

201132076A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

遺伝子及び成分化学情報の多変量解析に基づく

生薬及び漢方処方品質評価法に関する研究

平成23年度 総括・分担研究年度終了報告書

(H23-医薬-若手-015)

研究代表者 丸山 卓郎

平成24（2012）年3月

目次

I.	総括研究報告	
	遺伝子及び成分化学情報の多変量解析に基づく 生薬及び漢方処方品質評価法に関する研究	1
	丸山卓郎	
II.	分担研究報告	
	1. シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性について	8
	丸山卓郎	
	2. 多変量解析を利用したシャクヤクの品質評価について	
	内山奈穂子	
	生薬のメタボローム研究における試料調製法及び データ処理に関する研究	18
	若菜大悟	
	シャクヤクの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いた メタボローム解析に関する研究	26
	若菜大悟	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	37

遺伝子及び成分化学情報の多変量解析に基づく 生薬及び漢方処方品質評価法に関する研究

研究代表者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長

研究要旨 多変量解析を利用した漢方処方製剤の規格化を目指し、モデル処方として芍薬甘草湯を選択し、その構成生薬であるシャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性を調べるとともに、¹H-NMR スペクトルデータを利用した生薬のメタボローム解析手法の最適化を行い、同手法をシャクヤクに対して適用した。その結果、遺伝的多様性の解析では、シャクヤクは、南方系、北方系の 2 種に大別され、カンゾウは、3 つの遺伝子型に分類された。また、西北甘草は、東北甘草に比べ遺伝的多様性が大きいことが示唆された。メタボローム解析手法の最適化では、試料調製において、粉碎、抽出等、機械化が可能な操作については、専用の機械を用いて、ヒューマンエラーの介入の可能性を排除することが推奨された。また、¹H-NMR の測定においては、試料間の化学シフトのズレの回避及び積分値の定量性の確保として、前者は、リン酸緩衝液による pH の安定化が、後者は、qNMR の手法を利用した測定パラメータの適用が効果的であることが明らかになった。上記の手法を適用して行ったシャクヤクのメタボローム解析では、シャクヤクは、糖類の種類及び量により、3 つのグループに大別され、さらに、ビャクシャクの大部分が帰属された 1 群について行った PCA 解析では、各試料の産地別にグループを形成することが明らかになった。成分分画により得たシャクヤク含有成分の標準化合物のスペクトルデータを基にローディングプロットで見出された特徴的なピークの同定を行った結果、産地別のグループ分類に寄与する化合物としてアルビフロリン、ペオニフロリン、カテキン、アルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコース、安息香酸、グルコースなどが同定された。今後、カンゾウについても同様のアプローチにより、成分パターンの分類を行うとともに、各成分パターンを示すシャクヤク及びカンゾウより、芍薬甘草湯標準湯剤を調製し、本研究の最終目的である漢方処方製剤の規格化について検討を行う予定である。

研究分担者 内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 流動研究員
衛生研究所 生薬部 主任研究官
研究協力者 若菜大悟 国立医薬品食品衛生研究所 A. 研究目的

近年、国民の高齢化や食生活の欧米化に伴い、高血圧、糖尿病等の生活習慣病やアレルギー等の自己免疫疾患等、従来の医療では治療の困難な疾病が増加している。このため、従来の医療に代わる補完代替医療として、漢方医学に注目が集まっている。漢方医学による疾病治療を担うのは、数百種にも及ぶ生薬である。生薬は全て、動植物や鉱物を原料とするものであり、自然界から得られるものであることから、その品質を均質に保つ事が、化学合成薬に比べ難しい医薬品である。

生薬の品質に影響を与える主な要因は、1) 原料植物の種、品種あるいは系統(遺伝子型)、2) 産地、栽培法等、成長時の環境、3) 収穫後の加工調製法の違いに大別される。これらの要因の内、加工調製法については、主産地である中国をはじめとする原産国が独自に行うものが多く、その方法は公開されていないものも多い。

そこで本研究では、残る2つの主要因である原料植物の遺伝的背景及び産地情報を生薬及び最終製品である漢方処方剤の成分情報と結び付け、これらの要因が生薬の品質に与える影響の理解と影響を受ける成分の特定を目指した。

実験材料としては、シャクヤクとカンゾウの2種の生薬からなる最も単純な漢方処方である芍薬甘草湯を取り上げ、今年度は、構成生薬であるシャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性の解析並びに成分情報の網羅的解析を試みた。

遺伝的背景については、シャクヤクは、

核 rDNA の ITS 領域を、カンゾウでは ITS 領域に加え、葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の部分配列解析を行うことにより検討した。一方、成分情報の網羅的解析については、¹H-NMR スペクトルデータの多変量解析を用いて行うこととし、測定条件の最適化を検討するとともに、得られた測定条件を用いて、シャクヤクのメタボローム解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

