

図9 m/z 291.16 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル

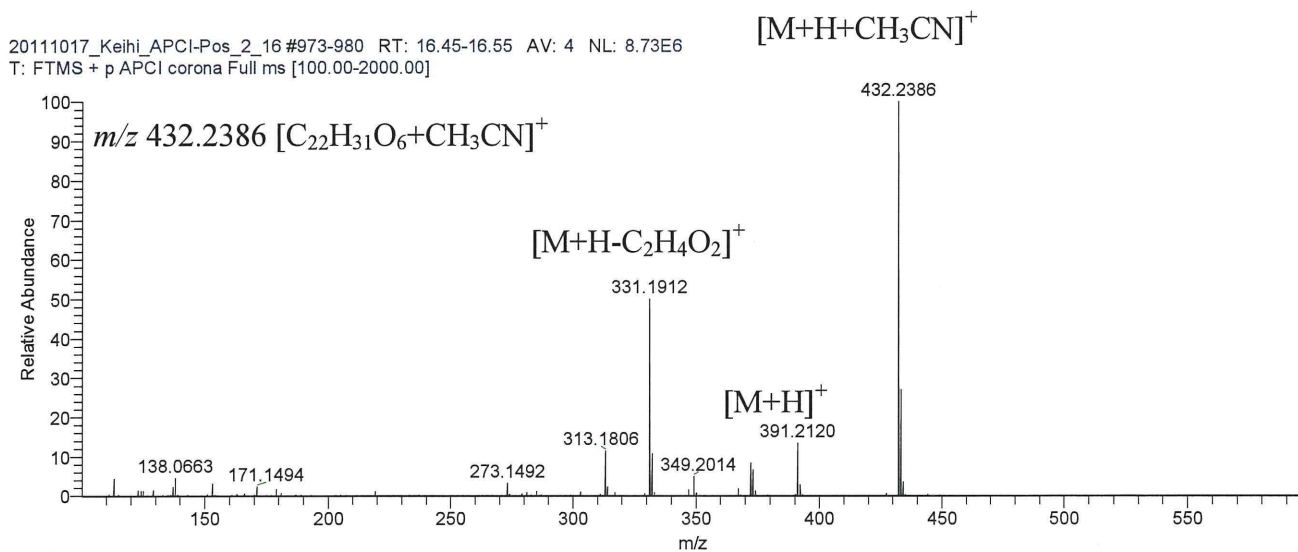


図10 ピーク 3 (r.t. 16.5 min) のマススペクトル

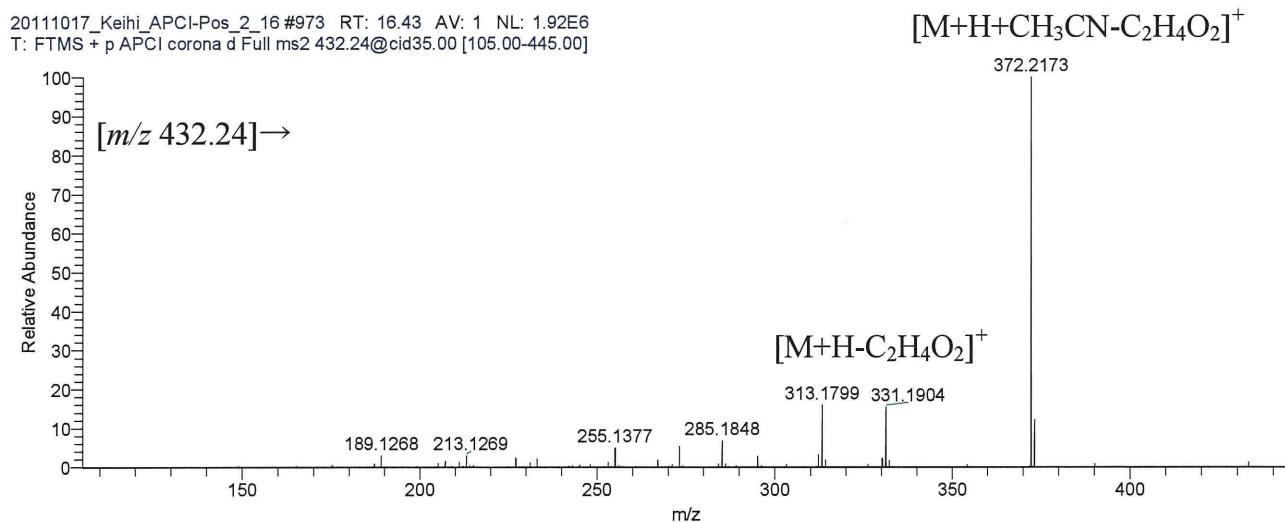


図11 m/z 432.24 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル

20111017_Keihi_APCI-Pos_2_16 #1032-1035 RT: 17.42-17.46 AV: 3 NL: 8.11E7
T: FTMS + p APCI corona Full ms [100.00-2000.00]

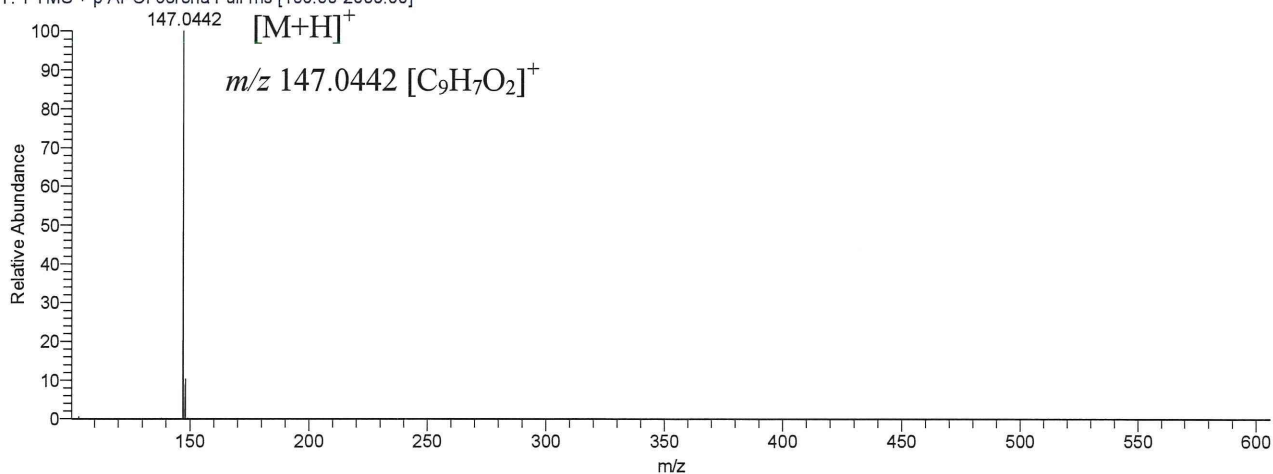


図 12 ピーク 4 (r.t. 17.5 min) のマススペクトル

20111017_Keihi_APCI-Pos_2_16 #1040 RT: 17.53 AV: 1 NL: 2.45E6
T: FTMS + p APCI corona d Full ms2 147.04@cid35.00 [50.00-160.00] $[M+H-CO_2]^+$

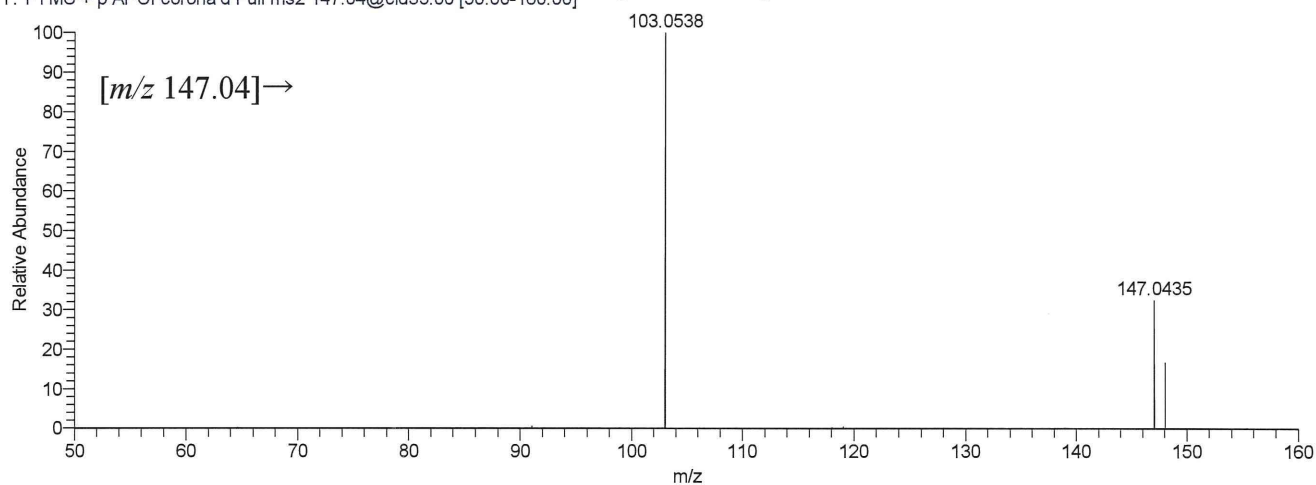


図 13 m/z 147.04 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル

20111017_Keihi_APCI-Pos_2_16 #1258-1261 RT: 21.21-21.24 AV: 2 NL: 7.46E7
T: FTMS + p APCI corona Full ms [100.00-2000.00]

