

生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所・生薬部
研究者 合田幸広

研究要旨 生薬の科学的品質保証に関する研究として、シゴカ、*Curcuma* 属及び朮類生薬、半夏、天南星、細辛に関しジェノタイピング技術を利用した基原鑑定法を、漢方処方の科学的品質保証に関する研究として、処方中のチンピ、朮類生薬等の化学分析法を検討した。

分担研究者

- (1) (株) ツムラ生薬・資源研究所所長 寺林 進
- (2) (株) 栃本天海堂品質管理部部長 山本 豊
- (3) (株) ウチダ和漢薬研究開発部部長 藤田正雄
- (4) 名古屋市立大学大学院薬学研究所生薬学研究室教授 水上 元
- (5) 富山医科薬科大学和漢薬研究所資源開発研究部門生薬資源科学分野教授 小松かつ子
- (6) (株) ツムラ生産本部静岡工場 部長 山本藤輔
- (7) (株) 小太郎漢方製薬株式会社研究所 課長 近藤誠三
- (8) カネボウ(株)漢方ヘルスケア研究所 部長 山本恵一
- (9) ジェーピーエス製薬栃木工場製品開発部 田村真

A. 研究目的

生薬は、まず基原植物をもって適否の判定がなされる。基原植物の鑑定は、経験者の特殊な技能である五感による官能試験や鏡検による形態学的試験による場合が多く、熟練するのに長い期間が必要となる。経験によらない方法として、化学的な分析法が存在するが、分析対象になる二次代謝産物は、種々の環境要因により一定の範囲で変異する形質であり、環境によって示す様々な変異範囲を規定しなくては行けない。他方、植物の遺伝子塩基配列の違いを識別するジェノタイピング技術により、基原植物を規定すれば、遺伝子型そのものを観察することになり、

種の規定に曖昧さを排除できることになる。この様な背景の下、本課題では、生薬及び漢方処方について、ジェノタイピング技術と化学的な分析法を組み合わせた科学的な品質保証法の確立を目的として研究を行う。

レギュラトリーサイエンスとしての本研究は、生薬、漢方処方の規格設定にかかる問題を良く知る国立研究機関の研究者と、形態学的に植物鑑定が終了した生薬の供給ができ、さらに現場サイドで手法のバリデーション等の検討が可能な企業、並びに、先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者の共同で行われることで、最も効果的に行われると考えられ、本研究の成果より精度の高い品質保証が可能となる。さらに、本研究により遺伝子型-発現型の関係が明らかにされることで、将来的には同一の生薬であっても個々の処方に最適な遺伝子型が選択可能となり、生薬及び漢方処方が、所謂テーラーメイド医薬品としてより適切に、幅広く利用される道を開くこととなる。

B. 研究方法

B.1. 生薬の科学的品質保証に関する研究

B.1.1 試料の入手

生薬は、おもに中国市場でその生薬名で取り扱われているものについて、分担研究者の所属する複数の会社を通し、なるべく多くの産地から入手を試みた。その結果ビャクジュツ 11 検体、ソウジュツ 27 検体、細辛 13 検体、シゴカ 7 検体、テンナンショウ 9 検体を入手した。これらの生薬は、

それぞれ、日本薬局方に従い性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、希エタノールエキス、精油含量等について調べ、生薬の適、不適を判定した。また別に、シゴカ、ガジュツについては、日本薬局方調査会生薬等委員会等より、それぞれ 15、16 検体（中国産 13 検体、日本産 3 検体）を集めた。基原の明確な植物標本としては、ツムラ生薬・資源研究所所蔵並びに、分担研究者が既に検討し、報告した植物標本等を用いた。

B.1.2 シゴカ

各検体、約 30 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて凍結粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の rDNA に保存性の高い領域に設計した各プライマー対を用いて、2 段階の PCR を行うことにより、核 rDNA の ITS 領域 (628 bp) を増幅した。Microcon-PCR (Millipore) により、PCR 溶液から余剰のプライマー及び dNTPs を除去した後、ダイレクトシーケンスへと供した。Cycle sequencing 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。

B.1.3 *Curcuma* 属生薬

各試料を液体窒素下、凍結粉碎し、その 20-50 mg から、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出し、GENE CLEAN II Kit (BIO101) により精製した。このものを鋳型とし、2 段階の PCR を行うことにより、*trnK* の 5' イントロン領域及び 3' イントロン領域を別々に増幅した。その際、first PCR の増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) により精製した上で、nested PCR へと供した。Second PCR で得られた産物を、上記と同様に精製した後、ダイレクトシーケンスへと供した。Cycle sequencing 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、

解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、AutoAssemble program (Ver. 1.3.0, Applied Biosystems) を用いて行った。また、*Curcuma* 属の種間に見られた上流から 234 番目の 1 塩基置換部位を含む領域、約 400 bp を PCR により増幅し、18S rDNA 領域の PCR-RFLP を行った。得られた産物を制限酵素 *Ban* II で処理した後、2% アガロース電気泳動法により検出した。