国内の生薬メーカー各社及び医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターより分譲を受けたカンゾウ及びシャクヤク試料を用いた。

2. 実験方法

2-1. 遺伝子解析

各試料より、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型に用いた PCR を行う事により、目的の遺伝子領域を含む DNA 断片を増幅した。各生薬における標的遺伝子領域は、シャクヤクが核 rDNA ITS 領域、カンゾウが核 rDNA ITS 領域並びに葉緑体 DNA *trnH-psbA* IGS 領域とした。得られた PCR 産物を精製した後、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。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。

2-2. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析手法の最適化

¹H-NMR スペクトルによるメタボローム解析の手順は、測定試料エキスの調製、¹H-NMR の測定、データ処理、そして多変量解析という流れになる。これらの手順の内、エキスの調製は、測定対象物の種類及び量、¹H-NMR 測定条件は、スペクトルデータの定量性及び定性性の精度、データ処理は、その後の多変量解析における精密度及び正確性に大きく影響を与えることから、これらの条件について、それぞれ検討を行った。

2-3. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたシャクヤクのメタボローム解析

2-2. で確立された実験条件を用いてシャクヤクのエキスを調製、¹H-NMR 測定を行い、得られたデータマトリックスを基に、PCA 解析を行った。また、ローディングプロットからのピーク同定が困難であったことから、市販のシャクヤクより成分分画を行い、得られた化合物のスペクトルデータをローディングプロットと比較した。

C. 結果

1. 遺伝子解析

1-1. シャクヤク

今回、塩基配列解析した試料は、全て日本薬局方で規定されている通り、*P. lactiflora* であると確認された。

一方、小松らは、日本産芍薬、中国産白芍、赤芍の市場品並びに主に園芸用の *P. lactiflora* の栽培品種の ITS 配列の解析結果から、*P. lactiflora* は、北方系と南方

系の 2 種に大別する事が出来、その判別には、3 箇所塩基が重要であることを示している。

今回の解析結果を、この知見にあてはめると、日本産のシャクヤクは、北海道のものを除くと、奈良産の 1 検体以外、全て II 型のパターンを示した。一方、中国産の 2 検体は、いずれも I 型を示した。

1-2. カンゾウ

ITS 配列の結果から、今回の研究に用いた全検体が、*G. uralensis* を基原とするものである事が明らかになった。

一方、*trnH-psbA* 配列では、東北甘草のほとんどが、同一の遺伝子型 (T-4 型) を示し、その他の遺伝子型としては、T-2 型が 2 個体、T-1 型が 1 個体、見出されたのみだった。西北甘草では、T-4 型が最も多く、19 個体検出され、次いで、T-1 型が、7 個体、T-2 型が、5 個体認められた。

2. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析手法の最適化

2-1. 試料調製

試料の粉砕、抽出操作は、専用の機械を用い、一定の条件で行うことで、ヒューマンエラーを予防出来た。

2-2. 抽出溶媒、抽出方法

重クロロホルム、重メタノール、重水を用いて検討を行った結果、重メタノールと重水の 1:1 混液が抽出溶媒として適当と考えられた。

また、測定溶媒として重水の代わりに、重水を用いて調製したリン酸緩衝液を抽出溶媒に用いる事で試料間の pH の違いに基づく化学シフトのズレを予防出来た。以上のことから、抽出溶媒は、重メタノールとリン酸緩衝液を含む重水溶液の 1:1 混液が適切と判断された。

2-3. ¹H-NMR 測定法

¹H-NMR の測定は田原らにより報告されている qNMR の条件を参考に、測定範囲を -15 ppm から 15 ppm, データポイントを 32000 とし、緩和時間を 5 秒、積算回数を 64 回とした。

2-4. データ処理方法

各濃度の試験溶液を調製し、¹H-NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルを 0.01, 0.05 及び 0.1 ppm 単位でパケット積分し、濃度と積分値の直線性を相関係数で確認した。その結果として、パケット単位が広いほど抽出濃度と積分値の直線性は良い結果を示した。しかし、過度にパケット単位を広くすると複数のピークを同一範囲としてしまう可能性が高くなるので、0.05 ppm 単位が適当と判断した。

同条件でパケット積分を行った場合、全範囲のうち 65.0% のサンプルが相関係数 0.9 以上を示した。また、積分値の大きいパケットが高い相関係数を持つ事が分かった。

3. ¹H-NMR スペクトルデータを用いた

シャクヤクのメタボローム解析

3-1. 全サンプルの分析

入手した全サンプルについて PCA を行った結果、3 グループに分類可能だった。ローディングプロットの解析結果から、グループ A はグルコースが多くスクロースが少ない、グループ B はスクロースが多い、グループ C は両者とも少ない事が判明した。