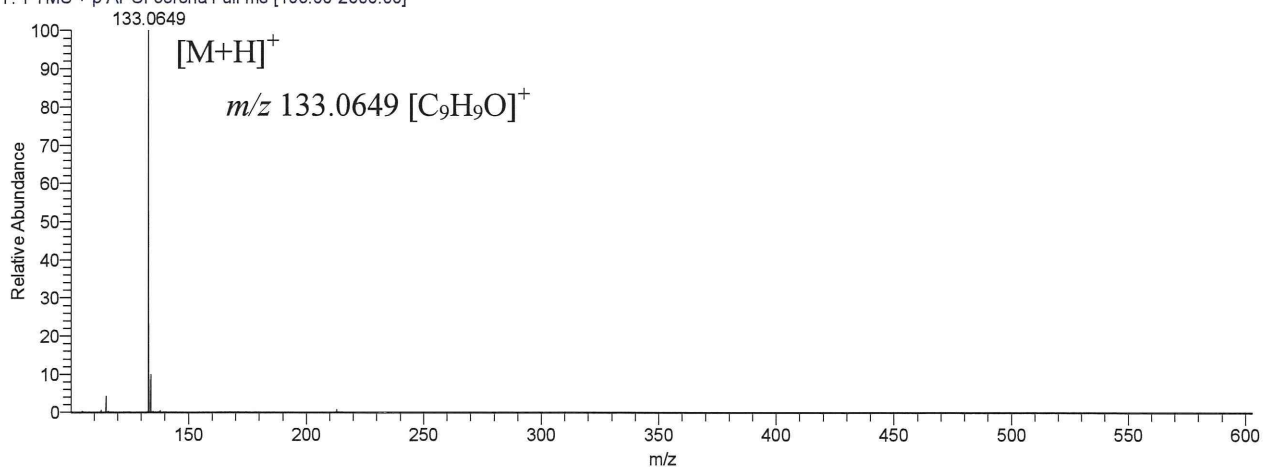


図 14 ピーク 5 (r.t. 21.2 min, cinnamaldehyde) のマススペクトル

20111017_Keihi_APCI-Pos_2_16 #1264 RT: 21.28 AV: 1 NL: 1.30E7
T: FTMS + p APCI corona d Full ms2 133.06@cid35.00 [50.00-145.00]

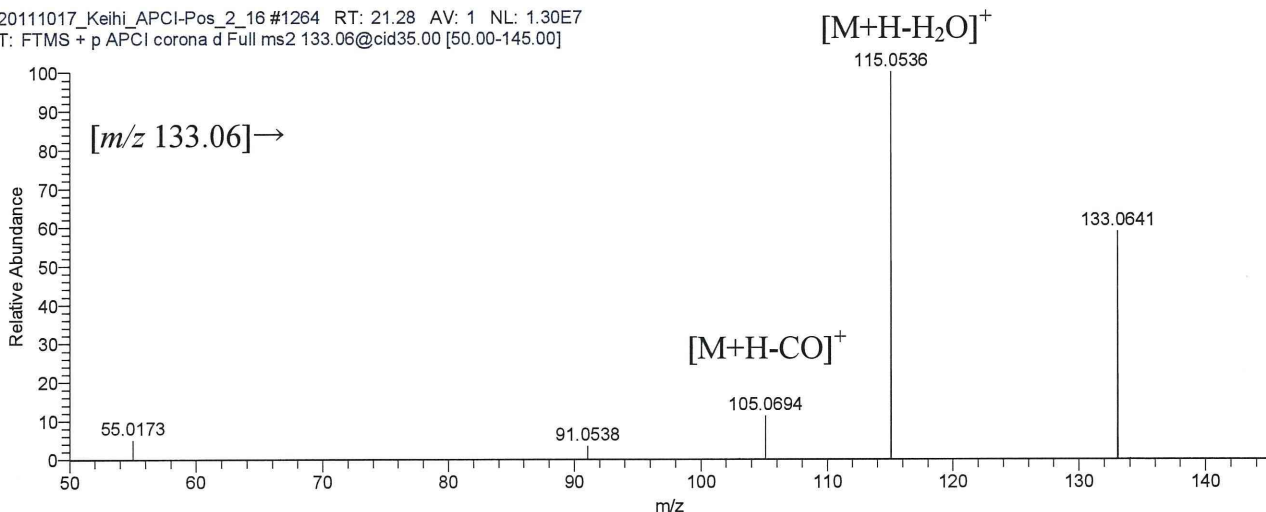


図 15 m/z 133.06 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル

20111017_Keihi_APCI-Pos_2_16 #1367-1371 RT: 23.00-23.07 AV: 3 NL: 2.34E7
T: FTMS + p APCI corona Full ms [100.00-2000.00]

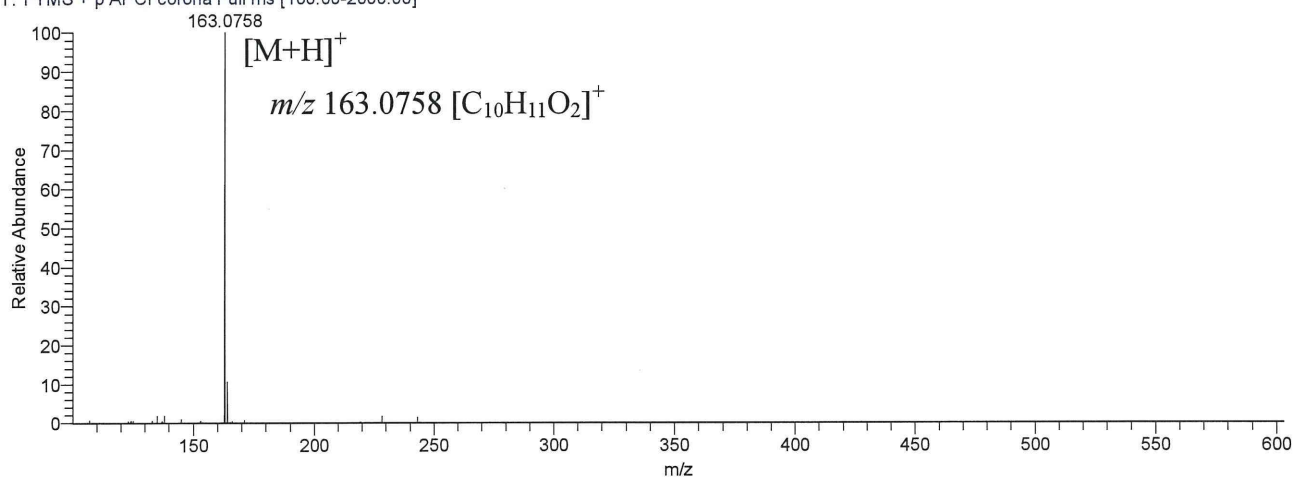


図 16 ピーク 6 (r.t. 23.0 min) のマススペクトル

20111017_Keihi_APCI-Pos_2_16 #1376 RT: 23.15 AV: 1 NL: 1.19E6
T: FTMS + p APCI corona d Full ms2 163.08@cid35.00 [50.00-175.00]