B.1.4 朮類生薬

生薬試料を粉末にしたもの約 50 mg を取り、EDTA を含む PBS 溶液で洗浄した後、文献既報の SDS-Lysis buffer を用いる方法で DNA を調製した。DNA は、必要に応じてエタノール沈殿や silica column を用いて精製した。さらに塩基配列に基づいて鑑別のための情報を含む領域を設定し、その領域を含む約 300 bp (ITS1) または約 500 bp (*trnK*) の断片を PCR で増幅した。PCR は、通常 25 mL のスケールで行い、反応液の 8 mL を取って電気泳動で増幅産物を確認した。増幅が得られた場合には、さらに PCR 反応液の 7.5 mL をとり、ExoSap IT (Amersham) 2.5 mL を加えて残存する PCR プライマーと dNTP を分解・除去した後、その全量を用いてシーケンス反応を行った。また別に、蒼朮の基原植物 *Atractylodes lancea*、*A. chinensis*、白朮の基原植物 *A. ovata*、*A. japonica* の nrDNA、ITS 領域の塩基配列を、White *et al.* (1990)より報告されているユニバーサルプライマーを使用し調査した。

B1.5 半夏、天南星、細辛

半夏、天南星、細辛については、前述のユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅を行った。特に半夏および天南星に関して、菌類など非特異的増幅が多数見られるものは、配列の決定に成功したサンプルの配列を基に、5.8S 領域に菌類が増幅しない新たなプライマーを設計し、ITS1 ITS2 を別々に配列決定した。PCR 反応液は 2.0%アガロースゲルを用いて電気泳動して DNA をサイズごとに分離し、目標サイズの DNA バンドだけを切り出し

て GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham biotech) を用いて精製した。

B.2. 漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究

B.2.1 ビャクジュツ配合処方の指標成分についての検討

これまでにビャクジュツ含有製剤の品質評価のために、attractylenolide III (ATL III) を指標成分とした当帰芍薬散中のビャクジュツの HPLC による定量法が報告されている。本研究では、苓桂朮甘湯 (乾燥エキス) について、同化合物を指標にした HPLC を用いた定量法について検討した。市販の ATL III 2 検体の純度は、NMR と HPLC のデータから 99%以上と考えられたため、この ATL III を標品とし、市販の苓桂朮甘湯 6 検体を用いて検討を行った。試料溶液は、各乾燥エキス剤のメタノール抽出物を用いた。

B.2.2 ソウジュツ配合処方の指標成分についての検討

atractylodin (ATDN) を指標成分として、苓桂朮甘湯 (乾燥エキス) を用いて条件検討を行った。日本漢方・生薬製剤協会より恵与された ATDN の純度は、HPLC のデータから 99%以上と考えられたため、この ATDN を標品とし、市販の苓桂朮甘湯 2 検体を用いて検討を行った。試料溶液は、各乾燥エキス剤の MeOH 抽出物を用いた。

B.2.3 チンピ配合処方の指標成分についての検討

Hesperidin はチンピなどミカン科 *Citrus* 属植物の果皮に含まれるフラバノン配糖体である。本来 hesperidin のアグリコン部は 2S-hesperetin であるが、多くの市販品はアグリコン部が 2R-hesperetin である diastereomer との混合物であることが NMR データから明らかとなり、その純度を調べるため、分離条件を検討した。以下、便宜上これら diastereomer を 2S、2R と示す。市販品を含め入手した hesperidin 13 検体を用いて HPLC による diastereomer の分離条件を検討した。さらに、チンピ 7 検体および六君子湯 8 検体、釣藤散 3 検体、補中益気湯 10 検体についても検討を行った。試料溶液の調製は次のように行った。

粉碎したチンピ 100mg にメタノール (4 mL×2)

を加え 10 分間超音波抽出し、遠心分離 (2200×g, 10min) 後、上澄みを合わせ、メタノールで全量 10mL とした。メンブランフィルター (0.45 mm) でろ過し、試料溶液とした。漢方処方、チンピと同様の操作を行い全量を 4mL とした。

さらに、他のフラバノン配糖体 (narirutin, neohesperidin, naringin) についても HPLC による diastereomer の分離を検討した。

B.2.4 漢方処方エキスの品質評価法の検討

上記の検討で得られた知見等をもとに、補中益気湯中ヘスペリジンの HPLC による定量法、小青竜湯中カンキョウの確認試験法、苓桂朮甘湯中のビャクジュツ又はソウジュツ指標成分の HPLC による定量法について検討した。

