

③アライメントから作成した有根系統樹(UPGMA) の画像(png)を表示



図 27. モデル試料カテゴリ横断的データ表示機能の改修

③アラインメントから作成した有根系統樹の表示

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの
拡充と情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 データベース構築及び遺伝子鑑別情報に関する研究
ー生薬（キジツ、エンゴサク）の遺伝子情報についてー

分担研究者 河野 徳昭 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
筑波研究部主任研究員

生薬キジツ、エンゴサクの2種の生薬について基原植物鑑別に関する情報の収集、
ならびに各生薬のモデル生薬の鑑別対象領域の塩基配列解析を行った。

キジツの国内流通生薬モデル試料 21 試料、43 検体について、核リボソーム DNA
ITS1 領域の解析を行ったところ、国内流通品のほぼすべてが *Citrus aurantium* また
は *C. hassaku* の ITS1 領域と同一もしくは非常に相同性の高い遺伝子型を有すること
が判明した。すなわち、国内に流通するキジツの多くは *C. aurantium*, *C. hassaku* 及
びこれらの近縁種を基原とするものであることが明らかになった。同領域の多型情
報により、これらと *C. sinensis* や *C. unshiu* を区別することが可能であり、本領域の
多型情報はキジツの遺伝子鑑別において有用であると考えられる。

エンゴサクの国内流通生薬モデル試料 15 試料、38 検体について葉緑体 DNA *trnL*
intron 領域の塩基配列情報（301 bp）を解析・収集した。その結果、国内に流通する
エンゴサクはいずれも *Corydalis turtschaninovii* を基原とするものと判断された。

以上の塩基配列解析及び基原植物鑑別結果は、データベースの遺伝子鑑別情報の
カテゴリーに収載される。

A. 研究目的

本研究においては、「薬用植物栽培並び
に関連産業振興を指向した薬用植物総合情
報データベースの拡充と情報整備に関する
研究」の一環として、薬用植物資源の安定
供給を志向し、生薬情報の多様性の確認を
目的として、生薬及びそれらの基原植物の
遺伝子鑑別法に関する情報の収集ならびに、
市場流通モデル試料の遺伝子情報の集積に
より、生薬の遺伝子鑑別に関する情報の整
備を行う。

成分情報等生薬に関する多角的な情報と

ともに遺伝子鑑別法のデータベース化を行
うことは、国内に流通する生薬の安全性の
確保ならびに品質の向上に貢献するものと
期待される。

本報告書では、生薬キジツ、エンゴサク
の遺伝子鑑別に関する情報について報告す
る。

B. 研究方法

B-1. キジツ

生薬キジツの基原植物についての、第十
六改正日本薬局方（平成 23 年 3 月 24 日 厚

生労働省告示第 65 号) の記述は下記のとおりである。

「枳実 Immature Orange AURANTII FRUCTUS IMMATURUS

本品はダイダイ *Citrus aurantium* Linné var. *daidai* Makino, *Citrus aurantium* Linné 又は ナツミカン *Citrus natsudaiddai* Hayata (*Rutaceae*) の未熟果実をそのまま又はそれを半分に横切したものである。」

また、参考情報 (日本薬局方の学名表記と分類学的に用いられる学名表記) には、下記の記述がある。

「ダイダイ *Citrus aurantium* Linné var. *daidai* Makino =

Citrus aurantium L. var. *daidai* Makino

Citrus aurantium L. 'Daidai'

Citrus aurantium Linné =

Citrus aurantium L.

ナツミカン *Citrus natsudaiddai* Hayata

ハッサク *Citrus aurantium* L. subsp. *hassaku* (Tanaka) Hiroe

Citrus hassaku hort. ex Tanaka」

供試生薬試料

本研究に供した生薬キジツの市場流通品モデル試料は表 1 のとおりである。NIB-0830 については試料が少量であったため、遺伝子情報の取得には供試しなかった。

生薬キジツの遺伝子鑑別に用いる遺伝子領域の選定

Yamaji らの、核リボソーマル DNA ITS 領域の遺伝子多型の組成比較によるカンキツ類栽培種の起源の解明についての報告 (文献 1) により、ITS1 領域の多型情報 (表 2 に抜粋) を用いることで鑑別対象種のカンキツ類を識別することが可能と考えられたので、生薬キジツの遺伝子情報の収集対象領域として ITS1 領域を選択した。

