

ることを明らかにした。*P. lactiflora*では、ITS配列における種内多型が顕著であり、ヘテロ塩基も検出されて、交配が行われてきたことが示唆された。ITS配列の類似度により作成した“分子系統樹”では、*P. lactiflora*は2つのサブグループに区別され、サブグループ I には中国産白芍（杭白芍、亳白芍、川芍薬）と日本産芍薬（梵天）が属し、サブグループ II には中国産赤芍（多倫芍薬など）が属した（図2）。中国には遺伝的に、南方系（サブグループ I：白芍系）と北方系（サブグループ II：赤芍系）の2系統があることが明らかになった。成分分析の結果（図3）では、*P. veitchii*の根及び同種に由来する赤芍は、Paeoniflorin、PGG、Gallic acidの含量が高く、特にPGGの含量は他種の2倍以上もあった。*P. lactiflora*基原の生薬では、内モンゴル産赤芍及び内モンゴル多倫県で採集された*P. lactiflora*は、Paeoniflorinの含量が高く、それらのHPLCクロマトグラムでは、Paeoniflorinが主たる成分ピークであった。また、Paeonolの含量も白芍より高い傾向にあった。中国産白芍については、日本市場で入手した生薬はPaeoniflorin含量が27.54-43.46 mg/gであり、日本産芍薬と同等であった。一方、中国市場で入手した生薬の半数以上はPaeoniflorin含量が低く、さらにそれらのHPLCクロマトグラムでは共通して保持時間10.4分付近に、日本市場の中国産白芍及び日本産芍薬に見られない高い成分ピークが認められた。文献と比較して、このピークは伝統的な中薬加工法である硫黄燻製を行ったことにより生成した特有な成分Paeoniflorin sulphonateであると推定した。この結果から、白芍の主な産地である浙江省、安徽省、江蘇省などでは白芍の乾燥・加工時に、硫黄燻製が日常的に行われていることが示唆され、そ

れが原因でPaeoniflorin含量が低いことが判明した。中国産白芍のAlbiflorin含量は日本産芍薬よりやや高かった。日本産芍薬ではPaeoniflorin含量が21.17-41.99 mg/gであり、ITS配列から赤芍系に属する園芸品種に由来すると考えられる市場品が高含量を示した。一方、富山県で栽培された薬用品種「梵天」に由来する芍薬では、PGGの含量が比較的に高かった。

以上の研究成果を踏まえ、富山県薬用植物指導センターで系統保存されている栽培品種76品種についてITS領域の塩基配列を解析したところ、大多数が*P. lactiflora*基原であり、それらは白芍系と赤芍系に分けられた。園芸品種の中には、日本の薬用品種である「梵天」と相同の配列を示すものや、内モンゴル産*P. lactiflora*と相同の配列を持つものがあった。

そこで、今回、遺伝的系統を明らかにした栽培品種について成分的な特徴を調べ、それらの中から生薬の芍薬（白芍）または赤芍として薬用に供することができる優良品種を見出すことを目的として、8成分の定量分析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料

富山県薬用植物指導センターで系統保存されている園芸品種 97 品種及び薬用品種 2 品種（梵天、北宰相）。2007年、2009年、2010年及び2011年に、3年生～9年生の植物体を、10月末頃に収穫したもので、計 190 検体。

富山県薬用植物指導センターで育成した種苗を長野県菅平薬草栽培試験地に移し、同地で栽培された3品種（明月、梵天、ルーズベルト）の4年生の植物体の根。

根を水洗した後、通常、斜め切りの切片を

作成し、平均 18°Cの室内で自然乾燥した。

## 2. 実験方法

### 測定条件

装置: Jasco HPLC system (Pump: PU-1580, Gradient unit: LC1580-02 ternary unit, Auto sampler: AS-2057 Plus, Detector: MD-1510 Multiwavelength Detector); カラム: YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4.6 mm i.d., s-5 µm); 移動相: A: アセトニトリル、B: 0.1% リン酸水溶液。

HPLC 条件: 0-5 min, 10-15% A、5-40 min, 15-30% A、40-45 min, 30-70% A、45-46 min, 70-80% A、46-50 min, 80% A、50-55 min, 80-10% A、55-65 min, 10% A。注入量: 20 µL; 流速: 1 ml/min; カラム温度: 27°C; 検出波長: 232 nm; データ処理プログラム: ChromNAV。