(倫理面の配慮) 本研究は、ヒト試料並びに実験動物を使用しておらず、倫理面で問題となる場面はない。

C. 研究成果と考察

C.1 生薬の科学的品質保証に関する研究

C.1.1 シゴカ

シゴカ市場品は、ITS 領域において、大きく 3 つの遺伝子型に分類された。最も数の多かった type 1 は、エゾウコギ標品及び国際塩基配列データベース (GenBank、DDBJ、EMBL) 中の *Eleutherococcus senticosus* (Acc. No.: AJ786230) の配列と一致した。Type 2 は、type 1 と 98% (615/628) の相同性を示し、上記データベース中の *Eleutherococcus sessiliflorus* (AJ786229)、*E. sessiliflorus* f. *chungbuensis* (AY548188)、*E. seoulensis* (AY548187)、*E. senticosus* f. *inermis* (AY548186)、*E. divaricatus* f. *tristigmatis* (AY548180) と一致した。1 検体のみ観察された type 3 は、*Aralia elata* var. *mandshurica* (AJ786233) と 626 塩基中 2 塩基を除き一致した。また、同一品目中に複数の遺伝子型の認められたものが、2 品目あった。なお、いずれの type も全配列中 1-2 箇所程度の頻度で、2 塩基の重なりが認められる検体はいくつか見出されたが、ITS 領域のマルチコピーによるものか、

PCR 酵素の mis-incorporating によるものかは、不明である。なお、形態学的な鑑定を行った試料では、その鑑定と本実験結果は、ほぼ一致した。

C.1.2 *Curcuma* 属生薬

C.1.2.1 *trnK* 遺伝子の塩基配列比較

ガジュツ市場品について *trnK* 遺伝子の領域 1 及び領域 3 の塩基配列を解析し、既に小松分担研究者が報告している *Curcuma* 属植物 11 種の配列と比較した。その結果、中国市場品 13 検体のうち 2 個体の配列が一致したものは 3 市場品で、2 市場品は、*C. phaeocaulis*、1 市場品は、*C. kwangsiensis* (gl: pubescent type) の配列と一致した。日本市場品 3 検体は、全て *C. zedoaria* (JP: Japanese type) と一致した。各個体別では、中国市場品 26 個体のうち、7 個体が *C. phaeocaulis*、5 個体が *C. kwangsiensis* (gl)、1 個体が *C. yunnanensis* と同一の配列であった。残りの 13 個体は、新規の配列を有するものであり、それらは 6 つのタイプ (i-vi) に細分類された。すなわち、*C. phaeocaulis* の配列を基本にして上流から 2575 番目の塩基が thymine (T) から cytosine (C) に置換したもの (PC₂₅₇₅ と略す。以下同様) が 5 個体 (i 型)、*C. phaeocaulis* の配列を基本にして 2575 番目の T が adenine (A) に置換したもの (PA₂₅₇₅)、もしくは同じ配列で 177 番目の T が A に置換したもの (PA₂₅₇₅A₁₇₇)、または A と T がほぼ同量比で検出されたもの (PA₂₅₇₅A/T₁₇₇) が計 3 個体 (ii 型)、同様に *C. kwangsiensis* (pl: purple-cloud type) の配列を基本にした K (pl) T₂₅₇₅ が 1 個体 (iii 型)、K (pl) C₂₅₇₅ が 1 個体 (iv 型)、K (gl) A₂₀₀ が 1 個体 (v 型)、AG₂₅₁₁G₂₆₀₂ が 1 個体 (vi 型)、さらに *C. yunnanensis* の配列の 750 番目から 16 bp の繰り返し配列の挿入があるものが 1 個体確認された。

C.1.2.2 18S rDNA 遺伝子領域の PCR-RFLP 法

18S rRNA 遺伝子上流から 234 番目の塩基が cytosine (C) の場合、制限酵素 *Ban* II により切断され、233 bp と 164 bp の断片が検出され、一方 thymine (T) の場合は切断されずに 397 bp の断片が検出されることが予想された。実験の結果、

C と判断できた個体は、*trnK* 遺伝子の解析結果から *C. phaeocaulis* と同定された 5 個体、i 型の 1 個体、ii 型の 2 個体、iii 型の 1 個体、iv 型の 1 個体の計 10 個体であった。一方、T と判断できた個体は市場品には認められず、参考のために実験に供した中国科学院華南植物研究所華南植物園でご分与いただいた *C. kwangsiensis* (gl) と同定された植物体のみであった。市場品 19 個体では 397 bp、233 bp 及び 164 bp の 3 本の断片が確認され、ヘテロ接合体であった。これらについては 3 本のバンドの濃淡を視覚的に判断して、C>T、C=T、T>C の 3 型に分けた。397 bp の断片に比し、233 bp と 164 bp の断片が濃いものを C>T 型、その反対を T>C 型、ほぼ同等の濃さのものを C=T 型とした。ヘテロ接合体のほとんどが C>T 型 (11 個体) または C=T 型 (4 個体) を示し、T>C 型を示した個体は i 型の 1 個体、*C. kwangsiensis* (gl) と同定された 1 個体、*C. yunnanensis* と相同の配列に 16 bp の挿入があった 1 個体、及び *C. zedoaria* と同定された 1 個体の計 4 個体のみであった。