生薬キジツからのゲノム DNA 調製及び PCR 増幅

遺伝子解析用に提供されたキジツ各試料について、刻み試料の場合は、異なる刻み片 1 片を 1 検体とすることとして、1 試料から無作為に 2 検体をサンプリングした。刻み以外の試料については、試料片 1 個から 1 検体を調製することとし、1 試料から無作為に 2 検体をサンプリングした。なお、PCR 増幅が不調な場合は、検体数を追加した。

DNA 調製には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用した。上記のように調製した生薬検体を個別に直径 4.8 mm のステンレスボールと共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に 5 分間浸漬したのち、MS-100 (TOMY) にセットし 2,500 rpm で 1 分間破碎した。破碎粉末に 1 mL の DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1 バッファー及び 2 µL の RNase (キット添付のもの) を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。最終的にゲノム DNA は 50 µL の AE バッファーで溶出し、その 1 µL を PCR に使用した。

核 DNA ITS 領域の増幅・塩基配列解析

以下に、KOD-plus (TOYOBO) を PCR 酵素に使用した ITS 領域 (ITS1-ITS2 または ITS1 のみ) の増幅～遺伝子解析の流れについて記す。

PCR reaction mixture: water 35 µl, KOD-plus Buffer 5µl, dNTP mix 5µl, MgSO₄ 2µl,

KOD-plus 1µl, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 µl each,

genome DNA 1 µl (reaction volume: 50 µl)

PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 58°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 35 - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Primers: ITS5 (sense): 5'-GGA AGT AAA

AGT CGT AAC AAG G-3'

ITS-NIHS-rev (antisense): 5'-GTA GTC CCG

CCT GAC CTG-3'

ITS1-NIHS-rev (antisense): 5'-TAT CCG TTG

CCG AGA GTC-3'

PCR 産物は、アガロース電気泳動で増幅パターンの解析を行った。

クローニングを行う場合は、PCR 増幅産物を Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System (Promega) でゲル精製し、末端 A 付加ののち、T-vector にクローニングし、各検体について 7~9 クローン塩基配列の解析を行った。

ダイレクトシーケンシングの場合は、Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System (Promega) を使用し、未反応のプライマー及び、プライマーダイマー等のサイズの小さな非特異的増幅産物を除き、サイクルシーケンシング反応の鋳型として用いた。

サイクルシーケンシング反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用い、塩基配列解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer、80 cm キャピラリー、POP-7 ポリマー (ABI) を用い、データ解析には DNASIS-Mac v3.7 (Hitachi Software), Finch TV (Geospiza Inc.) を使用した。

分子系統樹解析は DDBJ が提供する ClustalW (ver 2.1) で行い、系統樹描画には TreeView (Win32) ver. 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) を使用した。

B-2. エンゴサク

生薬エンゴサクの基原植物についての、第十六改正日本薬局方（平成 23 年 3 月 24 日 厚生労働省告示第 65 号）の記述は下記のとおりである。

「延胡索 *Corydalis Tuber* CORYDALIS TUBER 本品は *Corydalis turtschaninovii*

Besser forma *yanhusuo* Y. H. Chou et C. C. Hsu (*Papaveraceae*) の塊茎である。」

また、参考情報（日本薬局方の学名表記と分類学的に用いられる学名表記）には、下記の記述がある。

「*Corydalis turtschaninovii* Besser forma *yanhusuo* Y. H. Chou et C. C. Hsu = *Corydalis turtschaninovii* Besser f. *yanhusuo* (W. T. Wang) Y. H. Chou & C. C. Hsu W. T. Wang *Corydalis yanhusuo*」

供試生薬試料

本研究に供した生薬エンゴサクの市場流通品モデル試料は表 1 のとおり。

生薬エンゴサクの遺伝子情報収集対象領域の選定

エンゴサクの基原植物鑑別に用いる遺伝子領域の候補としては、核リボソーム DNA の ITS 領域が混合波形となり解析が困難であるという情報を富山大学小松かつ子教授より得たので、葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域を解析対象とした。