3-2. ビヤクシャクの分析

上記の分析の結果、ビヤクシャクの大部分はグループ B に含まれていた。そのため、次いでビヤクシャクのみサンプルを限定し PCA を行った結果、ビヤクシャク試料は、産地（中国、北海道、新潟、奈良）毎に分類される傾向が確認された。この分類に影響を与えている化合物をローディングプロット及び成分分画により得た標準化合物のスペクトルデータとの比較から同定した結果、中国産は没食子酸、アルギニン、ペンタガロイルグルコース、安息香酸が、北海道産はペオニフロリン、アルギニンが、奈良県産はグルコース及び安息香酸が、新潟県産はアルビフロリン、ペオニフロリン及びカテキンが、それぞれ、多く含まれる事が分かった。

D. 考察

1. 遺伝子解析

小松らの報告に基づく、北方系、南方系の分類では、中国産シャクヤク 2 検体及び北海道産の 3 検体（このうち、べにしずか

と北宰相は市場品ではない) がいずれも I 型に、日本産の他の産地のもの 8 検体中、奈良産の 1 検体を除き、II 型に分類された。小松らは、中国及び日本産市場品の解析を行い、中国産の 10/11 検体が I 型、日本産の 3/4 検体が II であったと報告しているが、今回の解析結果は、同報告とよく一致していた。

一方、カンゾウの解析では、ITS 配列の解析結果から、全検体の基原種が、*G. uralensis* であると判断された。現在、市場に流通するカンゾウは、ほとんどが *G. uralensis* であることが知られているが、今回の結果から、上記の状況は、1990 年代から見られるものであることが、明らかになった。

東北甘草と西北甘草の比較では、*trnH-psbA* 領域の塩基配列解析の結果から、西北甘草の遺伝的多様性は、東北甘草のそれに比べて大きいと考えるのが妥当である。

2. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析手法の最適化

試料の粉碎、エキスの調製過程において、専用の機械を利用することが、ヒューマンエラーを避け、適切なデータを取得する上で、重要であることが明らかになった。また、NMR データには、定性的パラメータとして化学シフトが、定量的パラメータとして積分値が存在する。適切なメタボローム解析を行う上で、試料間における各パラメータのバラツキを適切に捉えることが重

要であるが、前者のパラメータについては、抽出溶媒にリン酸緩衝液を用いることが、有効であった。後者については、qNMR の手法を転用し、測定範囲を広くとるとともに、緩和時間を長くすることで、メタボローム解析に適用可能なダイナミックレンジを有するデータを取得可能であった。

3. ¹H-NMR スペクトルデータを用いたシャクヤクのメタボローム解析

今回の研究結果から、シャクヤク試料は、糖類の種類及び量により 3 つのグループに分類された。シャクヤクにおける糖類の含量は加工・調製法や貯蔵期間により変化する事がすでに報告されており、今回の分類もこれらの点による影響が考えられる。

ビャクシャク(日本薬局方におけるシャクヤク)の大部分が、スクロース高含有グループに帰属されたことから、このものに特化した PCA 解析を行った結果、産地により、各群を形成した。ITS 配列解析の結果からは、今回の研究に用いられたシャクヤク試料は、北方系、南方系の違いは、見出されたものの、PCA 解析の結果と一致する結果は得られておらず、上記の産地による成分パターンの違いは、気候条件の差異によるものと推察される。

E. 結論

1. 遺伝子解析

シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性を調べた結果、シャクヤクは、南方系、北方系の 2 種に大別され、カンゾウは、3

つの遺伝子型に分類された。また、西北甘草は、東北甘草に比べ遺伝的多様性が大きいことが示唆された。

2. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたメタボローム解析手法の最適化

今回、 $^1\text{H-NMR}$ を用いたメタボローム研究を行う際の試料調製及び $^1\text{H-NMR}$ の測定法に関する研究を行った。主な要点としては、試料調製及びエキス調製においては、専用の機械を利用し、ヒューマンエラーを予防すること、 $^1\text{H-NMR}$ 測定においては、リン酸緩衝液を抽出溶媒に加えることで、各試料間のエキスの pH の違いに基づく化学シフトのズレを防ぐとともに、qNMR で用いられる測定条件を転用し、積分値の定量性を確保することが重要であった。

ここで作製した実験条件をそのままあるいは、一部改変して用いる事により、生薬のメタボローム解析に最適なデータが得られると考えられる。以下に方法を記す。

①試料を 4 分割し、ボールミルを用い 1 min, 30 sec⁻¹ の条件で粉碎する。

②重メタノールと重水で調製したリン酸緩衝液に $d_4\text{-TMS-P}$ を 0.025% 添加し抽出溶媒とする。試料の粉末 100 mg に抽出溶媒 1 mL を加え、30 min, 300 min⁻¹ で振とう抽出する。