菝葜の原植物についてこれまで、中国四川省産は *C. phaeocaulis*、広西壮族自治区産は *C. kwangsiensis* の gl タイプと pl タイプ、*C. phaeocaulis* またはそれらの混合品、浙江省産は *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling、日本産は *C. zedoaria* であることを報告している。今回、日本市場に流通している「ガジュツ」について *trnK* 遺伝子の塩基配列を明らかにし、基原を検討した結果、*C. phaeocaulis* または *C. kwangsiensis* (gl) の根茎の単一品に由来する市場品は、検討した中国産 13 市場品のうち 3 市場品のみで、また *C. kwangsiensis* (pl) 由来のものや *C. wenyujin* 由来のものは認められなかった。市場品全体として、*C. phaeocaulis* と *C. kwangsiensis* の gl タイプの根茎が多かったが、これらの配列の 1 塩基または 2 塩基置換体や *C. kwangsiensis* の pl タイプの配列の 1 塩基置換体も認められ、置換部位は上流から 2575 番目のものが多かった。四川省産の市場品では *C. phaeocaulis* の根茎で 18S

rRNA 遺伝子においてホモ接合体、すなわち純系のものが購入できると考えられるが、広西壮族自治区産の市場品には *C. kwangsiensis* (gl) 以外に、*C. phaeocaulis*、i 型 (*C. phaeocaulis* x *C. kwangsiensis* (gl)?)、ii 型 (*C. phaeocaulis* x *C. kwangsiensis* (pl)?)、さらには v 型 (K(gl)A₂₀₀)、vi 型 (AG₂₅₁₁G₂₆₀₂)、*C. yunnanensis* で 16 bp の挿入があるものが認められ、同地では様々な種の交雑が起こり、市場品中に混合されている可能性が考えられた。しかし、葉緑体 *trnK* 遺伝子は母系遺伝をすることを考えると、今回検出された遺伝子多型が交雑の結果であると結論を出すためには更なる検討が必要である。

C.1.1.2.3 精油及びエーテルエキス含量

根茎のスライス品、刻みまたは粉末からなる日本産ガジュツ (TO-3、KE-1、2) から作成した試料の場合、気泡が生じたため、精油含量の正確な測定は不可能であった。修治の施された中国市場品 13 検体では通常通り測定が可能であり、2 個体ともに *C. phaeocaulis* であった GA-4、6 及び *C. kwangsiensis* (gl) であった GA-11 は、精油含量が 1.10 または 1.20 mL/50 g であった。一方、基原または遺伝子型が一致しなかった 10 市場品では 0.30 - 1.35 mL/50.0 g まで変動し、2 市場品で日局 14 の限度値以下であり、また刻み品からなる 3 市場品で低含量であった。各市場品のエーテルエキス含量は 1.04~3.78% を示し、*C. zedoaria* に由来する日本産ガジュツが 3.35~3.78% を示した。一方、精油含量が 0.3~0.5 mL/50.0 g であった中国産ガジュツ 4 市場品は低含量で、とくに GA-10 では 1.04% であった。この検体には *C. kwangsiensis* (gl) のほかに *C. yunnanensis* の配列で 16 bp の挿入が見られる基原種不明の根茎が存在する。これら 4 市場品を除くと、中国産ガジュツ 9 市場品の平均は 3.19% であった。なお、これまでガジュツの基原として報告のない *C. yunnanensis* が認められた GA-9 においても 3.49% を示した。

日局 14 にはガジュツの試験法として精油定量法が規定されている。しかし、本法は加熱加工が施

された中国産ガジュツにのみ適用可能であった。一方、加熱処理をしていない日本産ガジュツでは精油定量法の際に気泡が生じ、正確な測定ができなかった。これに代わる方法としてエーテルエキス含量定量法を行った結果、エーテルエキス含量は精油含量と概ね相関していた。精油定量法が適用できない市場品に関しては本定量法による評価が有効であると考えられる。また、精油含量が 0.5 mL/50.0 g またはそれ以下であった 4 市場品のエーテルエキス含量から、「ガジュツ」のエーテルエキス含量の限度値は 2.5% が妥当であると考えられる。

C.1.3 朮類生薬

Atractylodes の ITS1 領域の塩基配列、および *trnK* 領域の塩基配列に基づいて、蒼朮の基原植物である *A. lancea*、*A. chinensis*、白朮の基原植物である *A. ovata*、*A. japonica* の鑑別サイトを確定した。なお、ITS1 領域では *A. chinensis* と *A. koreana* には塩基配列に差がなく、両種の鑑別はできない。次に、それぞれの領域を含む約 300 bp (ITS1)、500 bp (*trnK*) の断片を増幅し、その塩基配列を解読した。