### 検量線の作成

8化合物の標準品〔Paeoniflorin、Albiflorin、1,2,3,4,6-Penta-*O*-galloyl-β-D-glucose (PGG)、(+)-Catechin、Paeonol、Gallic acid、Methyl gallate、Benzoic acid〕を各々正確に量り取り、分析用メタノールに溶解して 1.0 mg/ml の標準溶液を調製した。この溶液を 5、10、50、100、500 倍と段階的に希釈して調製した 1.0 mg/ml、0.2 mg/ml、0.1 mg/ml、0.02 mg/ml、0.01 mg/ml、0.002 mg/ml の溶液を HPLC 法で分析し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

### 試料溶液の調製

各材料ともに数本の根を粉砕し、300 µm の篩を通した。得られた粉末 300 mg を正確に量り取り、遠心チューブに入れ、75%エタ

ノール 9 ml を加えて、30 分間超音波抽出を行った。遠心分離 (10 min、4000 rpm) した後、上澄み液を分取した。以上の抽出操作をさらに 2 回 (8 ml、8ml) 繰り返した後、全上澄み液を合せて 25 mL にメスアップした。そのうち約 2 ml を DISMIC-13HP disposable syringe filter 0.2 µm (東洋濾紙) でろ過して HPLC 用バイアルに入れ、分析用の試料とした。これらについて、前述した HPLC 条件で 8 成分の定量を行った。

## C. 研究結果及び考察

富山県薬用植物指導センターから入手した 99 栽培品種 (薬用 2 品種、園芸用 97 品種) では、83 品種が日本薬局方で規定される Paeoniflorin 含量 2.0% (20 mg/g) 以上を満足した。全品種の中から Paeoniflorin 含量が 2% 以下の品種を除き、次に、ITS 領域の塩基配列によりサブグループ I (白芍系) とサブグループ II (赤芍系) に属するものに分けて、Paeoniflorin 含量の高い順に並べると図 4 のようになる。同一品種を複数年に亘って収穫し、分析を行ったものについては、平均値と標準偏差 (S.D.) を示した。なお、収穫した植物体の生育年数は 3 年～9 年までのものがあり、4 年生と 8 年生のものが多い。

多くの栽培品種で成分含量のバラツキが大きかった。図 4 に示すように赤芍系と白芍系に属する各品種の間に、中国産赤芍と中国産白芍に見られたような差異はなく、ともに Paeoniflorin 含量が約 21 mg/g～46 mg/g を示した (図 4-1)。他の 6 成分の含量をまとめた図 4-2 から、赤芍系では、S26、S23、S85、S62、S25、S7、S2、S39 が、白芍系では、S11、S9、S19 が PGG を比較的多く含み、また、赤芍系の S1 と S78 が Paeonol を他種より多く含んで

いた。S78はさらにMethyl gallateの含量も高かった。白芍系に属する薬用品種の梵天(S34)と北宰相(S31)では、Paeoniflorin含量を高めるように品種改良された後者でPaeoniflorin含量が高く、生育年数による変動も少なかったが、梵天に比べるとPGG含量が低かった。

今回検討した栽培品種及びこれまでに解析した *Paeonia* 属植物と芍薬市場品(中国産白芍市場品で Paeoniflorin sulphonate が検出されたものを除く)の全検体の Paeoniflorin、Albiflorin、PGG、Gallic acid、(+)-Catechin 及び Paeonol の含量の平均値を用いて、主成分分析を行った(図5)。第1主成分と第2主成分の寄与率は35.89%と27.53%であった。第1主成分と第2主成分を使用することでデータに対する累積寄与率が60%を超え、両主成分によりデータを説明することができる。主成分分析においては、*P. veitchii* の根と同種に由来する赤芍、及び *P. anomala* は、それぞれ *P. lactiflora* と明確に区別された。*P. lactiflora* では、内モンゴル産赤芍及び内モンゴル多倫県で採集された *P. lactiflora* は、中国産白芍及び日本産芍薬と明瞭なグループ分けが可能であった。富山県薬用植物指導センターの栽培品種では、ITS領域の遺伝子解析で赤芍系または白芍系とした品種は、必ずしもすべてが、それぞれ中国産赤芍市場品または中国産白芍(日本産芍薬)市場品と同様な場所に位置するものではなかった。栽培品種のうち中国産赤芍市場品の位置に近いものとして、赤芍系に属する品種のS1(春の粧)、S48(花籠)及びS78(エジュリスパーパー)が認められた。また、白芍系では「梵天」に由来する日本産芍薬に位置が近いことより、S11(明月)、S9(ブライダルアイシン

