministerial Notification No. 64 (2016) Japanese Pharmacopoeia, 17th edn. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo
10. 福井県立恐竜博物館(2004) 福井県立恐竜博物館展示解説書、福井県立恐竜博物館、福井
11. 難波恒雄(1995) 漢方・生薬の謎を探る、日本放送出版協会、東京

12. Boaz NT, Ciochon RL (2004) *Dragon Bone Hill: An Ice Age Saga of Homo erectus*. Oxford University Press, Oxford, New York
13. 小学館(1985) 中薬大辞典 第四卷、上海科学技術出版社、小学館、東京: pp. 2685
14. 朝比奈泰彦(1955) 正倉院薬物、植物文献刊行会、大阪
15. Walker R (1985) *A Guide to Post-cranial Bones of East African Animals*. Hylochoerus Press, Norwich, 285p
16. Qiu Z, Deng T, Wang B (2004) Early Pleistocene mammalian fauna from Longdan, Dongxiang, Gansu, China. *Palaeontologia Sinica* 191 (New Series no. 27): 1-198
17. Saegusa H (1996) Stegodontidae: Evolutionary relationships. In: *The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives* (Shoshani J, Tassy P, eds.), Oxford University Press, Oxford, New York, pp 178-190
18. Deng T, Hanta R, Jintasakul P (2013) A new species of *Aceratherium* (Rhinocerotidae, Perissodactyla) from the late Miocene of Nakhon Ratchasima, northeastern Thailand. *J. Vert. Paleontol.* 33: 977-985
19. Deng T, Wang H, Wang X, Li Q, Tseng ZJ (2016) The late Miocene *Hipparion* (Equidae, Perissodactyla) fossils from Baogeda Ula, Inner Mongolia, China. *Hist. Biol.* 28: 53-68 DOI 10.1080/08912963.2015.1020425
20. Deng T (2004) A new species of the rhinoceros *Alicornops* from the middle Miocene of the Linxia Basin, Gansu, China. *Palaeontology* 47: 1427-1439
21. Deng T, Qiu Z, Wang B, Wang X, Hou S (2013) Late Cenozoic Biostratigraphy of the Linxia Basin, Northwestern China. In: Wang X, Flynn LJ, Fortelius M (eds.) *Fossil Mammals of Asia: Neogene Biostratigraphy and Chronology*. Columbia University Press, New York, pp 243-273

22. Kaakinen A, Passey BH, Zhang Z, Liu L, Pesonen LJ, Fortelius M (2013)
Stratigraphy and Paleocology of the classical dragon bone localities of Baode
County, Shanxi Province. In: Wang X, Flynn LJ, Fortelius M (eds.) Fossil
Mammals of Asia: Neogene Biostratigraphy and Chronology. Columbia University
Press, New York, pp 203-217
23. 難波恒雄(1980) 原色和漢薬図鑑(下)、保育社、大阪 pp.354
24. 李時珍(1578) 本草綱目
25. 厚生労働省医薬食品局(2011) 一般用漢方製剤承認基準
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000001qsro-att/2r9852000001r6nh.pdf>
26. 厚生労働省 薬事工業生産動態統計調査(平成 20-26 年)
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/GL02100104.do?gaid=GL02100102&toacd=00450151>
27. Tsuda T, Sugaya A, Kaneko E, Ohguchi H, Katoh K, Jin W, Sugaya E (1998)
Pharmacological studies on longgu and oyster shell. *Natural Medicines* 52: 300-309
28. Ha JH, Lee MG, Chang SM, Lee JT (2006) In vivo characterization of sedative
activities of *Fossilia Mastodii* Osis. *Biol Pharm Bull* 29:1414-1417
29. Yoshie F, Iizuka A, Kubo M, et al. (2001) Protective effects of Saiko-ka-ryukotsu-
borei-to (Chai-Hu-Jia-Long-Gu-Mu-Li-Tang) against atherosclerosis in Kurosawa
and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Pharm. Res.*, 43(5), 481-487
30. Koizumi A, Mizukami H, Ogihara Y, Inoue M (2005) Anti-atherosclerotic action of
Saikokaryukotsuboreito against apoE-deficient mice. *J. Trad. Med.* 22, 34-38
31. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Aburada M, Tabira T (2003)
Saiko-ka-ryukotsu-borei-to, a herbal medicine, ameliorates chronic stress-induced

- depressive state in rotarod performance. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(2), 419-425
32. Mizoguchi K, Sun N, Jin XL, Kase Y, Takeda S, Maruyama W, Tabira T (2007) Saikokaryukotsuboreito, a herbal medicine, prevents chronic stress-induced dysfunction of glucocorticoid negative feedback system in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86(1), 55-61
33. Nomura S, Hattori N, Sakakibara I, Fukuhara S (2001) Effects of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to in patients with hyperlipidemia, *Phytomedicine*, 8(3), 165-173
34. Takeuchi T, Nakano Y, Koike H (1996) Neutron activation analysis of ivory of African elephants. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 205:301-309
35. Mino Y, Tanaka K, Usami H, Ota N (1988) Inorganic chemical approaches to pharmacognosy. III. X-ray fluorescence spectrometric studies on the inorganic constituents of crude drugs (2) on the mineral drugs "Ryukotsu". *Shoyakugaku Zasshi* 42: 310-316
36. Hashimoto A, Shida Y, Nakamura T, Kuwahara Y, Nishi H (2002) Studies on the quality evaluation of natural medicines by analysis of inorganic constituents (1) quality evaluation of mineral natural medicines by ICP-AES analysis. *Natural Medicines* 56: 239-246
37. Inoue M, Ota N, Mino Y, Inoue A, Sakaki T (1974) Physicochemical studies on the crude drugs. I. X-ray diffraction pattern of the "Ryu-kotsu." *Shoyakugaku Zasshi* 28(2), 102-106
38. 間藤徹 (2010) 植物栄養学 第2版 文永堂出版、東京
39. Shimabayashi S (1987) Physico-chemical studies on the interaction of hydroxyapatite with biologically significant ions. *Yakugaku Zasshi* 107(5), 323-337