最初に基原の明確な植物由来の DNA について検討した。その結果 Ts184 と Ts188、Nc101、Nc913、Nc915 では、ITS1 領域および *trnK* 領域の塩基配列タイプはよく一致しており、これらの情報に基づいて鑑別が可能であることが明らかになった。Ts192 では、ITS1 領域の配列タイプは *A. chinensis* または *A. koreana* であり、一方 *trnK* の配列タイプは *A. lancea* であった。これは、*A. chinensis* または *A. koreana* と *A. lancea* との種間雑種であることを示していると推定されるが、ITS1 領域のシーケンス時の波形が *A. lancea* の存在を示しておらず、今後の検討が必要である。さらに、基原未知の検体について、解析を実施した。白朮については、ITS1 および *trnK* の塩基配列タイプはよく一致しており、Nc754、ByaToc3、ByaToc4 はいずれも *A. ovata* を基原とする唐白朮、ByaToc1 と ByaToc2 は *A.*

japonica を基原とする和臼朮であると判定できた。なお、ByaToc1~ByaToc4 に関するこれらの結果は形態学的な鑑別の結果とよく一致していた。

蒼朮については、ITS1 と *trnK* の両タイプからいずれも *A. chinensis* または *A. koreana* と *A. lancea* との種間雑種を基原とするものであると判定された。このことは、市場に流通している蒼朮には、かなりの割合で種間雑種基原のものが存在していることを示している。ただし、さきの Ts192 と同様に、ITS1 のシークエンス波形に *A. lancea* 由来のシグナルがほとんど検出されず、この点については今後の検討が必要である。

以上、遺伝子鑑別法によって蒼朮と白朮を鑑別すること、白朮のうち和臼朮と唐臼朮を鑑別することは ITS1 領域を使用することによって容易に実施できることが明らかになった。蒼朮の基原種の鑑別や雑種の同定に関しては、ITS1 配列では、*A. chinensis* と *A. koreana* の鑑別ができないこと、雑種の場合に固有の波形パターンが検出できないことが問題である。前者については、市場には *A. koreana* を基原とする蒼朮はほとんど流通していないとされていることから問題ではないかもしれない。後者については、今後の詳細な検討が必要である。*TrnK* 遺伝子の配列を用いることは、原理的に雑種の鑑別ができないこと、鑑別ポイントの一つがアデニン (A) の繰り返し数に基づくものであり、正確な数の同定が困難な場合があることや、形質の安定性に問題点があることも考えられる。

C.1.4 半夏、天南星、細辛

調査した半夏および天南星の基原植物の ITS 領域の塩基配列、および Genbank/ EMBL/ DDBJ に登録されている *Pinellia* 属および *Arisaema* 属植物の ITS 領域の塩基配列より、半夏、天南星の原植物を含む *Arisaema*、*Pinellia* 属各種の鑑別に ITS 領域の塩基配列の比較が有効であることが示唆された。ただし、*Arisaema* 属においては未調査の種が多数有り、また種内変異が認められることから、より多くの種、サンプルに基づく調査が必要だと考えられる。また、18 試料中 13 試料について、ITS

領域全体もしくはその一部の塩基配列の決定に成功した。その結果、6 試料は *Arisaema erubescens* と、残り 7 試料は *Pinellia pedatisecta* の ITS 領域の塩基配列にほぼ一致した。

細辛の基原植物について ITS 領域の塩基配列を調査した結果、これらには、以下の 7 タイプのジェノタイプが確認された。(1) *A. sieboldii* タイプ (*A. sieboldii* ウスバサイシン; *A. sieboldii* f. *maculatum* アツバサイシン; *A. dimidiatum*) (2) *A. patens* オオバナサイシンタイプ (3) *A. tohokuensis* タイプ (*A. tohokuensis* ホッコクサイシン; *A. mikuniensis* ミクニサイシン; *A. maruyamae* イズモサイシン) (4) HET (*A. heterotropoides* var. *heterotropoides* オクエゾサイシン) タイプ 1 … HET1 (5) HET (*A. heterotropoides* var. *heterotropoides* オクエゾサイシン) タイプ 2 … HET2 (6) *A. versicolor* (フイリウスバサイシン) タイプ (7) HEM、HES (*A. heterotropoides* var. *mandshuricum* ケイリンサイシン、var. *seoulense* ウスゲサイシン) タイプ。

以上、ITS 塩基配列より各ジェノタイプに属する種の鑑別は可能だが、*A. sieboldii*、*A. dimidiatum* 間、*A. tohokuensis*、*A. mikuniensis* 間、および特に今回の鑑別研究の目的のひとつであったケイリンサイシン (HEM) およびウスゲサイシン (HES) の鑑別については、ITS 領域の塩基配列は有効ではなかった。また、生薬 13 試料中、12 試料について ITS 領域の情報を得ることに成功した。その結果、1 試料はウスバサイシン類ではない *Asarum caulescens* フタバアオイとほぼ一致した。また、別な試料は、*A. versicolor* タイプの塩基配列をもつが、同タイプの遺伝子は HEM、HES 中に浸透していることが示されているため、ここではこれら 3 種のうちのいずれかと判断した。その他のサンプルは、HEM、HES タイプであり、ケイリンサイシン (HEM) またはウスゲサイシン (HES) のいずれかであると鑑定した。