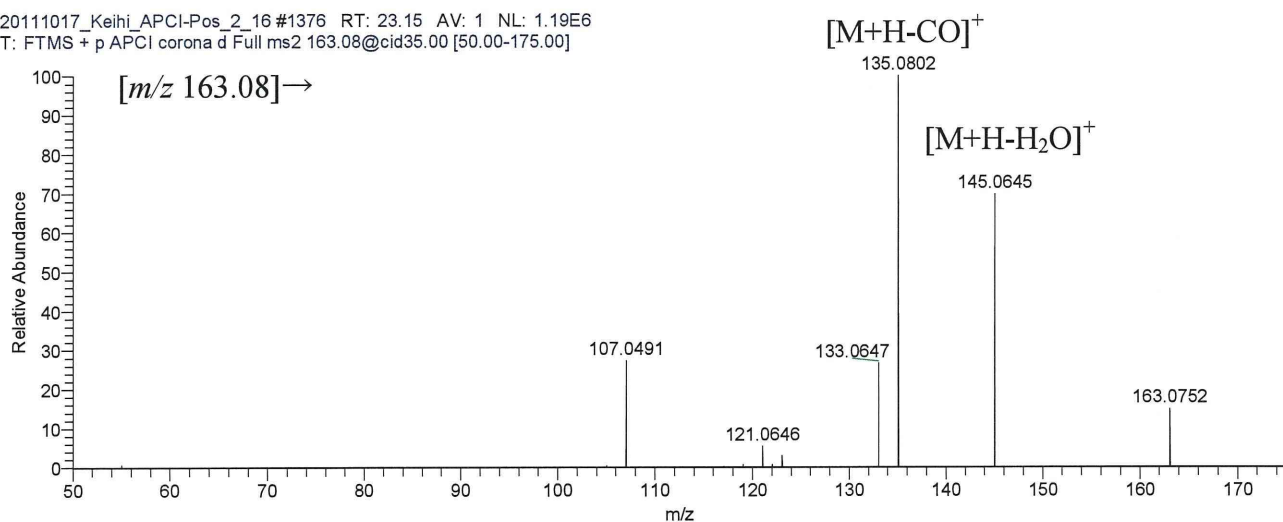
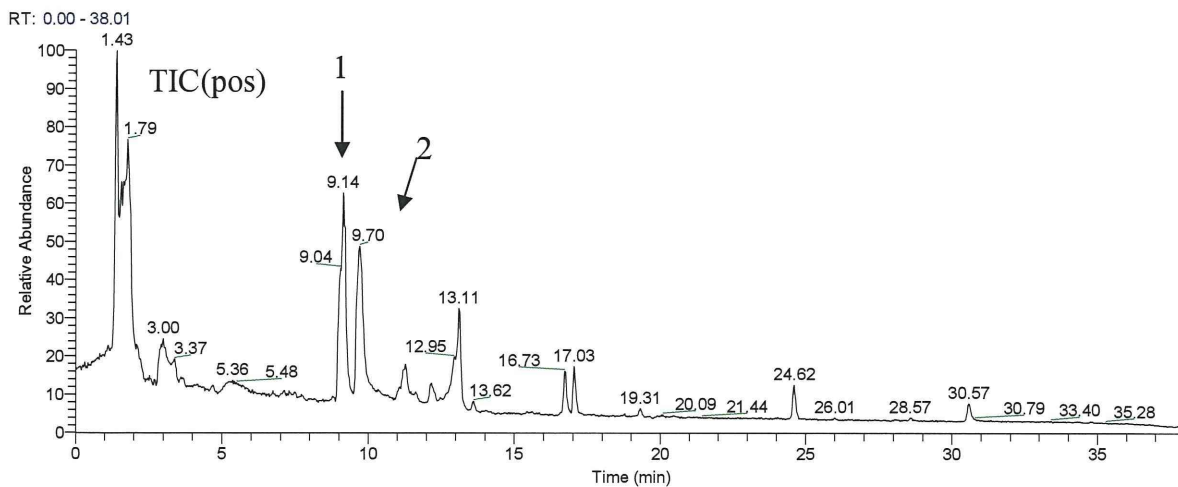
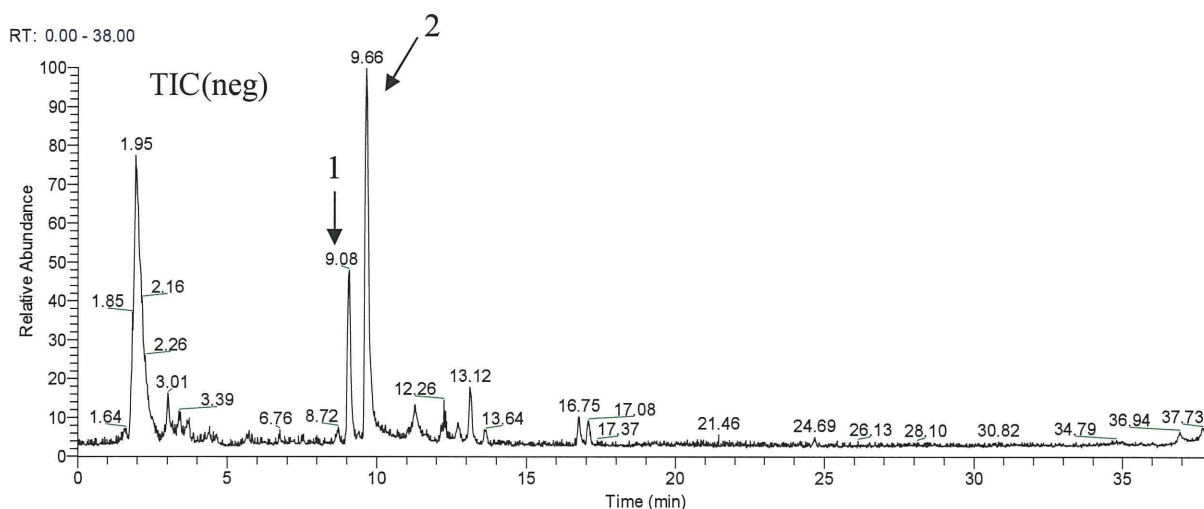


図 17 m/z 163.08 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル



NL: 4.39E8
 TIC F: FTMS + p
 ESI Full ms
 [100.00-2000.00]
 MS
 20110608_Shakuyak
 u_Pos-1_11

図 18 シャクヤクの ESI ポジティブモードによる全イオンクロマトグラム



NL: 2.42E8
 TIC F: FTMS - p
 ESI Full ms
 [100.00-2000.00]
 MS
 20110608_Shakuyak
 u_Neg-1_12

図 19 シャクヤクの ESI ネガティブモードによる全イオンクロマトグラム

20110608_Shakuyaku_Pos-1_12 #755-773 RT: 8.99-9.18 AV: 9 NL: 4.18E7
 T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

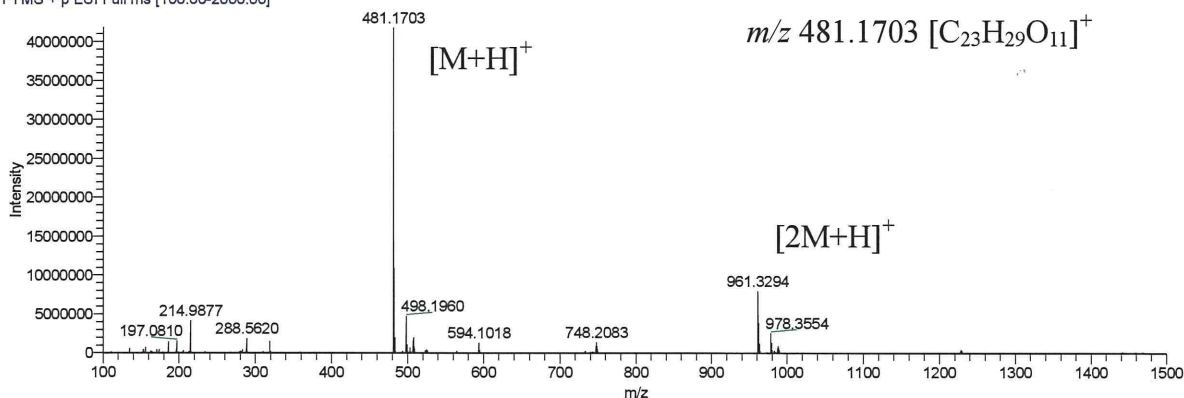


図 20 ピーク 1 (r.t. 9.1 min) のマススペクトル (ポジティブモード)