Corydalis 属植物葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域の遺伝子情報の取得および解析対象領域の決定

エンゴサクが含まれる *Corydalis* 属植物の葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域については国際遺伝子情報データベース (EMBL/GenBank/ DDBJ) に収載された情報が、10 件 (表 2) と限定的であったため、*Corydalis* 属植物の同領域の標準となる塩基配列情報を取得するため、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において栽培維持されているエンゴサク 3 種、*Corydalis turtschaninovii* (エンゴサク、中国、15384)、*Corydalis nakaii* (*C. ternata*) (コウライエンゴサク、韓国、6175)、*Corydalis ambigua* (エゾエンゴサク、13195)

を基準植物種とし、これらの植物の *trnL-trnF* 領域の遺伝子配列情報を後述の方法で解析した。得られた配列情報を精査し、生薬エンゴサクの遺伝子鑑別に使用する領域の絞込み (*trnL-intron* 領域に決定した) 及び、同領域の PCR 増幅に使用するプライマーデザインを行った。

エンゴサク植物体及び生薬エンゴサクからのゲノム DNA 調製及び PCR 増幅

エンゴサク植物体については、塊茎 1 個体を 1 検体として、各植物種より 2 検体のゲノム DNA 調製用試料を調製した。

エンゴサクの刻み試料については、異なる刻み片 1 片を 1 検体として、1 試料から無作為に 2 検体をサンプリングした。刻み以外の試料は、試料片 1 個から 1 検体を調製し、1 試料から無作為に 2 検体をサンプリングした。なお、PCR 増幅が不調な場合はそれぞれ検体数を追加した。

DNA 調製キットは DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を標準的に使用した。上記のように調製した塊茎または生薬片約 20-50 mg を個別に直径 4.8 mm のステンレスボールと共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に 5 分間浸漬したのち、MS-100 (TOMY) にセットし 2,500 rpm で 1 分間破碎した。破碎粉末に 1 mL の DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1 バッファー及び 2 µL の RNase (キット添付のもの) を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。最終的にゲノム DNA は 50 µL の AE バッファーで溶出し、その 1 µL を PCR に使用した。

葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域および *trnL-intron* 領域の PCR 増幅には基本的に KOD-plus を使用し、アニール 58°C、35 サイクルで行った。生薬由来のゲノム DNA を鋳型とする場合は必要に応じ 40 サイクルにサイクル数を増やし PCR を行った。

葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域および *trnL-intron* の増幅・塩基配列解析

以下に、KOD-plus (TOYOBO) を PCR 酵素に使用した標準的な各遺伝子領域の増幅～遺伝子解析の流れについて記す。

PCR reaction mixture: water 35 µl, KOD-plus Buffer 5µl, dNTP mix 5µl, MgSO₄ 2µl, KOD-plus 1µl, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 µl each,

genome DNA 1 µl (reaction volume: 50 µl)

PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 58°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 35 - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

また、使用した PCR プライマーの配列は下記のとおり。

[*trnL-trnF* 領域増幅用プライマーセット]

Primers: *trnL*-fwd: 5'-cgaaatcggtagacgctacg-3'

trnF-rev: 5'-atttgaactggtgacacgag-3'

[*trnL-intron* 領域増幅用プライマーセット]

Primers: *trnL*-fwd: 5'-cgaaatcggtagacgctacg-3'

trnL-intron-rev: 5'-ctgaattgtggggatcgattc-3'

なお、*trnL-trnF* 領域増幅用プライマーは、Taberlet, P. et al. *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105-1109 (1991) に記載されている primer c: *trnL*-fwd、primer f: *trnF*-rev にそれぞれ対応する。

得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析したのち、単一バンドの場合は Illustra ExoStar (GE ヘルスサイエンス) を用い未反応のプライマーを除去し、これを鋳型としてダイレクトシーケンシングを行った。非特異的な増幅産物が認められた場合は、標的領域の増幅産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル精製し、これを鋳型としてダイレクトシーケンシングを行った。

ダイレクトシーケンシングは、標的領域の増幅に用いたプライマーを用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)