グ)及びS19(ハーモニー)が選出された。それらは薬用に供することができるものと考えられた。

次に、シャクヤクの生育環境の違いが各成分の含量に及ぼす影響を検討した。白芍系の栽培品種であるS11(明月)とS34(梵天)、赤芍系の栽培品種であるS32(ルーズベルト)について、富山県薬用指導センターで栽培した4年生の植物体と、同センターで育成した種苗を長野県菅平栽培試験地に移し、同地で栽培した4年生の植物体との成分差異を検討した。その結果(図6)、3品種ともに、長野県菅平で栽培したもので、Paeoniflorin、Albiflorin及びCatechinの含量が増加し、反対にPGGとGallic acidの含量が減少した。長野県菅平ではこの4年間(2008~2011年)、8月の日平均が18.5~21.0℃、1月の日平均が-9.5~-5.37℃であり、富山県上市とは10℃以上の差がある。また、湿度もかなり異なることから、シャクヤクの生育環境が成分に及ぼす影響は大きいものと考えられる。この結果より、中国産赤芍と白芍の成分的な違いは遺伝的要因のみならず、環境要因も関与することが示唆された。

#### D. 結論

富山県薬用植物指導センターで栽培されているシャクヤク99品種について、ITS配列により白芍系と赤芍系に分けた上で、薬理活性が報告されている8成分の定量分析を、主として4~8年生の根について行った。すでに定量済みの中国産赤芍と白芍及び日本産芍薬の各市場品の成分含量を含めて主成分分析を行い、生薬との類似性から赤芍または白芍(芍薬)として薬用に供することができる園芸品種を各3品種選出した。また、

3品種の種苗を富山県上市及び長野県菅平で4年間栽培し、根の成分含量を両地域で比較した結果、Paeoniflorin 含量は後者で、一方Pentagalloylglucose 含量は前者で高いことが判明した。

今後、選択した栽培品種の薬理作用を検討することにより、品質上の特徴を明らかにし、栽培拡充を図るとともに、ブランド生薬として開発する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) Zhu S., Yu X. L., Shiraishi F., Komatsu K., Murakami M., Tamura T.: Genetic characterization of White/Red Peony roots and the horticultural varieties of *Paeonia lactiflora*. The 7th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy (2012.8.23-25, Seoul, Korea).

2) Zhu S.: Genetic and chemical characterization

of white/red peony roots and the horticultural cultivars of *Paeonia lactiflora*. The 5th International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine—Basic and Clinical Research on Traditional Medicine, Hokuriku Innovation Cluster for Health Science (2012.10.13, Toyama).

3) 朱姝, 于曉麗, 白石史遠, 小松かつ子, 村上守一, 田村隆幸: Genetic characterization of White/Red Peony roots and the horticultural cultivars of *Paeonia lactiflora* by nuclear rDNA ITS sequences.

日本薬学会第133年会 (2013.3.28-30, 横浜).

4) 于曉麗, 朱姝, 吳煜秋, 小松かつ子, 村上守一, 田村隆幸: 芍薬の成分的多様性の解析(2)—白芍・赤芍の成分的差異と園芸品種の薬用資源としての可能性. 日本薬学会第133年会 (2013.3.28-30, 横浜).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