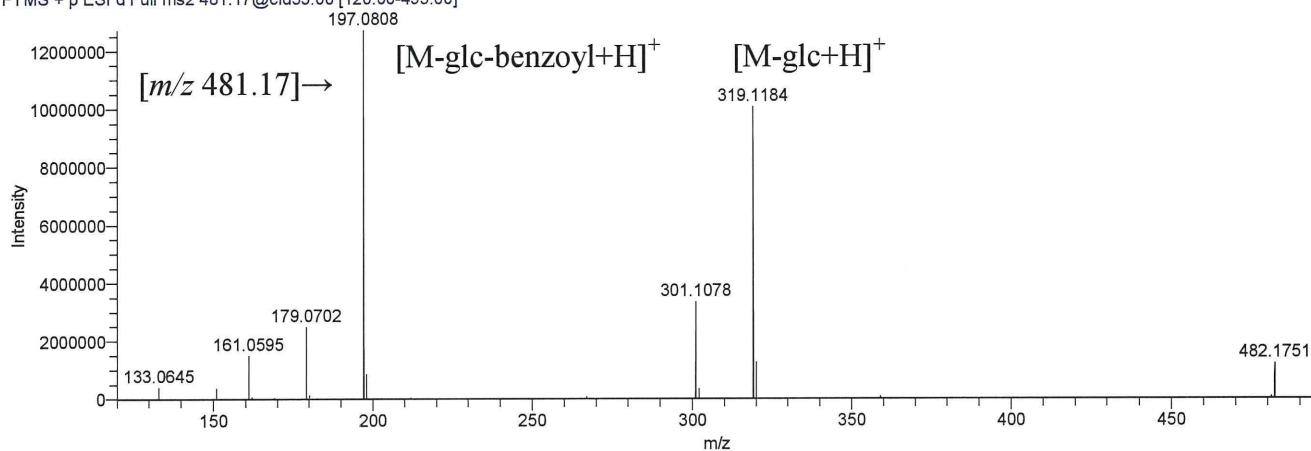


図 21 m/z 481.17 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル

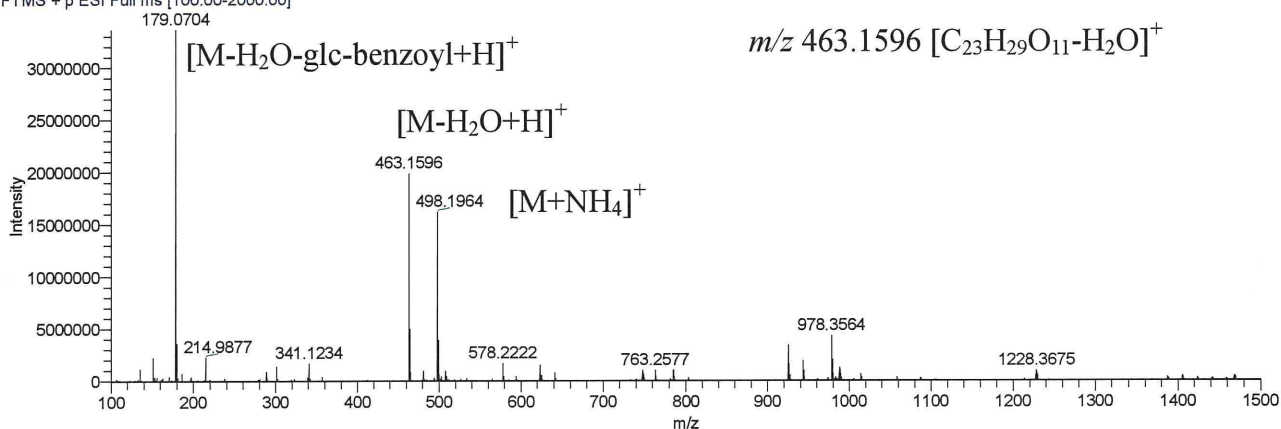


図 22 ピーク 2 (rt. 9.7 min) のマススペクトル (ポジティブモード)

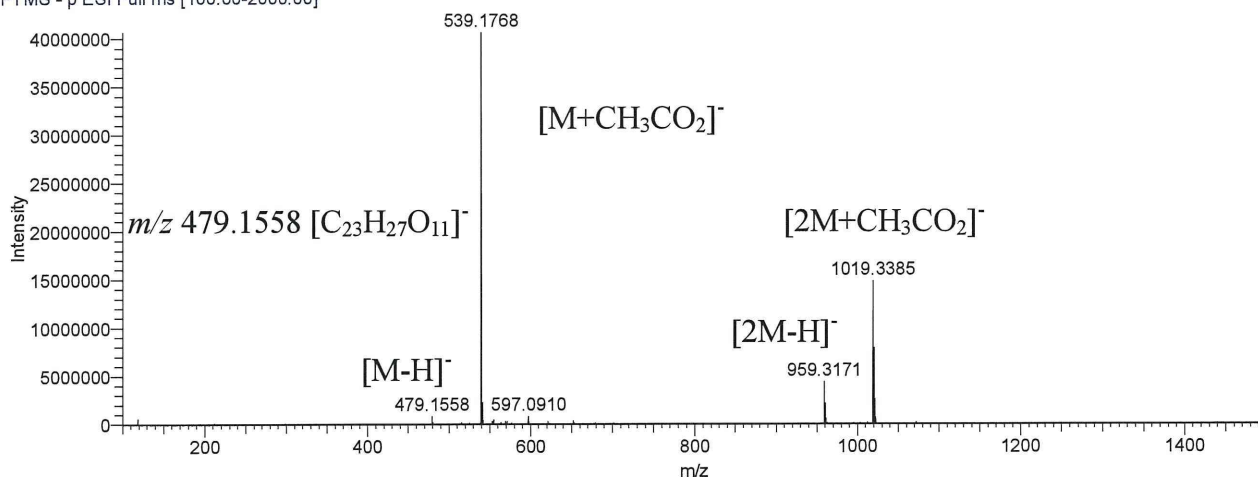


図 23 ピーク 1 (rt. 9.1 min) のマススペクトル (ネガティブモード)

20110608_Shakuyaku_Neg-1_12 #863 RT: 9.07 AV: 1 NL: 5.14E5
T: FTMS -p ESI d Full ms2 479.16@cid35.00 [120.00-490.00]

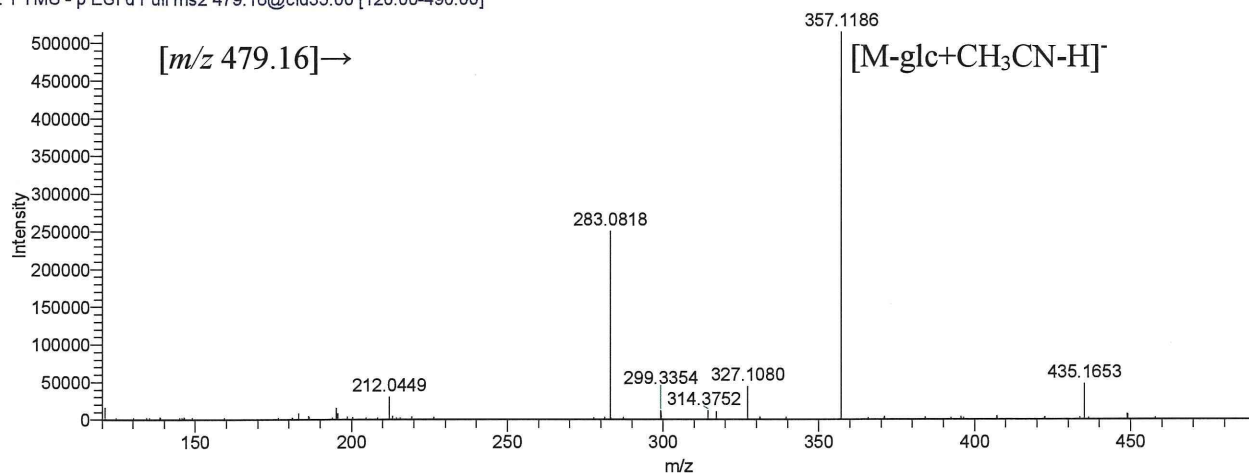


図 24 m/z 479.16 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル

20110608_Shakuyaku_Neg-1_12 #915-920 RT: 9.64-9.68 AV: 3 NL: 5.72E7
T: FTMS -p ESI Full ms [100.00-2000.00]

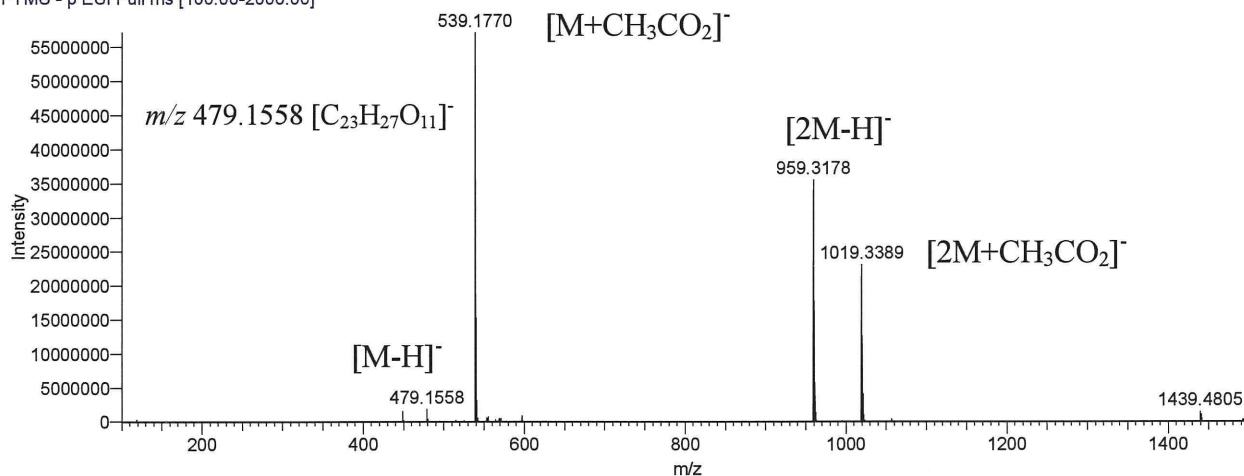


図 25 ピーク 2 (r.t. 9.7 min) のマススペクトル (ネガティブモード)

20110608_Shakuyaku_Neg-1_12 #915 RT: 9.63 AV: 1 NL: 3.89E6
T: FTMS -p ESI d Full ms2 479.16@cid35.00 [120.00-490.00]