C.2 漢方処方科学の品質保証に関する研究

C.2.1 ビャクジュツ配合処方の指標成分についての検討

HPLC 条件を検討した結果、以下の測定条件で良好な分離ピークが得られた。測定波長：210 nm、カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. x 150 mm, 5mm)、移動相：水・リン酸・アセトニトリルの混合液 (66/1/33)、カラム温度：40℃、流速：1mL/min。リン酸を加えることで、ATN III は妨害物質の影響が無くなり、6 検体すべてにおいて良好な分離ピークとして認められた。また、ソウジュツを配合した苓桂朮甘湯エキスの HPLC 分析でも、ATL III と保持時間が重なるピークは検出されなかった。従ってこの分離条件は ATN III の定量に適用可能と考えられる。

C.2.2 ソウジュツ配合処方指標成分についての検討

HPLC 条件を検討した結果、以下の測定条件で良好な分離ピークが得られた。測定波長：340 nm、カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. x 150 mm, 5mm)、移動相：水・リン酸・アセトニトリルの混合液 (32.4/0.6/67)、カラム温度：40℃、流速：0.8mL/min。また、ピャクジュツを配合した苓桂朮甘湯エキスの HPLC 分析でも、ATDN と保持時間が重なるピークは検出されなかった。従ってこの分離条件は ATDN の定量に適用可能と考えられる。

C.2.3 チンピ配合処方指標成分についての検討

Hesperidin の純度は、NMR およびキラルカラムを用いた HPLC により確認できることが今回明らかとなった。NMR データによる diastereomer の相対比は、hesperidin (2S 体) 90%程度のもものが 2 検体、81%が 1 検体、74%が 1 検体、60-66%のもものが 9 検体であった。旋光度については、純度の高いものほど値が高いという傾向がみられた。また HPLC では、通常繁用されている ODS カラムを用いて HPLC 条件を検討したが、hesperidin の diastereomer は分離されなかった。次にキラルカラムを用いて検討した所、以下の測定条件で良好な分離ピークが得られた。測定波長：284 nm、カラム：Chiralpak IA (4.6 mm i.d. x 250 mm, 5mm)、移動相：0.13%TFA を含む、ヘキササン・エタノールの混合液 (hesperidin のみ：60/40、チンピ、六君子湯および釣藤散：70/30、補中益気湯：75/25)、

カラム温度：40℃、流速：0.8mL/min。

本条件を用いて、HPLC 分析を行い、市販品を含む入手した hesperidin (2S 体) の純度及び diastereomer の相対比を調べた。その結果、入手したサンプルの diastereomer を合わせた純度は 92-99%であったが、hesperidin (2S 体) のみの純度は 57-87%であった。一方、diastereomer の相対比は、hesperidin (2S 体) 92%が 1 検体、86-87%が 2 検体、74%が 1 検体、59-65%が 9 検体であった。また、チンピ 7 検体中の diastereomer の相対比は、hesperidin (2S 体) が 95%以上であり、2R 体はごく僅かであった。さらに、六君子湯 8 検体中では、hesperidin (2S 体) 67%が 1 検体、73-80%が 4 検体、82-87%が 3 検体であった。釣藤散 3 検体中では、hesperidin (2S 体) 84%が 1 検体、92%が 2 検体であった。補中益気湯 10 検体中では、hesperidin (2S 体) 52-54%が 2 検体、64-70%が 4 検体、73-77%が 3 検体、84%が 1 検体であった。

チンピ中の hesperidin (2S 体) 含量は、25.5-54.8 mg/g (2.55-5.48%) であり、2R 体は 0.7-1.5 mg/g (0.07-0.15%) であった。次に漢方処方では、六君子湯中の hesperidin (2S 体) 含量は、3.2-7.6 mg/g (0.32-0.76%) であり、2R 体は 0.8-1.8 mg/g (0.08-0.18%) であった。釣藤散の hesperidin (2S 体) 含量は、5.1-5.8 mg/g (0.51-0.58%) であり、2R 体は 0.5-1.1 mg/g (0.05-0.11%) であった。補中益気湯中の hesperidin (2S 体) 含量は、1.5-6.0 mg/g (0.15-0.60%) であり、2R 体は 0.9-2.7 mg/g (0.09-0.27%) であった。以上の結果から、上記の方法により、hesperidin はチンピ配合処方指標成分として適用可能と考えられた。しかし、チンピ中の diastereomer の相対比は 2S 体が 95%以上であったのに対して、市販品を含め入手した hesperidin サンプルおよび漢方エキス剤の場合、2R 体の相対比が最大 48%まで増加していた。一般的に、天然のフラバノン配糖体は 2S 配置であることが報告されているが、hesperidin はアルカリ条件下で簡単にアグリコン部の 2 位が S 体から R 体に変換することが知られている。そこで、市販の hesperidin に水を加えて