でシーケンシングサイクル反応を行った。塩基配列解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer, 80 cm キャピラリー、POP-7 ポリマー (ABI) を用い、データ解析には DNASIS-Mac v3.7 (Hitachi Software) , Finch TV (Geospiza Inc.) を使用した。

C. 研究結果

C-1. キジツ

キジツモデル生薬 ITS 領域の PCR 増幅及び塩基配列解析

キジツモデル試料 21 試料、43 検体について ITS1 領域の塩基配列情報を取得した。ダイレクトシーケンスの結果のうち、基原植物の鑑別に肝要と考えられる塩基についてまとめたものが表 3 である。表の塩基番号は Yamaji らの報告の Fig.1 に従い、*C. hassaku*, *C. natsudaikai*, *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. unshiu*, *C. reticulata* の鑑別に肝要な変異点のみ抽出した。なお、これらの変異点のみでは、植物種を一意的に特定することはできず、例えば *C. aurantium* と *C. neoaurantium* を区別することはできない。

これらの変異点について、Yamaji らの報告する ITS 領域の変異点情報と比較し、これらが一致したものについて、基原植物種の判定結果を“judge”の欄に記した。

その結果、国内の四国産の試料のうち、PCR 増幅産物が得られたものは *C. hassaku* を基原とするものが多く、中国浙江省産の試料は *C. aurantium* を基原とするものが多数であることが明らかになった。

NIB-0813 (2 検体)、0814 (2 検体)、827 (2 検体)、829 (1 検体)、833 (2 検体) の 5 試料、9 検体については、Yamaji らの分類表において一致する配列型がなかったが、いずれも *C. natsudaikai*, *C. aurantium* と高度に近縁な配列型を有することが確認された。なお、NIB-0817, NIB-0821 については今回適用したゲノム DNA 調製および PCR の手

法では、増幅産物を得ることができなかった。

NIB-0815、NIB-0822、NIB-1122 の 3 試料については、ダイレクトシーケンス、クローニング&シーケンシングの両手法を適用し解析を行ったので、以下に詳細を記す。なお、Yamaji らの報告するカンキツ類植物の推定交配親の代表的リボタイプ 18 種と、今回、上記 3 種についてクローニング&シーケンシングにより得られた ITS1 の配列型について系統樹解析を行った結果及び、リボタイプの出現頻度を図 1 に示す。

[NIB-0815 (中国江西省産)]

NIB-0815 の検体#1 は、ダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類において一致する遺伝子型が存在しなかった。このサンプルについて、PCR 産物をクローニングしたのち塩基配列に供した結果、判明したリボタイプの構成は、Yamaji らの報告に当てはめると E (3 types) (MANDARIN), M (PUMMELO), N (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 6 タイプであり、これらにより生じると推定される混合塩基は表 3 のようになった。

NIB-0815 の検体#2 は、ダイレクトシーケンスでは *C. sinensis* 型と判定された。このサンプルについて PCR 産物をクローニングしたのち塩基配列に供した結果のクローンの混合塩基パターンは表 3 に示すように、ダイレクトシーケンスの結果と同様であった。クローニングにより判明したリボタイプの型は、E (2 types) (MANDARIN), J [PPWS (推定母種) 5], M (PUMMELO), N (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 6 タイプの混合であり、Yamaji らの報告する *C. sinensis* のリボタイプ (E, J, Q の 3 タイプの混合) と比較して複雑な構成であることが判明した。

[NIB-0822 (中国浙江省産)]

NIB-0822 の検体#1 はダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類の *C. aurantium* 型と判定された。この検体についてクローニング&シーケンシングに供したところ、リボタイプは E (MANDARIN), O (PUMMELO), P (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 4 タイプにより構成されることが明らかになり、これらのリボタイプから推定される ITS1 の混合塩基の波形は表 3 のようになった。表 3 の 71 番目の塩基がダイレクトシーケンスでは T であったが、推定混合塩基では Y (T/C) となったが、これはリボタイプ Q に由来するものである。

NIB-0822 の検体#2 はダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類の *C. aurantium* 型と判定された。