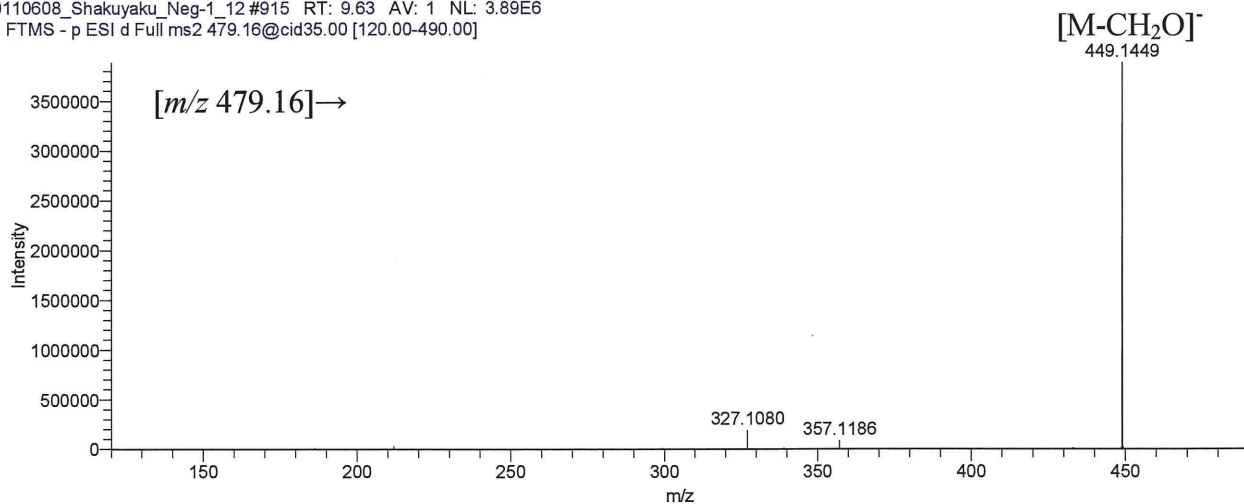


図 26 m/z 479.16 をプリカーサーイオンとしたマススペクトル

表 1

RT	m/z	組成	フラグメント
1.86	239.0763	C8H15O8	179.0555(1.80E7; 100, C6H11O6)
	179.0556	C6H11O6	161.0450(1.07E6; 100, C6H9O5), 141.0189(10, C6H5O4)
1.98	401.1289	C14H25O3	
	151.0608	C5H11O5	151.0608(1.89E6; 100), 133.0502(20, C5H9O4), 131.0346(25, C5H7O4), 113.0242(20, C5H5O3), 101.0243(25, C4H5O3)
2.04	313.113	C11H21O10	253.0922(3.90E6; 100, C9H17O8)
	253.0921	C9H17O8	253.0920(80), 179.0554(25, C6H11O6), 161.0450(4.86E5; 100, C6H9O5), 143.0344(20, C6H7O4), 113.0241(15, C5H5O3), 101.0243(12, C4H5O3)
2.17	429.1603	C16H29O13	369.1389(1.13E6; 100, C14H25O11)
	383.1185	C14H23O12	
2.37	243.0863	C11H15O6	195.0656(1.59E5; 100, C10H11O)
3.42	173.0449	C7H9O5	155.0346(2.16E5; 100, C7H7O4), 143.0345(20, C6H7O4), 137.0240(20, C7H5O3), 111.0450(30, C6H7O2)
4.39	243.0863	C11H15O6	195.0657(1.31E5; 100, C10H11O)
4.87	243.0863	C11H15O6	195.0656(3.30E5; 100, C10H11O)
5.24	195.0503	C6H11O7	195(40), 177.0401(15, C6H9O6), 159.0296(10, C6H7O5), 129.0190(1.24E7; 100, C5H5O4)
5.87	589.2837	C28H45O13	529.2632(3.60E5; 100, C26H41O11)
	389.1435	C17H25O10	
5.91	589.2839	C28H45O13	529.2634(8.91E4; 100, C26H41O11), 511.2528(85, C26H39O10), 493.2422(50, C26H37O9)
6.22	605.2788	C28H45O14	545.2579(7.44E4; 100, C26H41O12)
6.56	521.1853	C22H33O14	461.1648(3.00E5; 100, C20H29O12)
6.63	389.1437	C17H25O10	329.1230(1.29E5; 100, C15H21O8)
	329.1228	C15H21O8	
6.97	561.253	C26H41O13	543.2426(7.51E4; 100, C26H39O12), 525.2319(10, C26H37O11), 399.1643(60, C19H27O9), 381.1901(25, C20H29O7), 363.1798(7, C20H27O6), 279.1226(5, C15H19O5), 219.1017(15, C13H15O3)
	7.04	507.1701	C21H31O14
7.24	389.1437	C17H25O10	329.1230(5.33E5; 100, C15H21O8)
7.31	521.1856	C22H33O14	461.1648(3.83E5; 100, C20H29O12)
	461.1646	C20H29O12	329.1228(5.04E4; 100, C15H21O8), 293.0866(70, C11H17O9), 275.0760(10, C11H15O8), 251.0761(10, C9H16O8), 233.0656(20, C9H13O7), 191.0553(30, C7H11O6), 149.0450(20, C5H9O5)
7.5	561.2525	C26H41O13	
7.52	399.2003	C20H31O8	381.1901(7.49E4; 100, C20H29O7), 363.1795(20, C20H27O6), 351.1795(10, C19H27O6), 333.1692(25, C19H25O5), 315.1588(5, C19H23O4)
7.76	507.17	C21H31O14	447.1488(1.37E6; 100, C19H27O12)
7.86	561.2527	C26H41O13	543.2428(71.74E5; 100, C26H39O12), 525.2321(5, C26H37O11), 399.2006(10, C20H31O8), 381.1901(5, C20H29O7), 363.1797(25, C20H27O6)
8.16	537.18	C22H33O15	477.1595(2.94E5; 100, C20H29O13)
	397.1334	C15H25O12	337.1129(1.45E5; 100, C13H21O10), 319.1022(5, C13H19O9)
8.71	537.1805	C22H33O15	477.1595(1.56E6; 100, C20H29O13), 293.0867(5, C11H17O9)
8.84	399.2011	C20H31O8	381.1904(2.27E6; 100, C20H29O7), 363.1802(4, C20H27O6), 351.1802(3, C19H27O6), 333.1697(7, C19H25O5)
	8.95	461.1648	C20H29O12
9.29	461.1648	C20H29O12	401.1440(4.00E5; 100, C18H25O10)
	319.1173	C17H19O6	271.0965(3.61E5; 100, C16H15O4)

9.42 329.1228 C15H21O8 269.1022(1.92E5; 100, C13H17O6)
 9.83 579.2638 C26H43O14 519.2427(8.81E5; 100, C24H39O12)
 10.03 459.1492 C20H27O12 459(9.60E5; 100), 165.0551(65, C9H9O3)
 10.1 543.2428 C26H39O12 525.2320(20, C26H37O11), 507.2214(15, C26H35O10), 489.2110(10, C26H33O9), 455.1904(5, C22H31O10), 381.1901(15, C20H29O7), 363.1797(6.60E4; 100, C20H27O6), 345.1693(7, C20H25O5), 327.1588(10, C20H23O4), 283.1691(12, C19H23O2)
 10.47 447.2218 C21H35O10 387.2007(1.48E6; 100, C19H31O8)
 10.57 327.1071 C15H19O8 327(10), 165.0551(4.13E6; 100, C9H9O3)
 10.71 469.1908 C19H33O13 409.1700(7.31E5; 100, C17H29O11)
 11.05 515.1899 C27H31O10 497.1794(5, C27H29O9), 467.1693(1.71E5; 100, C26H27O8), 373.1276(10, C20H21O7), 319.1171(20, C17H19O6), 299.0911(5, C17H15O5), 271.0964(40, C16H15O4)
 11.29 515.1904 C27H31O10 467.1685(70, C26H27O8), 319.1170(40, C17H19O6), 271.0964(3.81E4; 100, C16H15O4), 195.0652(15, C10H11O4)
 11.39 441.2111 C22H33O9 381.1903(6.21E5; 100, C20H29O7)
 11.56 325.0916 C15H17O8 363.1798(10, C20H27O6), 345.1692(5, C20H25O5), 333.1695(3.30E5; 100, C19H25O5), 289.1797(5, C18H25O3), 271.1693(20, C18H23O2), 263.1278(15, C15H19O4), 249.1485(10, C15H21O3), 219.1017(5, C13H15O3), 189.0913(10, C12H13O2), 167.1071(20, C10H15O2)
 11.63 457.2064 C22H33O10 163.0394(4.76E5; 100, C9H7O3), 119.0498(5, C8H7O)
 11.76 397.1853(4.93E5; 100, C20H29O8)
 11.86 379.1747(2.02E5; 100, C20H27O7), 361.1639(20, C20H25O6), 311.1123(50, C15H19O7), 293.1017(30, C15H17O6), 237.1120(20, C13H17O4), 219.1016(30, C13H15O3), 181.0862(5, C10H13O3), 141.0551(10, C7H9O3)
 12.2 579.2637 C26H43O14 519.2422(1.27E6; 100, C24H39O12)
 12.47 295.1176 C15H19O6
 12.57 443.2272 C22H35O9 383.2060(8.09E6; 100, C20H31O7)
 12.98 383.2063 C20H31O7 383(2.02E6; 100), 365.1960(20, C20H29O6), 347.1854(5, C20H27O5), 329.1749(5, C20H25O4), 303.1957(5, C19H27O3), 285.1852(20, C19H25O2), 243.1019(10, C15H15O3), 221.1176(7, C13H17O3), 203.1071(10, C13H15O2)
 13.12 487.1803 C22H31O12 427.1591(1.05E6; 100, C20H27O10), 293.0864(5, C11H17O9)
 13.19 427.1594 C20H27O10 293.0867(5.83E5; 100, C11H17O9), 233.0657(3, C9H13O7), 191.0553(3.5, C7H11O6), 149.0451(3.5, C5H9O5)
 13.49 489.196 C22H33O12
 13.57 487.1806 C22H31O12 427.1593(1.37E6; 100, C20H27O10)
 13.98 181.0498 C9H9O4 166.0267(1.19E6; 100, C8H6O4)
 14.12 561.2531 C26H41O13 501.2324(2.73E5; 100, C24H37O11), 311.0972(40, C11H19O10), 293.0866(5, C11H17O9)
 14.19 389.1226 C20H21O8
 14.49