加熱し、各時間ごとの diastereomer の相対比の変化を調べた。その結果、時間経過と共に、2R 体の相対比が増加し、2 時間後には 2R 体が 56% になった (Table 7)。また、チンピの場合でも、同様に 2R 体の相対比が増加し、1 時間後には 2R 体が 38% になった。以上の結果から、市販の hesperidin は、チンピから抽出・精製する過程で一部 2S 体から 2R 体に変換したため、2R 体の相対比が増加したと考えられる。また、漢方エキス剤については、煎じる過程で一部 2S 体から 2R 体に変換したため、2R 体の相対比が増加したと考えられる。

次に、他のフラバノン配糖体についても HPLC による diastereomer の分離条件を検討した。narirutin、neohesperidin は以下の測定条件で良好な分離ピークが得られたが、naringin は完全に分離しなかった。測定波長：284 nm、カラム：Chiralpak IA (4.6 mm i.d. x 250 mm, 5mm)、移動相：0.13%TFA を含む、ヘキサン・エタノールの混合液 (narirutin: 70/30, neohesperidin: 75/25)、カラム温度：40℃、流速：0.8mL/min。

市販の narirutin の相対比は、2S 体が 50% であり、neohesperidin は 2S 体が 84% であった。また、チンピ 7 検体中の narirutin の相対比は、2S 体が 61-78% であり、hesperidin (2S 体 95% 以上) と比較して少ないことが明らかとなった。このように、フラバノン配糖体の diastereomer の相対比の違いは、アグリコン部のラセミ化が影響しており、このラセミ化の起こりやすさにはアグリコン部の置換基の違いが関与していると考えられる。即ち、hesperidin や neohesperidin はアグリコンの 4' 位にメトキシ基を持つことから、quinoxyl 構造をとることが出来ず、その結果 2 位のラセミ化が起こりにくいと考えると、hesperidin の 2R 体は narirutin よりも少ないことが合理的に説明できる。

C.2.4 漢方処方エキス品質評価法の検討

検討の結果、補中益気湯中ヘスペリジンの HPLC による定量法を以下のように設定し、公的な漢方処方エキスの品質評価法である日本薬局方 (日局) 試験法案とした。

本品約 0.1g を精密に量り、薄めたテトラヒドロ

フラン (1→4) 50mL を正確に加えて (30 分間) 振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に成分含量測定用ヘスペリジン (シリカゲル、24 時間乾燥) 約 10mg を精密に量り、薄めたメタノール (1→2) に溶かして正確に 100mL とする。この液 1mL を正確に量り、薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 10mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。それぞれの液のヘスペリジンのピーク面積 AT 及び AS を測定する。ヘスペリジン (C₂₈H₃₄O₁₅) の量 (mg) = 成分含量測定用ヘスペリジンの量 (mg) × AT / AS × 1/20。試験条件は以下の通りである。検出器：紫外吸光度計 (測定波長：280nm)；カラム：内径 4.6mm、長さ 15cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。；カラム温度：50℃ 付近の一定温度；移動相：水/アセトニトリル/メタノール混液 (25 : 4 : 1)；流量：1.0mL/分 (ヘスペリジンの保持時間約 15 分)。

小青竜湯中カンキョウの確認試験法としては、[6]-ショーガオールを指標とした TLC 法を以下のように設定し、日局試験法案とした。

本品 1.0g をとり、水 10mL を加え振り混ぜた後、ジエチルエーテル 25mL を加え振り混ぜる。ジエチルエーテル層を分取し、減圧下で溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテル 2mL を加え試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用 [6]-ショーガオール 1mg をとり、メタノール 1mL を加えて溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液 20 μ L 及び標準溶液 1 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。シクロヘキサン/酢酸エチル混液 (2 : 1) を展開溶媒として約 10cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに噴霧用 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を均等に噴霧し、105℃、5 分間加熱した後、放冷するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち、1 個のスポットは標準溶液から得た青緑色のスポットと色調及び R_f 値が等

しい。

ビャクジュツを配合した苓桂朮甘湯の定量試験法として、ATLⅢを指標とした C.2.1 で確立した HPLC 法について、さらに研究班の各社で検討を行った。その結果、現段階では、各メーカーの品質保証で使用する汎用カラムでは、ATLⅢとジュツ以外の生薬由来と考えられる妨害ピークとの完全分離が難しいことが判明した。また、十分なバリデーションは行なえなかったが、苓桂朮甘湯エキス中 ATLⅢの含量を検討したところ、11 ロットの平均含量 0.625mg/g. 標準偏差 0.233mg 相対標準偏差 37.3%の結果であり、ロット間に比較的大きなバラツキが見られた。使用原料中の ATLⅢ含量との比較ができていないが、このバラツキは、製造工程においてアトラクチロンが自動酸化し ATLⅢが生じたことに由来する可能性が考えられた。