③ 10 分間、300 rpm で遠心分離をし、その上清 600 mL を NMR チューブに充填する。

④ $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを xswEEP 30

ppm, scan 64 times, auto filter off の条件で測定する。

⑤スペクトルデータを 0.05 ppm 単位でバケット積分する。

⑥多変量解析を行う。

3. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたシャクヤクのメタボローム解析

シャクヤク(セキシヤク含む)について、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたメタボローム解析を行った結果、グルコース、スクロースの含量によって、3 つのグループに大別された。さらに、ビャクシャクの大部分が帰属された 1 群について、PCA 解析を行った結果、各試料の産地別にグループを形成し、それらの特徴付ける成分として、アルビフロリン、ペオニフロリン、カテキン、アルギニン、没食子酸、ペンタガライルグルコース、安息香酸、グルコースなどが同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 神谷洋, 川崎武志, 山本豊, 林茂樹, 柴田敏郎, 合田幸広, メタボローム解析によるシャクヤクの品質評価 (第 2 報), 日本生薬学会第 58 回年会 (2011.09, 東京)

若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 山本

豊, 合田幸広, ¹H-NMR スペクトルを用いた甘草のメタボローム解析, 日本薬学会第 132 年会 (2012.03, 札幌)

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性に関する研究

研究分担者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長

研究要旨 シャクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性を調べるため、前者については、核 rDNA ITS 領域を、後者については、同領域及び葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、両生薬は、それぞれ、*Paeonia lactiflora* 及び *Glycyrrhiza uralensis* を基原とし、前者は、ITS 配列から南方系 (I 型) と北方系 (II 型) に大別され、後者は、*trnH-psbA* IGS 配列から、3 つのタイプに分類された。また、東北甘草と西北甘草の比較では、西北甘草の方が、遺伝的多様性は大きいと考えられる結果が得られた。

A. 研究目的

近年、国民の高齢化や食生活の欧米化に伴い、高血圧、糖尿病等の生活習慣病やアレルギー等の自己免疫疾患等、従来の医療では治療の困難な疾病が増加している。このため、従来の医療に代わる補完代替医療として、漢方医学に注目が集まっている。漢方医学による疾病治療を担うのは、数百種にも及ぶ生薬である。生薬は全て、動植物や鉱物を原料とするものであり、自然界から得られるものであることから、その品質を均質に保つ事が、化学合成薬に比べ難しい医薬品である。

生薬の品質に影響を与える主な要因は、

- 1) 原料植物の種、品種あるいは系統（遺伝子型）、
- 2) 産地、栽培法等、成長時の環境、
- 3) 収穫後の加工調製法の違いに大別され

る。これらの要因の内、加工調製法については、主産地である中国をはじめとする原産国が独自に行うものが多く、その方法は公開されていないものも多い。

そこで本研究では、残る 2 つの主要因である原料植物の遺伝的背景及び産地情報を生薬及び最終製品である漢方処方製剤の成分情報と結び付け、これらの要因が生薬の品質に与える影響の理解と影響を受ける成分の特定を目指した。

実験材料としては、シャクヤクとカンゾウの 2 種の生薬からなる最も単純な漢方処方である芍薬甘草湯を取り上げた。

本報告書では、芍薬甘草湯の原料植物であるシャクヤク及びカンゾウの遺伝的背景の解析結果について報告する。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究で使用されたシャクヤク及びカンゾウ試料の詳細を Tables 1-3 に示した。これらは、いずれも国内の生薬メーカー及び医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部より譲り受けたものである。

また、産地の参考として、中国周辺の地図を Fig. 1 に示した。

2. 実験方法

試料 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) により、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型に用いた PCR を行う事により、目的の遺伝子領域を含む DNA 断片を増幅した。各生薬における標的遺伝子領域は、シャクヤクが核 rDNA ITS 領域、カンゾウが核 rDNA ITS 領域並びに葉緑体 DNA *trnH-psbA* IGS 領域とした。シャクヤク ITS 領域の増幅は、酵素に KOD FX DNA polymerase (Toyobo) を用い、以下の温度プログラムに従って行った：94°C 2 min; 98°C 10 sec, 50°C 30 sec, 68°C 30 sec, 40 cycle; 68°C 2 min。カンゾウの ITS 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域（部分配列）の増幅は、酵素に Taq NT DNA polymerase (Nippon Gene) を用い、以下の温度プログラムに従って行った：94°C 4 min; 94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 40 cycle; 72°C 4 min。各領域の増幅に用いられたプライマーの配列は、Table 4 に示した。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シングにより塩基配列を決定した。ダイレクトシーケンシングにおける PCR 産物の蛍光ラベル化は、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。