表2 シャクヤクの測定値(neg) その1

r.t.	<i>m/z</i>	組成推定	
1.9	179.0560	C6H11O6	161.0455, 149.0455, 143.0350 (base), 131.0350, 125.0244, 119.0351, 113.0246, 101.0248, 89.0249
2.0	537.1669	C18H33O18	212.0463, 195.0507 (base)
	845.2767	C30H53O27	503.1612 (base), 341.1084
	1025.3395	C36H65O33	683.2244 (C24H4320), 341.1086 (C12H21011), 281.0874, 212.0394, 179.0560 (C6H11O6), 161.0455, 143.0349, 113.0246
	1078.2512	C43H52O31N	736.1359 (C31H30O20N), 574.0827, 556.0724, 514.0618, 484.0512, 454.0409
2.4	537.1661	C18H33O18	
3.0	435.1503	C18H27O12	375.1291 (base), 345.1185, 212.0434
3.2	331.0664	C13H15O10	
3.4	185.0090	C7H5O6	166.9986 (base), 141.0195
	373.0408	C14H13O12	343.1031, 169.0141 (base, C7H5O5)
	435.1503	C18H27O12	375.1292 (base)
3.6	331.0665	C13H15O10	271.0453 (base), 241.0348, 169.0140
	419.1553	C17H23O12	359.1345 (base), 197.0818
	493.1193	C19H25O17	331.0667, 313.0561 (base), 271.0455
4.0	417.1396	C18H25O11	
4.2	527.1400	C23H27O14	
4.4	331.0666	C13H15O10	
	417.1397	C18H25O11	339.1082, 177.0555 (base)
	421.1709	C18H29O11	361.1499 (base), 339.1080
	527.1399	C23H27O14	
4.6	259.1182	C12H19O6	
4.7	527.1398	C23H27O14	
5.6	421.1708	C18H29O11	
5.8	259.1180	C12H19O6	
6.0	527.1397	C23H27O14	
6.2	555.1707	C25H31O14	495.1499 (C23H27O12)
6.7	555.1710	C25H31O14	495.1499 (C23H27O12), 465.1399
7.1	495.1498	C23H27O12	
7.5	525.1603	C24H29O13	507.1498, 495.1499 (base)
7.8	407.1916	C18H31O10	347.1705 (base)
8.0	575.1870		453.1505 (base)
8.5	631.1659	C30H31O15	
8.6	555.1707	C25H31O14	495.1502 (C23H27O12)

表2 シャクヤクの測定値(neg) その2

8.7	445.1347	C19H25O12	323.0979 (base)
9.0	539.1767	C25H31O13	479.1558 (C23H27O11), 435.1653, 327.1080, 357.1186, 238.0818
9.1	525.1613	C24H29O13	
	555.1718	C25H31O14	
9.2	445.1348	C19H25O12	
9.3	631.1654	C30H31O15	
9.4	555.1709	C25H31O14	495.1502 (C23H27O12), 465.1397
9.6	555.1709	C25H31O14	495.1502 (C23H27O12)
	539.1770	C25H31O13	479.1558 (C23H27O11), 449.1449, 327.1084
9.7	525.1613	C24H29O13	
10.0	495.1502	C23H27O12	465.1397 (base)
11.3	631.1658	C30H31O15	613.1588 (base), 509.1298, 491.1192, 465.1400, 399.0930, 313.0562, 271.0456
11.5	523.2390	C23H39O13	463.2177 (base)
11.7	523.2387	C23H39O13	
11.9	523.2388	C23H39O13	
12.2	631.1658	C30H31O15	613.1588 (base), 509.1298, 491.1192, 465.1400, 399.0930, 313.0562, 271.0456
12.3	121.0295		
12.6	345.1549	C16H25O8	165.0919 (base)
	479.1553	C23H27O11	357.1188 (base), 283.0819
13.1	479.1553	C23H27O11	357.1186 (base), 283.0818
	523.1814	C25H31O12	463.1606 (base)
13.3	523.2387	C23H39O13	
13.6	521.1657	C25H29O12	461.1447 (base)
	631.1656	C30H31O15	613.1556, 491.1189, 465.1400 (base), 399.0928, 313.0562, 271.0454
13.9	521.1656	C25H29O12	
14.2	523.1814	C25H31O12	
15.6	583.2385	C23H39O13	523.2181, 493.2075 (base)
16.8	643.2019	C32H35O14	583.1809 (C30H31O12), 553.1710 (base)
17.1	643.2019	C32H35O14	583.1813 (base), 553.1706
19.3	643.2019	C32H35O14	583.1809 (C30H31O12)
	679.3687	C36H55O12	619.3477, 457.2954 (base)
24.6	473.2170	C26H33O8	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）
分担研究報告書

分担研究課題 成分分析データ、遺伝子鑑別情報及び漢方処方関連情報に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部部長 合田 幸広

生薬、当帰の遺伝子情報について

研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長 丸山 卓郎

国内に流通する生薬、当帰の遺伝子情報を整備する事を目的に、核 rDNA ITS 領域及び LEAFY 遺伝子の 2nd intron 領域の塩基配列解析を行った。その結果、前者の遺伝子情報は、検体間における配列のバラツキが非常に小さく、また、多コピー遺伝子であるため、PCR 増幅も容易であり、中国及び韓国で使用される当帰と日本薬局方で規定される当帰との区別に有用であると思われた。後者の遺伝子領域は、7 つの遺伝子型（6 つのハプロタイプ）に区別され、その内、2 つのハプロタイプは、他のものとの違いが大きく、その来歴に興味を持たれるものの、トウキとホッカイトウキとの鑑別に対する有用性は見出されなかった。

A. 研究目的

「漢方薬に使用される薬用植物の総合データベース」のコンテンツの一つとして、生薬、当帰（日本薬局方における生薬の正名は、カタカナ表記であるが、本報告書では、基原植物名との混乱を避けるため、生薬名を漢字表記、基原植物名をカタカナ表記とした）の遺伝子情報の整備を目的とした。

当帰は、代表的な補血薬の一つであり、主に婦人病を目標とした漢方処方に汎用される。第十六改正日本薬局方では、トウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa 又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino の根であると定義されている。一方、当帰は、中国及び韓国においても使用されるが、これらの国々では、基原植物がそれぞれ、*A. sinensis*、*A. gigas* であり、我が国で使用されるものとは異なっている。日本薬局方が規定する 2 種の基原植物と中国及び韓国のもものは、核 rDNA の 5S 領域

や ITS 領域の配列により区別可能である事が示されている。一方、*A. acutiloba* と *A. acutiloba* var. *sugiyamae* を区別可能な遺伝子領域は、いくつかの論文で報告があるものの、他の報告での結果と一致しない等、混乱が見られる。また、両者の区別については、RAPD 分析の結果より得られた種特異的増幅バンドを利用した鑑別法が特許公開されているが、利用されている遺伝子領域の機能が不明であったり、真菌の遺伝子配列と高い相同性を示す等、問題点も見られる。

さらに、*A. acutiloba* var. *sugiyamae* は、*A. acutiloba* とエゾノヨロイグサ *A. anomala* の交配種であるとする説や *A. acutiloba* の変異種とする説等、諸説があり、定まっていないことから、*Angelica* 属植物に共通して存在する遺伝子領域の内、適切な変異速度を有する遺伝子領域を解析する事により、*A. acutiloba* と *A. acutiloba* var. *sugiyamae* を区別可能な遺伝子多形を見出すとともに、ホッ

カイトウキの種としての成立過程についての情報も得られると期待される。

そこで本研究では、中国、韓国の当帰との区別領域として、核 rDNA の ITS 領域の配列解析を行うとともに、*A. acutiloba* と *A. acutiloba* var. *sugiyamae* の区別可能領域の探索として、核 DNA の LEAFY 遺伝子の 2nd intron 領域の配列解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細を Table 1 にまとめた。これらの試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料の一部を譲渡されたものである。

2. 実験方法

各試料をナイフで削り、その 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて粉砕し、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、植物の核 rDNA あるいは LEAFY 遺伝子に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする核 rDNA ITS 領域あるいは LEAFY 遺伝子の 2nd intron を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、KOD FX DNA polymerase (Toyobo) を用いて、以下の温度プログラムにより行われた: 94°C 2 min; 98°C 10 sec, 55°C (ITS) or 45°C (LEAFY) 30 sec, 68°C 30 sec, 40 cycle; 68°C 2 min. また、LEAFY 領域においては、nested PCR 法を用いた。得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit (Qiagen) により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。LEAFY 領域においてヘテロ型の配列を示した試料の内、To-4a, 7, 8, -12 については、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、サブクローニングを行い、得られた各クローンに対して塩基配列解析を行った。塩基配列解析における蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied Biosystems) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) により行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