NIB-0822 の検体#3 は、クローニング&シーケンシングに供したところ、リボタイプは E (MANDARIN), N (PUMMELO), O (PUMMELO), P (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 5 タイプにより構成されることが明らかになり、これらのリボタイプから推定される ITS1 の混合塩基の波形は表 3 のようになった。表 3 の 71 番目の塩基がダイレクトシーケンスでは T であったが、推定混合塩基では Y (T/C) となったが、これはリボタイプ Q に由来するものである。Yamaji らの報告では、*C. aurantium* のリボタイプ構成は、E, O, P の 3 タイプであり、NIB-0822 は検体#1, #3 の両者とも、リボタイプ構成要素が多いことが明らかになった。

[NIB-1122 (中国浙江省産)]

NIB-1122 の検体#1 については、ダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類の *C. natsudaidai* 型と判定された。本検体についてクローニング&シーケンシングに供した

ところ、リボタイプは E (2 タイプ) (MANDARIN), N (3 タイプ) (PUMMELO), I [PPWS (推定母種) 4] の 6 タイプから構成されることが明らかになった。Yamaji らの柑橘類のリボタイプ構成解析によると、リボタイプ I を有すると報告されているものは *C. natsudaidai* (リボタイプ構成:F, I, N) のみであり、検体#1 は *C. natsudaidai* と近縁の植物を基原とすると推定される。

NIB-1122 の検体#2 については、ダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類に一致する植物種がなかった。本検体についてクローニング&シーケンシングに供したところ、リボタイプは D (3 タイプ) (MANDARIN), K [PPWS (推定母種) 5], M (2 タイプ) (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 7 タイプから構成されることが明らかになった。

C-2. エンゴサク

エンゴサク植物体 *trnL-trnF* 領域の塩基配列解析及びモデル試料解析用プライマーデザイン

Corydalis turtschaninovii (エンゴサク、中国)、*Corydalis nakaii* (*C. ternata*) (コウライエンゴサク、韓国)、*Corydalis ambigua* (エゾエンゴサク) の 3 種の *Corydalis* 属植物の *trnL-trnF* 領域の塩基配列を多重整列解析した結果を図 1 に示す。この図に示すように、本領域は植物種間の多型に富み、とくに前半の *trnL*-intron に対応する 301 bp の配列情報により生薬エンゴサクの基原植物種の鑑別が可能であることが判明した。そこで、この *trnL*-intron 領域について、3 植物種共に PCR 増幅が可能なプライマーとして、実験の項に記載の *trnL*-intron 増幅用プライマーを設計した。

エンゴサクモデル試料葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域の増幅・解析

エンゴサクモデル試料各検体（表 1）より DNeasy Plant Mini Kit を用い調製したゲノム DNA を鋳型として KOD-plus により *trnL*-intron 領域の増幅及び塩基配列の解析を行った。その結果、*trnL*-intron 領域の塩基配列は、いずれの生薬検体についても同一であり、これらは北海道研究部の *Corydalis turtschaninovii*（エンゴサク、中国）由来のものと同一であった。すなわち、今回供試したエンゴサクモデル試料は、いずれも *Corydalis turtschaninovii* を基原とするものであることが確認された。

D. 考察

D-1. キジツ

キジツモデル試料 NIB-0817, NIB-0821 については今回適用したゲノム DNA 調製および PCR の手法では、増幅産物が得られなかった。これは、両者の入手年がそれぞれ 2003 年及び 2006 年と古く、経年による核酸の分解が原因と推定される。陳旧品を良品とするキジツの遺伝子鑑別においては、今後、経年サンプルを材料とした場合の遺伝子鑑別手法の確立が課題と考えられる。

D 社からは参考品として、市場流通品ではない試料の提供を受けた。これらは ITS1 領域の解析の結果、NIB-0818 は *C. sinensis*, NIB-0820, NIB-0831, NIB-0832 の 3 試料は *C. unshiu* と判別され、本遺伝子領域がキジツの基原植物種推定に有用であることが示された。

D-2. エンゴサク

エンゴサクモデル試料のうち、入手年が 1987 年の試料については塩基配列解析に成功した検体が 4 検体中 1 検体のみであった。これは経年により核酸が分解されていたためと考えられる。2001 年以降の入手年の検体については、標的領域の PCR 増幅及び塩基配列解析においてとくに問題は生じ