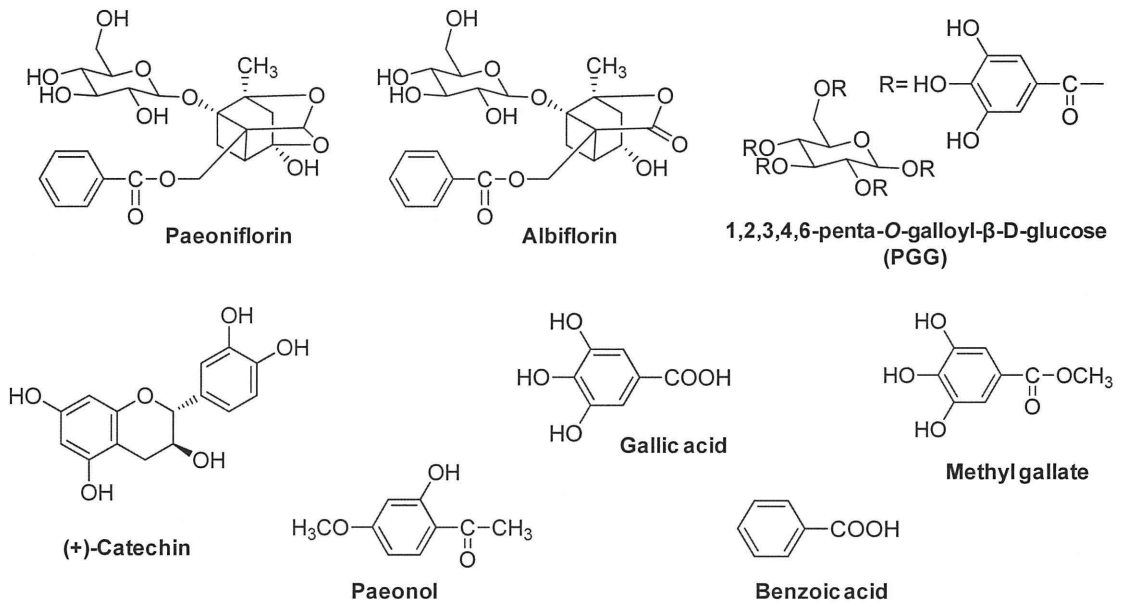


図1 定量分析に用いた成分の構造式

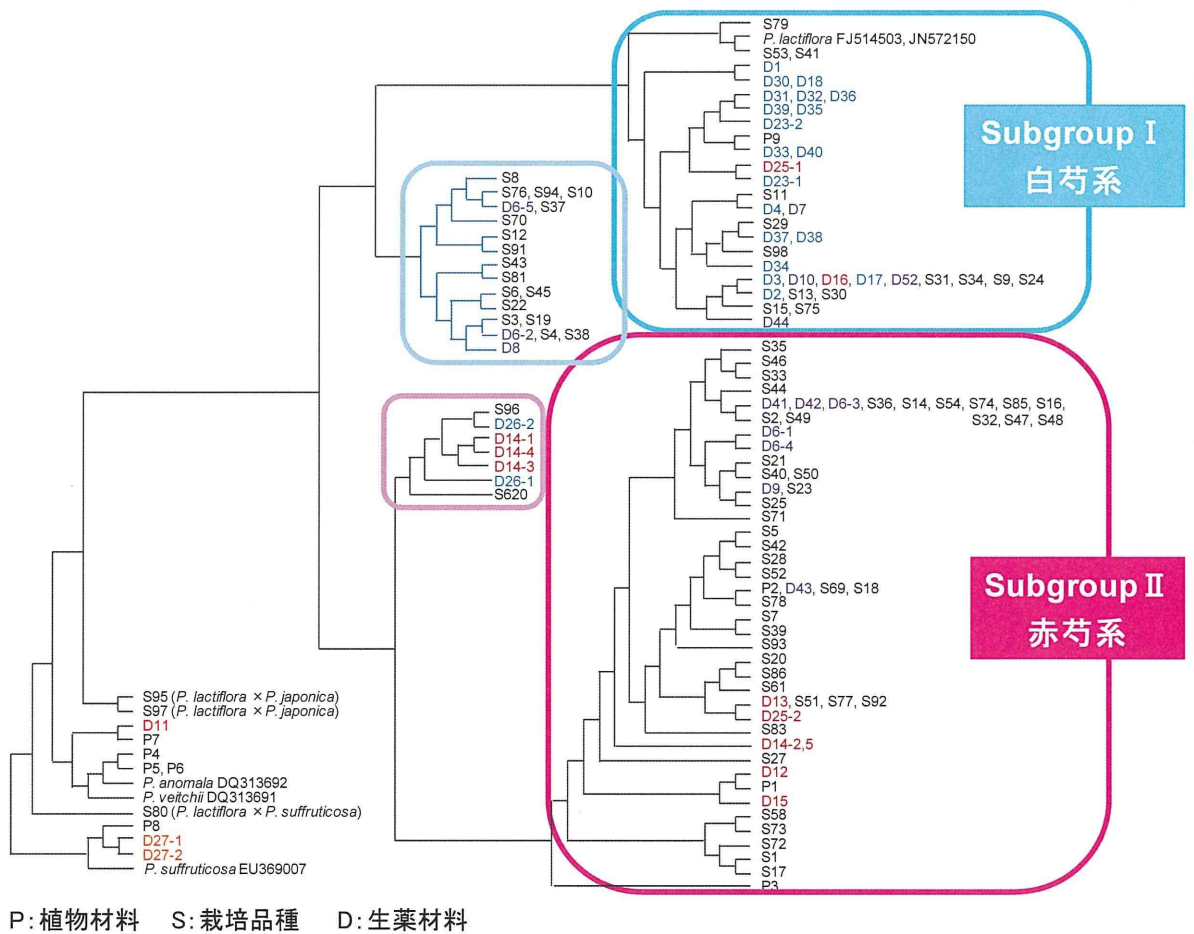


図2 ITS領域の塩基配列における類似度  
(多重配列アライメントにおける案内木“系統樹”)