カンゾウについては、ロット内においても品質のバラツキが大きい事が知られている事から、東北及び西北甘草、それぞれのロット内のバラツキを調べる目的で、Ka-1 及び Ka-21 については、10 個体を解析し、その他のロットについては、3 個体ずつを解析した。

C. 結果

1. シャクヤク

シャクヤクの核 rDNA ITS 領域の塩基配列は、全 13 検体が 652 bp の長さを持ち、ITS1 領域が、267 bp、5.8S rDNA の領域が 164 bp、ITS2 領域が 221 bp であった（小松らの報告では、ITS2 領域を 222 bp としているが、これは、448 番目の塩基 (C or A) の挿入に基づくもので、本研究では、この位置の塩基は、欠失したのみであった）。*Paeonia* 属植物の同領域の塩基配列は、既に Sang らにより詳細な解析がなされており¹⁾、その結果と比較した結果、今回、塩基配列解析した試料は、

て日本薬局方で規定されている通り, *P. lactiflora* であると確認された.

さらに, 小松らは, 日本産芍薬, 中国産白芍, 赤芍の市場品並びに主に園芸用の *P. lactiflora* の栽培品種の ITS 配列の解析結果から, *P. lactiflora* は, 北方系と南方系の 2 種に大別する事が出来, その判別には, 69 番目, 458 番目及び 523 番目の塩基が重要であることを示している²⁾. すなわち, 上記 3 箇所の塩基が, TAT である場合, 南方系 (I 型), YMY である場合, 北方系 (II 型) であるとしている.

今回の解析結果 (Fig. 2) を, この知見にあてはめると Table 1 のようになる. 日本産のシャクヤクは, 北海道のものを除くと, 奈良産の 1 検体以外, 全て II 型のパターンを示した. 一方, 中国産の 2 検体は, いずれも I 型を示した.

2. カンゾウ

カンゾウ市場品の核 rDNA ITS 領域, *trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列に関しては, Kondo らにより, 既に詳細な解析がなされており³⁾, それによると ITS 領域は, I-1 ~ I-3 型までの 3 タイプ及び I-2 と I-3 の雑種に分類され, *Glycyrrhiza glabra* 及び *G. inflata* は, I-2 型の配列を, *G. uralensis* は, I-3 型の配列を持つ事が示されている (Fig. 3). 一方, *trnH-psbA* IGS 領域では, T-1 ~ T-4 型の 4 タイプに分類され, *G. glabra* は, T-1, 2 を, *G. uralensis* は, T-1, 2, 4 型の配列を持つ事が示されている.

今回, 塩基配列解析を行った東北甘草 13 ロット, 46 個体, 西北甘草 8 ロット, 31 個体の結果を上記の知見に当てはめたところ, ITS 配列については, いずれの検体も I-3 型の配列を示し, *G. uralensis* を基原とするものである事が明らかになった (Tables 2, 3).

一方, *trnH-psbA* 配列では, 東北甘草のほとんどが, T-4 型の配列を示し, その他の遺伝子型としては, Ka-1 の 10 個体中の 1 個体及び Ka-4, -13 の 3 個体中の 1 個体でそれぞれ, T-2, T-2, T-1 型の配列が見出されたのみだった (Table 2). 西北甘草では, 8 ロット, 31 個体中, T-4 型が最も多く, 19 個体検出され, 次いで, T-1 型が, 7 個体, T-2 型が, 5 個体認められた (Table 3).

D. 考察

シャクヤクは, 解析した全 13 検体において, ヘテロ型 (塩基の重なり) の配列が検出され, 品種改良目的に, 盛んに交配が行われてきた事が示唆された.

小松らの報告に基づく, 北方系, 南方系の分類では, 中国産シャクヤク 2 検体及び北海道産の 3 検体 (このうち, べにしずかと北宰相は市場品ではない) がいずれも I 型に, 日本産の他の産地のもの 8 検体中, 奈良産の 1 検体を除き, II 型に分類された. 小松らは, 中国及び日本産市場品の解析を行い, 中国産の 10/11 検体が I 型, 日本産の 3/4 検体が II であったと報告している²⁾ が, 今回の解析結果は, 同報告と

よく一致していた。

一方、カンゾウの解析では、ITS 配列の解析結果から、全検体の基原種が、*G. uralensis* であると判断された。この結果は、昨年度、カンゾウ市場品の遺伝子情報調査の結果から、現在、流通するカンゾウ 16 市場品のほとんどが *G. uralensis* を基原とするものであったとの報告⁴⁾と一致する。また、今回の結果から、上記の状況は、1990 年代から見られるものであることが、明らかになった。