ソウジュツ配合の苓桂朮甘湯の定量試験法として、C.2.2 で確立した ATDN を指標成分とした HPLC 法について、研究班の各社でさらに検討を行った。その結果、エキス粉末 10 ロットについて各ロット 3 回繰り返して分析したところ、10 検体の平均値は 0.164 (mg/g)でかなり少ない含量であることが判明した。また、同一ロット内では、繰り返し分析における定量値のバラツキは小さいが(相対標準偏差 1.82%以下)、ロット間では定量値のバラツキは大きかった(相対標準偏差 30.9%)。次に、成分含量測定用試薬とする ATDN の供給について重要な要因となる、安定性について検討を行った。その結果、ATDN は、5℃以下の保存条件で、次第に微褐色から褐色、さらに黒色に変色し、容易に酸化・重合等が生じるものと考えられた。また、溶液下の実験では、室温 8 日間で、40%程度が他物質に変化することが明らかとなった。従って、安定性の面で試薬としての販売に難点があり、今後の検討が必要なことが明らかとなった。

D. 結論

生薬の遺伝子鑑別法の開発を目的に、シゴカ、*Curcuma* 属生薬、朮類生薬、半夏、天南星、細辛の核 rDNA 及び葉緑体 *trnK* 遺伝子領域の塩基配

列解析を行い、上記生薬の基原種の鑑定に遺伝子解析が有用であることを明らかにした。しかし、シゴカ、ガジュツの遺伝子解析に nested PCR を使用しており、より簡便かつ安定性のある鑑別法の確立には、nested PCR を必要としない、高純度、高品質な DNA の調製法の開発が必要と考えられた。

また、漢方処方の方の科学的品質保証として、処方中のチンピ、ビャクジュツ、ソウジュツの化学分析法を検討し、hesperidin、ATLⅢ、ATDN を指標とした分析法を提案した。次いで、処方中に含まれる heseridin が、epi 体との diastereomer 混合物であることを明らかにした。さらに、漢方処方エキスについて日本薬局方の試験法案として適切であるか検討を行い、補中益気湯中の hesperidin の定量法を試験法案として示した。他方、ATLⅢ、ATDN の定量法は、引き続き検討が必要なことが明らかとなった。また別に、小青竜湯中カンキョウの確認試験法としては、[6]-ショーガオールを指標とした試験法を確立した。

E. 研究発表 論文発表等

- 1) Uchiyama, N., Kim, I. H., Kawahara, N., Goda, Y., HPLC separation of hesperidin and the C-2 epimer in commercial hesperidin samples and herbal medicines. Chirality, accepted (2005).
- 2) Yamamoto, K., et al., Assay of Ginsenoside Rg1 and Ginsenoside Rb1 in Ginseng and Red Ginseng by High-Performance Liquid Chromatography. Iyaku-hin Kenkyu, accepted (2005).
- 3) Sato, M., Anetai, M., Goda, Y., Analysis of organophosphorus pesticide residues in crude drugs. Iyaku-hin Kenkyu, **36**, 83-97 (2005).
- 4) Yomura, K., Nakamura, Y., Ishimatsu, M., Kikuchi, Y., Hashimoto, K., Sakakibara, I., Terabayashi, S., Higuchi, M., Amagaya, S.,

Aburada, M., Okada, M., Kondo, S., Arimoto, K., Aimi, N., Goda, Y., Sekita, S., Satake, M., Assay of total alkaloids in Uncaria Thorn by HPLC. *Iyakuhin Kenkyu*, **35**, 143-165 (2004).

- 5) 水上 元「天然薬物素材の遺伝子鑑別」バイオサイエンスとバイオインダストリー **62** (11) 31-34 (2004).

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

学会発表

- 1) 内山奈穂子、川原信夫、合田幸広「ビャクジュツ、チンピ、トウヒ配合処方 of 指標成分について」日本生薬学会第 51 回年会（神戸、2004 年 9 月）
- 2) 内山奈穂子、川原信夫、合田幸広「ソウジュツ、チンピ配合処方 of 指標成分について」日本薬学会題 125 年会（東京、2005 年 3 月）
- 3) 佐々木陽平、佐々木聡子、伏見裕利、南雲清二、合田幸広、小松かつ子「ガジュツ及びウコンの試験法に関する研究」日本生薬学会第 51 回年会（神戸、2004 年 9 月）
- 4) 佐々木聡子、小松かつ子、佐々木陽平、南雲清二、伏見裕利、合田幸広「日本市場に流通するガジュツの基原—trmK 遺伝子の塩基配列—」日本生薬学会第 51 回年会（神戸、2004 年 9 月）
- 5) 近藤健児「生薬の DNA 鑑別」第 16 回生薬漢方製剤の微生物および異物対策ならびに品質管理に関するシンポジウム（大阪、2004 年 12 月）
- 6) 司馬真央、近藤健児、三木栄二、山路弘樹、稲垣伸行、寺林進、油田正樹、「nrDNA, ITS 塩基配列による朮類生薬の基原鑑別」日本生薬学会第 51 回年会（神戸、2004 年 9 月）
- 7) 司馬真央、近藤健児、山路弘樹、三木栄二、稲垣伸行、寺林進、油田正樹「オケラ *Atractylodes japonica* の ITS に認められる塩基の重なりは分類学的に何を意味しているのか？」日本植物分類学会 第 4 回大会（高知、2005 年 3 月）