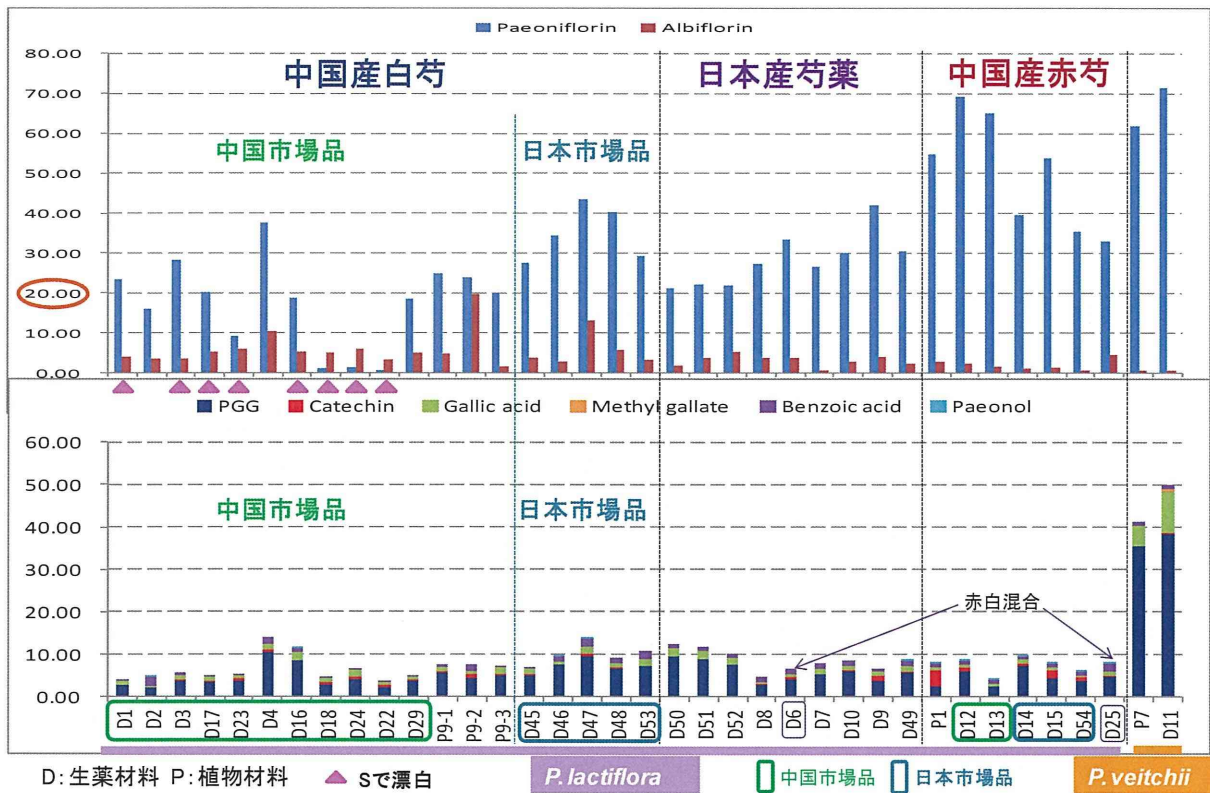
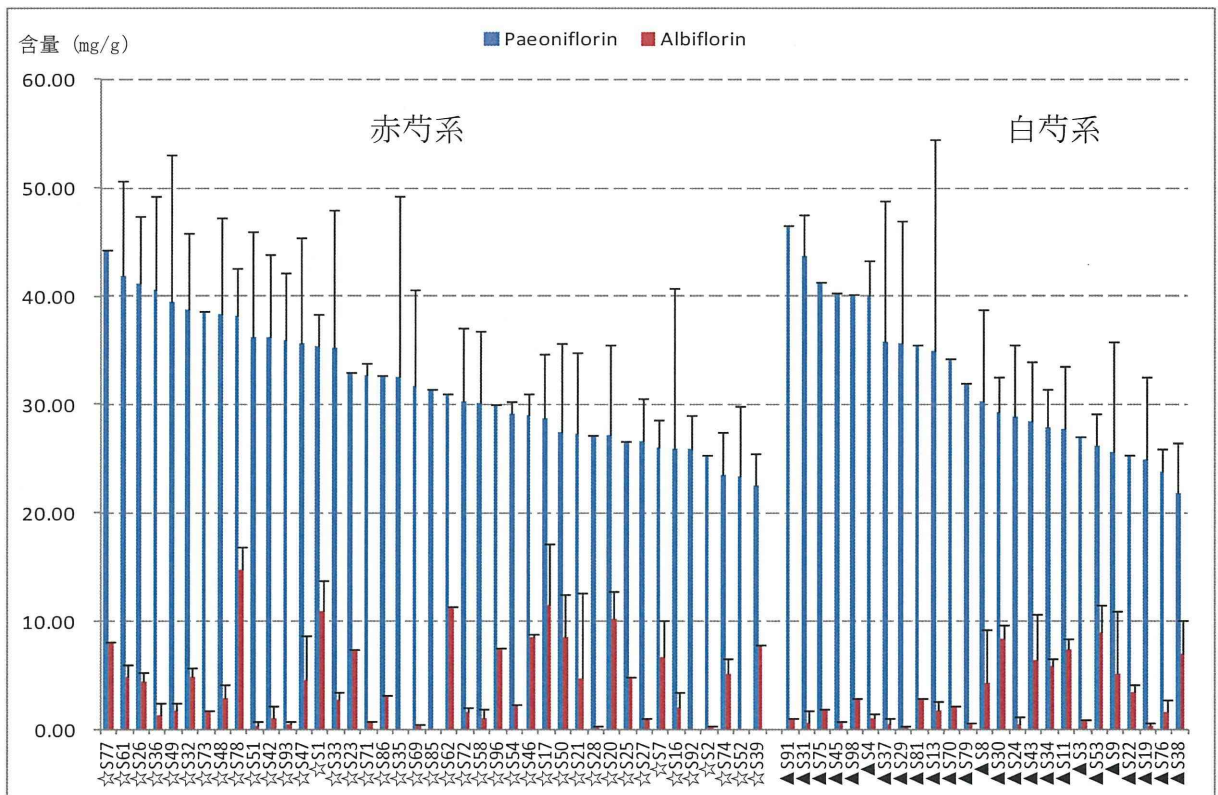