TrnH-psbA 領域の解析結果から、東北甘草の大多数は、T-4 の遺伝子型を持ち、T-2, T-1 型は、わずかに認められる程度だった。今回の研究に用いた東北甘草は、吉林省産の 1 ロットを除き全て内モンゴル産であるが、Kondo らの報告では、内モンゴル産カンゾウ 50 検体の 7 割が T-4 型を持ち、次いで T-1, T-2 型が、2 割、1 割と続く（ただし、東北、西北甘草の区別は無い）。今回の研究結果は、概ね、Kondo らの報告と一致する。

一方、西北甘草では、T-4 型が最も多いものの、T-1, T-2 型も、それぞれ、3 割前後認められ、東北甘草に比べ、遺伝子型は多様であった。このことは、今回の研究に使用された西北甘草の産地が、多様であることが原因であると、一見、考えられるが、その一方で、各 3 個体の解析を行った Ka-22 ~ Ka-28 の 7 ロット中、全個体が同じ遺伝子型を示しているものが、Ka-24 のみであることを考えると、少なくとも今回の研究材料については、産地の多様性を

抜きにしても、西北甘草の遺伝的多様性は、東北甘草のそれに比べて大きいと考えるのが妥当である。

E. 結論

シヤクヤク及びカンゾウの遺伝的多様性を調べた結果、シヤクヤクは、南方系、北方系の 2 種に大別され、カンゾウは、3 つの遺伝子型に分類された。また、西北甘草は、東北甘草に比べ遺伝的多様性が大きいことが示唆された。今後は、他の遺伝子領域についても検討を行うとともに、今回の研究で見出された遺伝子型と成分情報との関連を調べる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
特に無し

2. 学会発表

若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 山本豊, 合田幸広, ¹H-NMR スペクトルを用いた甘草のメタボローム解析, 日本薬学会第 132 年会 (2012. 03, 札幌)

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特に無し

2. 実用新案登録
特に無し

3. その他
特に無し

参考文献

- 1) Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F., Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6813-6817 (1995).
- 2) 小松かつ子ら, 漢方薬に用いられる薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究, 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, 平成 23
- 3) Kondo K., Shiba M., Yamaji H., Morota T., Zhengmin C., Huixia P., Shoyama Y., Species identification of licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1497-1502 (2007).
- 4) 小松かつ子ら, 漢方薬に用いられる薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究, 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, 平成 22 年度総括・分担研究報告書 (2011).

Table 1 Details of Peony root used in this study.

試料番号	名前	産地	入手年	備考	遺伝子型*
SY-H1	シャクヤク	北海道	2008 (採集年)	薬用：べにしずか	I
SY-H2	シャクヤク	北海道	2008 (採集年)	薬用：北宰相	I
SY-N1	シャクヤク	新潟	2009	切花用：春の粧	II
SY-T1	シャクヤク	中国	2009	薬用：在来種	I
SY-Y1	シャクヤク	奈良	2008	薬用：在来種	II
SYA-6	シャクヤク	中国・浙江	2009. 11		I
SYA-9	シャクヤク	長野	2009. 07	切花用：春の粧	II
SYA-10	シャクヤク	長野	2008. 06	切花用	II
SYA-11	シャクヤク	長野	2008. 06	薬用：サラベル	II
SYA-12	シャクヤク	奈良	2009. 02	薬用	I
SYA-13	シャクヤク	奈良	2006. 05	薬用	II
SYA-14	シャクヤク	新潟	2009. 08	薬用	II
SYA-17	シャクヤク	北海道	2009. 02	薬用：在来種	I

*: I, 南方系; II, 北方系

Table 2 Details of Dongbei-Gancao (東北甘草) used in this study.

試料番号	入手年月	産地	剤型	規格	個体数	ITS genotype	<i>trnH-psbA</i> genotype		
							population		
							1	2	3
Ka-1	1994年3月	吉林	生	2号	10	I-3	population 4, T-2; others, T-4		
Ka-2	1995年5月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-3	1998年11月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-4	1999年7月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-2	T-4	T-4
Ka-5	2002年9月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-6	2004年3月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-7	2005年7月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-8	2006年12月	内モンゴ	生	3号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-9	2007年2月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-10	2008年6月	内モンゴ	生	3号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-11	2009年1月	内モンゴ	生	1号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-12	2010年5月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-13	2011年3月	内モンゴ	生	2号	3	I-3	T-4	T-4	T-1

Table 3 Details of Xibei-Gancao (西北甘草) used in this study.