40. Miyake M, Imagawa S, Nagasawa H, Tanaka H, Suzuki T (1989) Reaction characteristics of calcium carbonates with manganese ion. *Gypsum & Lime* 223, 363-367
41. Fujii Y, Nakajima S, Matsuoka A, Murakami A (1969) Studies on the constituents of Fossilia Ossid Mastodi. I. *Yakugaku Zasshi* 89(7), 1024-1027
42. Hashimoto A, Shida Y, Nakamura T, Nishi H (2002) Studies on the quality evaluation of natural medicines by analysis of inorganic constituents (2) dissolution behavior of inorganic constituents from mineral natural medicines. *Natural Medicines* 56: 247-254
43. Sing KSW (1985) Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure and applied chemistry* 57(4), 603-619
44. Okuda S, Takahashi T (2008) Absorption spectroscopy using a coherent transition radiation millimeter wave light source. *Infrared Physics & Technology* 51:410-412 DOI 10.1016/j.infrared.2007.12.015
45. D.Massiot, F.Fayon, M.Capron, I.King, S.Le Calv, B.Alonso, J-O.Durand, B.Bujoli, Z.Gan, G.Hoatson,(2002) Modelling one- and two-dimensional Solid State NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40, 70-76
46. Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Amer. Chem. Soc.* 60(2), 309-319
47. McIntosh AI, Yang B, Goldup SM, Watkinson M, Donnan RS (2012) Terahertz spectroscopy: a powerful new tool for the chemical sciences?. *Chemical Society Reviews* 41:2072-2082 DOI 10.1039/c1cs15277g

48. Breitenstein B, Scheller M, Shakfa MK, Kinder T, Müller-Wirts T, Koch M, Selmar, D (2012) Introducing terahertz technology into plant biology: A novel method to monitor changes in leaf water status. *J. Applied Botany and Food Quality* 84(2), 158-161
49. Yesinowski JP, Eckert H (1987) Hydrogen environments in calcium phosphates: proton MAS NMR at high spinning speeds. *J. Amer. Chem. Soc.*, 109(21), 6274-6282
50. Wilson EE, Awonusi A, Morris MD, Kohn DH, Tecklenburg MM, Beck LW (2006) Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophysical journal*, 90(10), 3722-3731
51. Chen Y N, Chai LY, Shu YD (2008) Study of arsenic (V) adsorption on bone char from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 160(1), 168-172
52. Siebers N, Leinweber P (2013) Bone char: a clean and renewable phosphorus fertilizer with cadmium immobilization capability. *J. Environ. Qual.* 42(2), 405-411
53. Chinese Pharmacopoeia Commission (1963) Chinese Pharmacopoeia. *People's Health Publishing House*, Beijing
54. Chinese Pharmacopoeia Commission (1977) Chinese Pharmacopoeia. *People's Health Publishing House*, Beijing
55. Chinese Pharmacopoeia Commission (1985) Chinese Pharmacopoeia. *People's Health Publishing House*, Beijing

主論文

1. 小栗一輝、竜骨の化石資源保全と活用の共生、*生物工学会誌*、92(7) : 350-353 (2014) 依頼原稿
2. Kazuki Oguri, Masaya Kawase, Kazuo Harada, Kayoko (Shimada) Takaura, Toshiharu Takahashi, Kyoko Takahashi, Longgu (Fossilium Ossium Mastodi) alters the profiles of organic and inorganic components in Keishikaryukotsuboreito, *Journal of Natural Medicines* 70(3):483-491 (2016)
3. Kazuki Oguri, Yuichiro Nishioka, Yoshitsugu Kobayashi, Kyoko Takahashi, Taxonomic examination of longgu (FOSSILIA OSSIS MASTODI, dragon bone) and a related crude drug, longchi (DENS DRACONIS, dragon tooth), from Japanese and Chinese crude drug markets, *Journal of Natural Medicines* (in press) DOI 10.1007/s11418-016-1062-5
4. Kazuki Oguri, Takahiro Ueda, Kyoko Takahashi, Longgu behaves as adsorbent of organic components in *Keishikaryukotsuboreito* (in preparation)

参考論文

1. 高橋京子、島田佳代子、中村勇斗、近藤小百合、小栗一輝、吉川文音、東由子、善利佑記、須磨一夫、伊藤謙、大橋哲郎、『緒方洪庵の薬箱(大阪大所蔵)』に収納された生薬資料：現況の可視化、*薬史学雑誌*、48(2) : 140-150 (2013)