図3 芍薬市場品と *Paeonia* 属植物の根の成分含量



(平均値±標準偏差)

図 4-1 富山県薬用植物指導センターから入手した栽培品種のうち、Paeoniflorin 含量が 2.0%以上の品種の 2 成分の含量

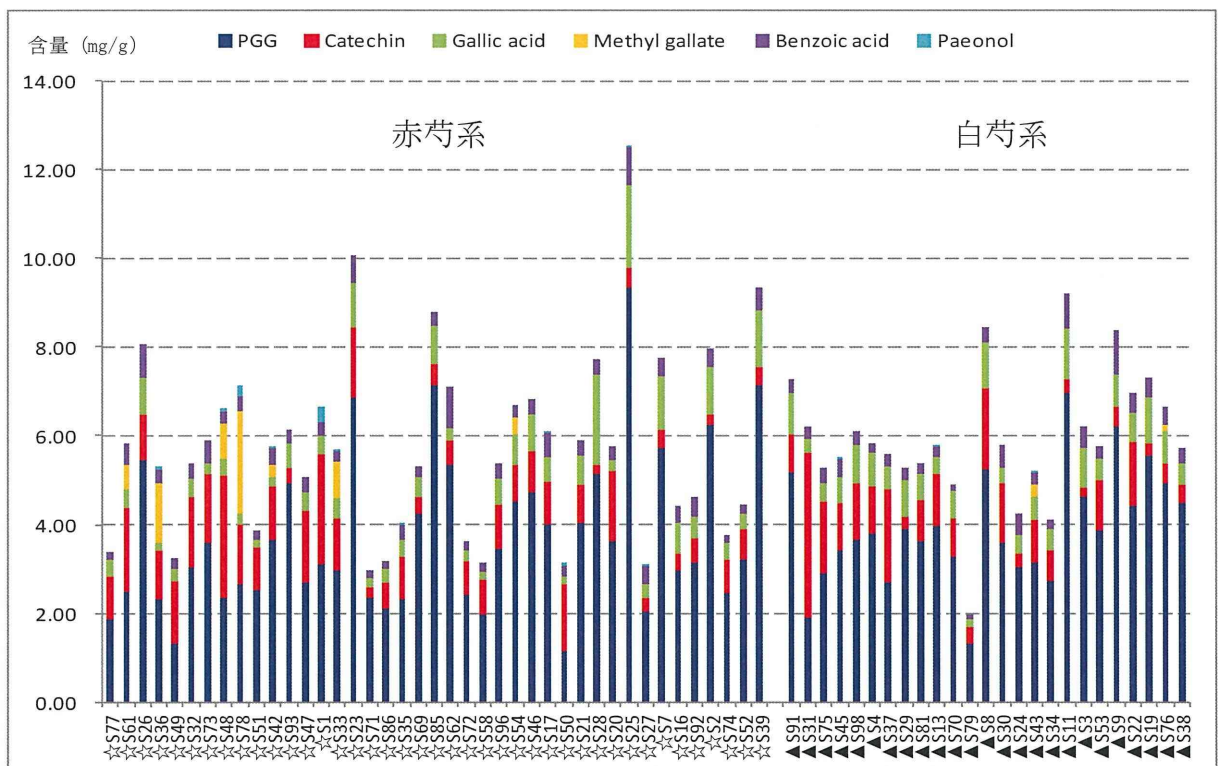