送付記号	入手年月	産地	剂型	規格	個体数	ITS genotype	<i>trnH-psbA</i> genotype		
							population		
							1	2	3
Ka-21	1994年10月	甘肅	生	丁級	10	I-3	population 1, T-2; others, T-4		
Ka-22	1995年9月	陝西	生	丁級	3	I-3	T-2	T-4	T-4
Ka-23	2000年8月	寧夏	生	丁級	3	I-3	T-1	T-4	T-1
Ka-24	2003年6月	內蒙古	生	乙級	3	I-3	T-4	T-4	T-4
Ka-25	2003年6月	內蒙古	生	丙級	3	I-3	T-4	T-4	T-2
Ka-26	2007年8月	內蒙古	生	丙級	3	I-3	T-2	T-2	T-1
Ka-27	2009年3月	甘肅	生	大丁	3	I-3	T-4	T-1	T-1
Ka-28	2009年12月	內蒙古	生	丙級	3	I-3	T-1	T-1	T-4

Table 4 Primer sequences used in this study

Region	Direction	Sequence (5'-3')
ITS	forward	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
	reverse	GTA GTC CCG CCT GAC CTG
<i>trnH-psbA</i>	forward	ACG GGA ATT GAA CCC GCG CA
	reverse	CAT ATG ACT TCA CAA TGT AAA ATC