C. 結果

1. ITS 領域

解析結果を Fig. 1 に示した。解析を行った 12 検体全てが、599 bp の配列を有していた (ITS1-5.8S-ITS2)。その内部配列は、To-2, 3, 7 で、64 番目の塩基が G/C, To-5 において、584 番目 (ITS2 として 206 番目) の塩基が同じく G/C であった点を除き、全ての検体で一致した。また、これらの配列は、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 上の *A. acutiloba* の配列 (Acc. No.: AB569093) と上記のヘテロ部位を除き一致した。また、ヘテロ部位の認められなかった To-1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12 では、完全に一致した。一方、データベース上の *A. sinensis* (Acc. No.: AF393784) 及び *A. gigas* (Acc. No.: DQ263580) とは、それぞれ、91.0-91.2% 及び 98.0-98.2% の相同性に留まり、これらの種とは、明確に区別された。

2. LEAFY 遺伝子

全 12 検体について解析を行ったところ、多くの遺伝子型が見出されたことから、刻み試料である To-2, 3, 4, 5 については、別個体を 1 個体ずつ加え、各検体、2 個体を解析した (To-2a, 2b のように区別した)。12 検体、16 個体の解析結果を Fig. 2, Table 2 に示した。計 8 つの遺伝子型が確認され、この内、genotype 7 は、genotype 1 と 5 の雑種と推定される配列であった。ヘテロ型の配列を示した試料の内、To-4a, 7, 8, 12 については、サブクローニングにより 2 種の配列に分離後、解析を行い、得られた配列を各遺伝子型に帰属した (To-4a type A, B, To-7 type A, B, To-8 type A, B, To-12 type A, B in Table 2)。各遺伝子型の全長は、322-324 bp であり、genotype 7 は、260 番目の塩基に挿入/欠失がある 2

種の配列の混合物であったため、以降の配列は、解析困難だった。なお、To-7 は、ダイレクトシーケンシング上、genotype 7 の配列を示したものをサブクローニングによりそれぞれのハプロタイプの配列に分離し genotype 1 と 5 に帰属したものであり、同じパターン of 配列を示した To-1, 5b, 11 も同様のハプロタイプを有しているものと推定される。

D. 考察

ITS 領域の配列解析結果から、今回解析を行った試料は全て、日本薬局方が定める通り、*A. acutiloba* あるいは *A. acutiloba* var. *sugiyamae* であると推定された。また、今回の結果から、国内に流通する当帰の ITS 配列は、種内及び個体内変異も極わずかであることが明らかになった。ITS 領域は、多コピー遺伝子であるため、PCR 増幅が容易であることから、中国及び韓国当帰との区別には本領域の塩基配列解析が有用であると思われる。

一方、LEAFY 領域の遺伝子解析では、7 つの遺伝子型が見出された。この内、genotype 7 は、雑種型であるため、ハプロタイプとしては、6 つの遺伝子型が認められた（厳密には、genotype 3 もヘテロ型であり、9 番目の塩基が adenine に変異した遺伝子型がハプロタイプとして存在し、このものと genotype 1 との雑種が genotype 3 であると推定される）。6 つのハプロタイプの内、genotype 4 及

び genotype 6 は、明らかに他のハプロタイプと比べて変異が多く、異質である。このハプロタイプが見出された To-8, 12 は、いずれも国内本土産であるが、その来歴について興味をもたれる。

しかしながら、当初の目的としたトウキ及びホッカイトウキとの鑑別に有用な遺伝子型は、今回、見出されなかった。

E. 結論

生薬、当帰の原料植物の遺伝子情報の取得を目的に、核 rDNA ITS 領域並びに LEAFY 遺伝子の 2nd intron 領域について、塩基配列解析を行った結果、前者の領域が中国及び韓国当帰と日本薬局方が規定する当帰との区別に有用である事が確認されたが、日本当帰の 2 基原種を区別可能な遺伝子領域は見出せなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1 Details of the commercial Japanese Angelica roots used in this study.

sample no	vouchor no.	name	habitat	form	date	description
To-1	NIB-029	トウキ	北海道	原形	2010	
To-2	NIB-065	トウキ	北海道	刻み	2010	北海当帰
To-3	NIB-066	トウキ	奈良県	刻み	2010	大和当帰 大深
To-4	NIB-085	トウキ	北海道	刻み	2009	栽培品「主に使用」
To-5	NIB-102	トウキ	浙江省	刻み	2010	
To-6	NIB-136	トウキ	四川省	原形	2009	栽培品・大和種当帰(主に使用)
To-7	NIB-137	トウキ	奈良県	原形	2009	栽培品・大和当帰
To-8	NIB-138	トウキ	新潟県	原形	2008	栽培品・奈良県以外で栽培した国産当帰
To-9	NIB-162	トウキ	四川省	原形	2009	和種(栽培品)
To-10	NIB-173	トウキ	山東省	原形	2009	??
To-11	NIB-204	トウキ	奈良	原形	2010	大和当帰
To-12	NIB-218	トウキ	群馬	原形		

Table 2 LEAFY genotypes found in the commercial Japanese Angelica roots.

genotype	sample	aligned position																total length	description
		9	59	70	110	174	182	189	201	215	216	246	257	260	286	319	322		
1	To-2a, 3a, 7 type A, 10, 12 type B	C	A	C	G	T	C	C	G	T	A	C	T	—	—	T	G	323	
2	To-2b, To-4a type A	A	T	G	—	—	.	.	323	
3	To-3b, 4b, 5a, 6, 9	M	—	—	.	.	323	
4	To-8 type A	A	T	.	A	C	.	—	A	C	G	T	.	—	—	C	.	322	
5	To-4a type B, To-7 type B, 8 type B	A	.	T	.	.	T	T	—	.	A	324	
6	To-12 type A	A	T	.	A	C	.	—	A	C	G	T	.	—	T	C	.	323	
7	To-1*, 5b*, 11*, (7)	M	.	Y	.	.	Y	T	×	×	×	—	genotype 1 x 5

M, A/C; R, A/G; W, A/T; Y, C/T; —, no nucleotide; x, no data

<i>A. acutiloba</i>	T C G A A T C C T G C A A T A G C A G A A T G A C C C G C T A A C A C G T C A A	40
<i>A. sinensis</i> G C T . . A . .	40
<i>A. gigas</i> A T . .	40
To-2, 3, 7	40
To-5	40
the others	40
<i>A. acutiloba</i>	C A T T T T G G G C G A G C G T C G G G G G C C T C G G T C T C C T G T C T G	80
<i>A. sinensis</i>	. . . A A . . T . . T C T . T . . . C . T . . . A . .	80
<i>A. gigas</i>	. . A	80
To-2, 3, 7 S	80
To-5	80
the others	80
<i>A. acutiloba</i>	C G A A T C C C T G G T A G G T G G C C A C T C C C G G G T G G C C A C T G G C	120
<i>A. sinensis</i> C T	119
<i>A. gigas</i> T	120
To-2, 3, 7	120
To-5	120
the others	120
<i>A. acutiloba</i>	C T G C A A A A T C A T T C G G G C G C G G A A T G C G C C A A G G A C C T T A	160
<i>A. sinensis</i> G . A	159
<i>A. gigas</i>	160
To-2, 3, 7	160
To-5	160
the others	160
<i>A. acutiloba</i>	A A A C T G A A T T G T A C G T C C G T A T C C C G T T A G C G G G C A C C G G	200
<i>A. sinensis</i>	. . . T G . C T . . A	199
<i>A. gigas</i>	200
To-2, 3, 7	200
To-5	200
the others	200
<i>A. acutiloba</i>	C G T C A T T C C A A A A C A C A A C G A C T C T C G A C A A C G G A T A T C T	240
<i>A. sinensis</i>	239
<i>A. gigas</i> T	240
To-2, 3, 7	240
To-5	240
the others	240
<i>A. acutiloba</i>	C G G C T C T C G C A T C G A T G A A G A A C G T A G C G A A A T G C G A T A C	280
<i>A. sinensis</i>	279
<i>A. gigas</i>	280
To-2, 3, 7	280
To-5	280
the others	280
<i>A. acutiloba</i>	T T G G T G T G A A T T G C A G A A T C C C G T G A A C C A T C G A G T C T T T	320
<i>A. sinensis</i>	319
<i>A. gigas</i>	320
To-2, 3, 7	320
To-5	320
the others	320

Fig. 1 ITS sequence alignment for the commercial Japanese *Angelica* roots and the related plants