図 4-1 富山県薬用植物指導センターから入手した栽培品種のうち、Paeoniflorin 含量が 2.0%以上の品種の 6 成分の含量

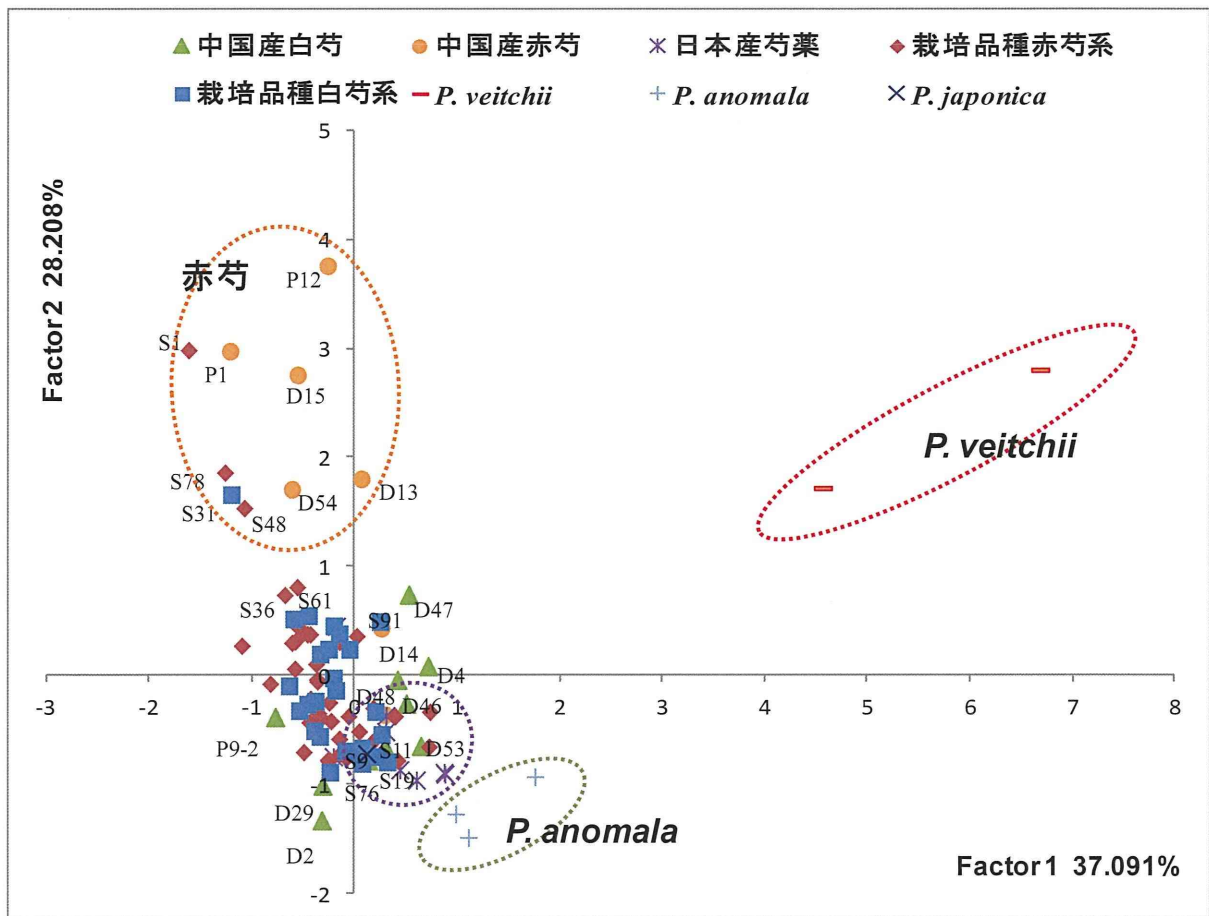
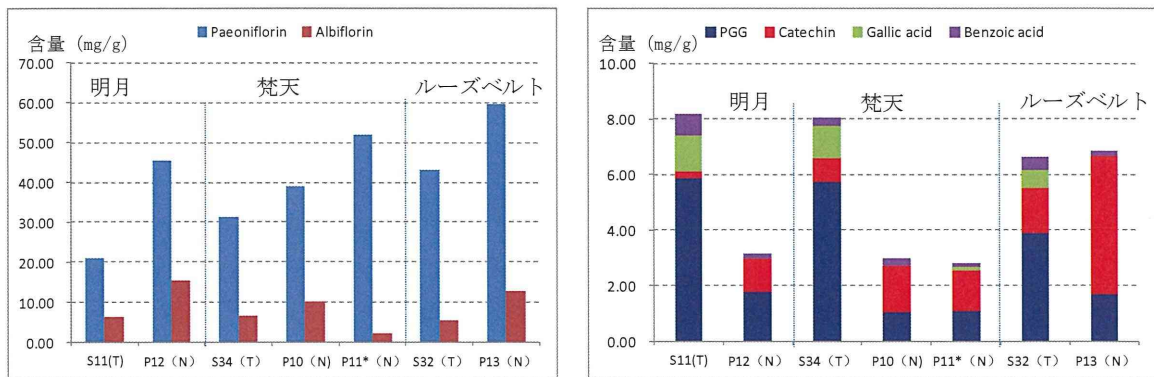