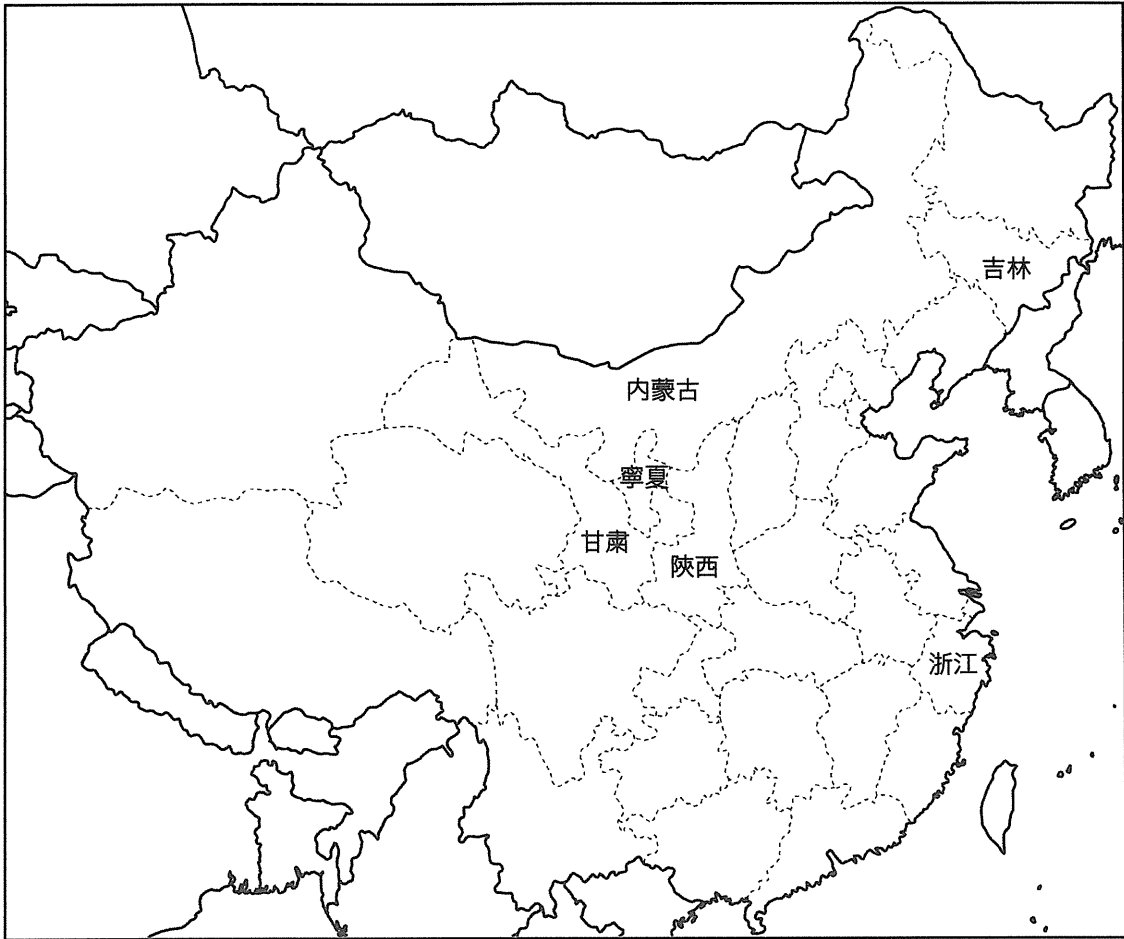


Fig. 1 Map of around China

SY-H1-C2-ITS	T G C T C G G G A T G A C G G A A G G C G T G A G C C T T T C C T T C A T C C C	80
SY-H2-C4-ITS	80
SY-N1-B1-ITS R	80
SY-T1-A3-ITS K	80
SY-Y1-A2-ITS R	80
SYA-6-A1-ITS K	80
SYA-9-A2-ITS R	80
SYA-10-A1 ITS R	80
SYA-11-A2 ITS R	80
SYA-12-A1-ITS	80
SYA-13-A1-ITS R	80
SYA-14-A1 ITS	80
SYA-17-A1-ITS	80
SY-H1-C2-ITS	C A C C C C C A A C C C G T C C A A A C T C G G G C A T G A T G G C T G G T G G	480
SY-H2-C4-ITS	480
SY-N1-B1-ITS M	480
SY-T1-A3-ITS Y	480
SY-Y1-A2-ITS M	480
SYA-6-A1-ITS	480
SYA-9-A2-ITS M	480
SYA-10-A1 ITS M	480
SYA-11-A2 ITS M	480
SYA-12-A1-ITS	480
SYA-13-A1-ITS M	480
SYA-14-A1 ITS M	480
SYA-17-A1-ITS	480
SY-H1-C2-ITS	T T T A A A A T C G A G C C C C G A G C G A C G A A C G T C A C G A C A A G T G	560
SY-H2-C4-ITS	560
SY-N1-B1-ITS	. Y	560
SY-T1-A3-ITS	560
SY-Y1-A2-ITS	. Y	560
SYA-6-A1-ITS	560
SYA-9-A2-ITS	. Y	560
SYA-10-A1 ITS	. Y	560
SYA-11-A2 ITS	. Y	560
SYA-12-A1-ITS	560
SYA-13-A1-ITS	. Y	560
SYA-14-A1 ITS	. Y	560
SYA-17-A1-ITS	560

Fig. 2 Sequence analysis results of Peony root

ITS (AB280738 = I-3)			<i>trnH-psbA</i> (AB280745 = T-2)			
Genotype	Site		Genotype	Site		
	187	411-413		72	125	171
I-1	T	TGC	T-1	C	A	T
I-2	T	CAA	T-2	C	A	G
I-3	C	TGC	T-3	T	A	T
hybrid	Y	YRM	T-4	C	G	T

Fig. 3 ITS and *trnH-psbA* genotypes of *Glycyrrhiza* root

Kondo *et al.* の報告 (Ref. 3) より一部改変して抜粋

研究分担者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 主任研究官

生薬のメタボローム研究における

試料調製法及びデータ処理に関する研究

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 若菜大悟

研究要旨 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いた生薬のメタボローム解析を適正に行うため、シャクヤクを実験材料に用い、抽出溶媒及び $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定・解析方法の検討を行った。その結果、リン酸緩衝液を用いる事で抽出量が多く、かつ pH の違いによるケミカルシフトのずれを防ぐことが可能だった。測定方法は測定範囲を広くとる事でベースラインの歪みを減少させた。また、パケット積分を 0.05 ppm 単位で行うことで、一定以上のピーク面積を持つ部分に関しては積分値と抽出濃度間で良い直線性が得られた。

研究目的 近年、多量のデータを網羅的に取得し、解析を行うオーム科学が発展し、様々な研究分野に活用されている¹⁻³⁾。我々は、生薬・漢方製剤の品質管理・評価の場におけるオーム科学の有用性を検討するため、汎用生薬の一つであるシャクヤクを材料に、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたメタボローム解析を行った。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルによるメタボローム解析の手順は、測定試料エキスの調製、 $^1\text{H-NMR}$ の測定、データ処理、そして多変量解析という流れになる (Fig. 1)。これらの手順の内、エキスの調製は、測定対象物の種類及び量、 $^1\text{H-NMR}$ 測定条件は、スペクトルデータの定量性及び定性性の精度、データ処理は、その後の多変量解析における精密度及び正確性に大きく影響を与えることから、これらの条件について、それぞれ検

討を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

シャクヤクは栃本天海堂株式会社より 17 ロット、ウチダ和漢薬株式会社より 13 ロット、医薬基盤研・薬用植物資源センター北海道研究部より 2 ロットを譲り受けた。

重溶媒は太陽日酸から購入し、重水は 99.8% のもの、重メタノールは 99.9% のものを用いた。

2. 実験方法

2-1. 試験溶液の調製

シャクヤクの粉末化は MM-300 型ボールミル (Qiagen) を用い、1 分間、 30 sec^{-1} の条件で行った。シャクヤクエキスの抽出は SR-2w 型 振とう機 (Taitec) を用い、30 分、 300 min^{-1} で行った。抽出後 3000 rpm