A. acutiloba	G A A C G C A A G T T G C G C C C G A A G C C A C T A G G C T G A G G G C A C G	360
A. sinensis T	359
A. gigas	360
To-2, 3, 7	360
To-5	360
the others	360
A. acutiloba	C C T G C C T G G G T G T C A C G C A T C G T C T T - G C C C A C A A A C C A C	399
A. sinensis	T A T -	398
A. gigas A - G	399
To-2, 3, 7	399
To-5	399
the others	399
A. acutiloba	T C A C A C C T - G A G A A G T T G T G C C G G T T T G G G G G - C G G A A A C T	437
A. sinensis T . . . C . T . G . . C . . . A . T . . . A G T .	438
A. gigas - - - . . C . . . T .	437
To-2, 3, 7 - - -	437
To-5 - - -	437
the others - - -	437
A. acutiloba	G G C C T C C C G T A C C T T G T C G T G C G G T T G G C G G A A A A A C G A G	477
A. sinensis G T C G T . . .	478
A. gigas	477
To-2, 3, 7	477
To-5	477
the others	477
A. acutiloba	T C T C C G G C G A C G G A C G T C G C G A C A T C G G - T G G T T G T A A A A	516
A. sinensis T T . . G	518
A. gigas - G	516
To-2, 3, 7	516
To-5	516
the others	516
A. acutiloba	G A C C C T C T T G T C T T G T C G T G C G A A T C C T C G T C A T C T T A G C	556
A. sinensis	T A C G T	558
A. gigas C	556
To-2, 3, 7	556
To-5	556
the others	556
A. acutiloba	G A G C T C C A G G A C C C T T A G G C A G C A C A C A C T C T G T G C G C T T	596
A. sinensis A G T A	598
A. gigas	596
To-2, 3, 7	596
To-5 S	596
the others	596
A. acutiloba	C G A	599
A. sinensis	601
A. gigas	599
To-2, 3, 7	599
To-5	599
the others	599

Fig. 1 Continued


```

genotype 1 G T G A A C T C C A C T A A T T A A T T A G A C T T T A A T T A T C T T T A G T 40
genotype 2 . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 40
genotype 3 . . . . . M . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 40
genotype 4 . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 40
genotype 5 . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 40
genotype 6 . . . . . A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 40
genotype 7 . . . . . M . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 40

genotype 1 T A T A A A T T T A G T T A A C T G A C A G A T T G A A T C A C T T C G T T T T 80
genotype 2 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 80
genotype 3 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 80
genotype 4 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 80
genotype 5 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 80
genotype 6 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 80
genotype 7 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 80

genotype 1 A T C C T T T A T A C T G T T G A T T T G A C T T C T T T G T T A T A C G A G G 120
genotype 2 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 120
genotype 3 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 120
genotype 4 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 120
genotype 5 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 120
genotype 6 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 120
genotype 7 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 120

genotype 1 T A A C A T G T T A G C T T G C A T A T T C T T A G G T A C T T G C A T G C A T 160
genotype 2 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 160
genotype 3 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 160
genotype 4 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 160
genotype 5 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 160
genotype 6 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 160
genotype 7 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 160

genotype 1 T T A T A T A A A A T A T T T T C C G A C A A T A T T C T A A A A A C G G T 200
genotype 2 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 200
genotype 3 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 200
genotype 4 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 199
genotype 5 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 200
genotype 6 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 199
genotype 7 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 200

genotype 1 G A T T A A T C G C T A G A T A G A A T A T A T A A A A T C C C T G G A A A T 240
genotype 2 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 240
genotype 3 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 240
genotype 4 A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 239
genotype 5 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 240
genotype 6 A . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 239
genotype 7 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 240

genotype 1 T A C A A C T G C A A A A T T T T T - A G T A C T C T T A G A A C A T G T T T 279
genotype 2 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 279
genotype 3 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 279
genotype 4 . . . . . T . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 278
genotype 5 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 280
genotype 6 . . . . . T . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 278
genotype 7 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 260

```

Fig. 2 LEAFY 2nd intron sequence alignment for the commercial Japanese Angelica roots

genotype 1	T T T T T - G A C G T T G A A A G A G A A G T T G A T G T A G G A A A T T T T G	318
genotype 2 -	318
genotype 3 -	318
genotype 4 -	317
genotype 5 -	319
genotype 6 T	318
genotype 7	260
genotype 1	T G C A G	323
genotype 2	323
genotype 3	323
genotype 4	322
genotype 5	. A . . .	324
genotype 6	323
genotype 7	260

Fig. 2 Continued

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）
分担研究報告書

分担研究課題 成分分析データ、遺伝子鑑別情報及び
漢方処方関連情報に関する研究

分担研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

漢方処方構成生薬の水煎出エキス収量に関する研究

研究協力者 袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、5つの主要生薬メーカー局方規格製品についてエキス収量を測定したところ、いずれも会社間のばらつきは小さく、特に、地黄、芍薬及び当帰のばらつきは小さかった。また、甘草については、様々な産地に由来する生薬原料についてエキス収量を測定したところ、産地の違いによりエキス収量のばらつきは大きいことが分かったが、一方で、エキス収量による産地の特徴付けは困難であった。

A. 研究目的

漢方製剤の原料である生薬は天然物であるため、採集と栽培の違い、天候、産地、収穫時期等により成分含量がばらつきやすく、また、乾燥や貯蔵の方法が適切でないとカビや虫の被害を受けることがあり、指定部位以外の部位やその他の異物等が混入しやすく、合成化合物とは異なる観点で品質確保を考える必要がある。

本研究事業では、漢方薬に使用される薬用植物の情報データベースの構築を行うが、その一環として、産地や収穫時期等の異なる様々な生薬原料について、形態学、理化学、分析化学、生化学、薬理学、分子遺伝学等の種々の観点から実測データを付加し、総合的に生薬サンプルの分類を進めている。

今回我々は、本研究事業において平成23年度の重点検討生薬（コア生薬）に指定された黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、5つの主要生薬メーカー局方規格製品についてエキス収量を測定した。さらに、甘草については、様々な産地に由来する生

薬原料についてエキス収量を測定した。

B. 研究方法

植物材料

局方生薬のエキス収量測定においては、黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、国内主要生薬メーカー5社（A社、B社、C社、D社及びE社と仮称）より日本薬局方規格品で漢方処方調剤用の刻み生薬を購入して用いた。また、生薬原料のエキス収量測定においては、甘草に関して、医薬基盤研究所薬用植物資源センターが収集したものを用いた。煎出用の水は、Milli-Q Synthesis (Milipore) により調製した超純水を用いた。

機器

生薬あるいは生薬原料を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥はFREEZE DRYER FDU-830（東京理化工械）を用いて行った。生薬の粉末化には、Vibrating Sample Mill TI-200

(HEIKO 製作所) を用いた。

局方生薬煎出エキスの調製と収量測定

黄連、桂皮、地黄、芍薬あるいは当帰について、刻み生薬 20 g をポット (らくらく煎) に取り、400 mL の水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を 3000 rpm で 5 分間遠心し、上澄液をあらかじめ重量を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させてエキスを調製した。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を差し引くことで算出した。

生薬原料煎出エキスの調製と収量測定

甘草の生薬原料サンプルについて、原形のものにはサミで 5~10mm に切り刻んだ。刻んだサンプルを Vibrating Sample Mill で粉砕した。粉末サンプル 20 g をポット (らくらく煎) に取り、400 mL の水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を 3000 rpm で 5 分間遠心し、上澄液をあらかじめ重量を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させてエキスを調製した。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を差し引くことで算出した。

倫理面への配慮

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用しない。

C. 研究結果

局方生薬のエキス収量

局方生薬として流通する黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、それぞれの 20 g に相当するエキス収量を測定し、生薬重量あたりのエキス収率を表 1 に示した。また、5 社の平均値を 100 とした場合の相対値も示した。

エキス自体の収率が小さく (5 社平均 6.16%)、しかも揮発性成分が多いため、わずかなばらつきが大きな数字に反映されたものと考えられた。

また、規格化されていない甘草の生薬原

それぞれの生薬について会社間の変動係数 (Cv) を算出したところ、いずれの生薬も 10%以下に収まり、特に、地黄、芍薬及び当帰については、それぞれ 5.6%、4.1%及び 4.6%と小さなばらつきであった。一方、会社内変動係数は数パーセントであることが多く、同じ会社の生薬に関する測定間のばらつきは小さいことが分かった。ただし、例外的に桂皮及び当帰については会社内のばらつきが大きい場合もあった。

甘草生薬原料のエキス収量

医薬基盤研究所薬用植物資源センターが収集した甘草生薬原料は、原形のものとは刻みのものがあつたため、抽出効率を揃える目的で、全サンプルについて粉末化した後に煎出した。それぞれの粉末 20 g に相当するエキス収量を測定し、生薬原料重量あたりのエキス収率を表 2 に示した。16 種類の生薬原料におけるエキス収率の変動係数は、18.1%であった。また、一方、同じサンプルを 3 回測定する中での変動係数はいずれも数パーセントであり、同じ生薬原料に関する測定間のばらつきは小さいことが分かった。

D. 考察

漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベースに実測データを付加する目的で、平成 22 年度に行った黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人参に加えて、黄連、桂皮、地黄、芍薬及び当帰に関して、5 つの主要生薬メーカーの局方規格製品についてエキス収量を比較した (表 1)。今年度測定した 5 つの生薬についてはメーカー間のばらつきが小さく、平成 22 年度測定が生薬において生姜及び人参の会社間変動係数が 26.5%及び 26.7 を示したことと対照的であった。桂皮はややその中で会社間変動係数が大きいもの (10.0%) であったが、料について、16 種類のサンプルのエキス収量を測定したところ、16 検体の平均収率は 24.3%であり、これは平成 22 年度に測定した局方生薬 5 メーカーの平均値 (23.4%) と極めて近い値を示し、そのエキス収率が甘