図5 Paeoniflorin、Albiflorin、PGG、Catechin、Gallic acid、Paeonol の6成分の定量値を用いた主成分分析



T: 富山県薬用植物指導センターの栽培品 (4年生)  
 N: 富山県薬用植物指導センターの種苗 (根) を長野県菅平試験地で栽培したもの (4年生)  
 \*: 長野県菅平試験地での栽培品 (4年生)

図6 栽培地 (環境) の違いによる成分含量の変化



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉松嘉代	薬用植物組織培養物コレクションについて	日経バイオテクノロジー オンライン GreenInnovation	219		2012
吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸	植物工場での甘草生産に適したウラルカンゾウの選抜と育成	ブレインテクノロジー ニュース	149	1-9	2012
吉松嘉代	甘草の水耕栽培 薬用植物資源の保護と確保	ファルマシア	49	141-146	2013
吉松嘉代	植物工場における薬用植物優良苗の育成と生産	SHITA REPORT No.30, 日本生物環境工学会, 京都		13-21	2013
Sun, R., Hikosaka, S., Goto, E., Sawada, H., Saito, T., Kudo, T., Ohno, T., Yoshimatsu, K., Kawano, N., Inui, T. and Kawahara, N.	Effects of post-harvest storage and drying temperatures on four medicinal compounds in the root of Chinese licorice ( <i>Glycyrrhiza uralensis</i> )	Environmental Control in Biology		in press	2013
Sun, R., Hikosaka, S., Goto, E., Sawada, H., Saito, T., Kubo, T., Ohno, T., Shibata, T., Yoshimatsu, K.	Effect of UV irradiation on growth and concentration of four medicinal ingredients in Chinese Licorice ( <i>Glycyrrhiza uralensis</i> )	Acta Horticulturae	956	643-648	2012
Watanabe-Ishizuka, A., Akiyama, H., Kondo, K., Obitsu, S., Kawahara, N., Teshima, R., Goda, Y.	Determination of Cyanogenic Glycoside Linamarin in Cassava Flour using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	<i>Jpn. J. Food Chem. Safety</i>	19	38-43	2012
Watanabe, S., Taguchi, H., Temmei, Y., Hirao, T., Akiyama, H., Sakai, S., Adachi, R., Urisu, A., Teshima, R.	Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction	<i>J. Agric. Food Chem.</i>	60	2108-2115	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishizaki, S., Sakai, Y., Yano, T., Nakano, S., Yamada, T., Nagashima, Y., Shiomi, K., Nakao, Y., Akiyama, H.	Specific Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of Potentially Allergenic Salmonid Fish Residues in Processed Food	<i>Biosci.</i> <i>Biotechnol.</i> <i>Biochem</i>	76	980-985	2012
Tsuruda, S., Akaki, K., Hiwaki, H., Akiyama, H.	Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of <i>Omphalotus guepiniformis</i> and <i>Lentinula edodes</i>	<i>Biosci.</i> <i>Biotechnol.</i> <i>Biochem</i>	76	1343-1349	2012
Katayama, S., Kukita, T., Ishikawa, E., Nakashima, S., Masuda, S., Kanda, T., Akiyama, H., Teshima, R., Nakamura, S.	Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells	Food Chem	138	757-761	2013
Yoshimura, M., Akiyama, H., Kondo, K., Sakata, K., Matsuoka, H., Amakura, Y., Teshima, R., Yoshida, T.	Immunological effects of oenothien B, an ellagitannin dimer, on dendritic cells	Int J Mol Sci.	14	46-56	2012
穂山浩、大月典子	カロテノイド摂取と食物アレルギー発症の予防	Functional Food	6	191-197	2013