なかった。

今回、北海道研究部保有の *Corydalis* 属植物 3 種の遺伝子情報を取得したが、国内に産するジロボウエンゴサク *Corydalis decumbens* やヤマエンゴサク *C. lineariloba* についても、遺伝子資源として興味が持たれる。

今後、ジロボウエンゴサクや、*Corydalis* 属植物の今回解析した系統以外の個体等の遺伝子情報についても収集する必要があると考えられる。

E. 結論

本年度は、キジツ及びエンゴサクの 2 種の生薬について各生薬のモデル生薬の遺伝子鑑別対象領域の塩基配列解析を行った。

キジツについては国内流通生薬モデル試料 21 試料、43 検体について、核リボソーム DNA ITS1 領域の解析を行ったところ、国内流通品のほぼすべてが *C. aurantium* または *C. hassaku* の ITS1 領域と同一もしくは非常に相同性の高い遺伝子型を有することが判明した。すなわち、国内に流通するキジツの多くは *C. aurantium*, *C. hassaku* 及びこれらの近縁種を基原とするものであることが明らかになった。また、エンゴサクについては国内流通生薬モデル試料 15 試料、38 検体について葉緑体 *trnL*-intron 領域の塩基配列情報（301 bp）を解析・収集した。その結果、国内に流通するエンゴサクはいずれも *Corydalis turtschaninovii* を基原とするものと判断された。

以上の塩基配列解析及び基原植物鑑別結果は、データベースの遺伝子鑑別情報のカテゴリーに収載される。

F. 文献

- 1) Yamaji H, Kondo K, Kuniga T, Nesumi H, Yoshida T, Hashimoto K, and Takeda O. Origin of Cultivated *Citrus* (*Rutaceae*)

Documented by the Contents of Internal Transcribed Spacer Sequences (ITS) in Nuclear Ribosomal DNA. *J. Jpn. Bot.* **88**: 222-238 (2013)

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 河野徳昭, 乾貴幸, 吉松嘉代, 川原信夫, 用植物資源の遺伝子情報の基盤整備

とその活用, 第43回生薬分析シンポジウム (2014年11月, 大阪)

2. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(図表) キジツの部

表1. 生薬キジツ 市場流通品モデル試料一覧

管理番号	モデル試料 提供時形態	試料片数	産地	等級等	提供社	モデル試料 入手年
NIB-0813	2つ割り	3	中国江西省		A社	
NIB-0814	2つ割り	3	日本	ナツミカン	A社	
NIB-0815	刻み	刻	中国江西省	K070066-3	B社	
NIB-0816	生	2	中国浙江省		C社	2011
NIB-0817	刻み	刻	四国		D社	2003
NIB-0818	小割	4	中国広西省	参考	D社	2005
NIB-0819	刻み	刻	中国浙江省		D社	2006
NIB-0820	小割	4	中国広西省	参考	D社	2006
NIB-0821	刻み	刻	四国		D社	2006
NIB-0822	刻み	刻	中国浙江省		D社	2006
NIB-0823	刻み	刻	四国		D社	2007
NIB-0824	刻み	刻	四国		D社	2008
NIB-0825	刻み	刻	中国浙江省		D社	2008
NIB-0826	刻み	刻	四国		D社	2009
NIB-0827	刻み	刻	中国浙江省		D社	2010
NIB-0828	小割	1	中国浙江省	3.2~4.0cm	D社	2010
NIB-0829	刻み	刻	中国浙江省		D社	2011
NIB-0830	半割	無	四国	少量のため無	D社	2011
NIB-0831	小割	3	中国広西省	参考	D社	2011
NIB-0832	小割	7	中国広西省	参考	D社	2013
NIB-0833	刻み(大)	2	日本和歌山県		E社	2011
NIB-0834	全形	2	中国浙江省	キジツ(枳殻)	F社	2013
NIB-0835	全形	3	中国浙江省	キジツ(枳実)	F社	2013
NIB-1122	刻み	刻	中国浙江省		G社	2012

表2. 文献1(Yamajiら)に記載のカンキツ類ITS1領域変異点(抜粋)

Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237
<i>C. hassaku</i>	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
<i>C. natsudaidai</i>	K	R	C	G	T	R	Y	M	Y	C	C	C	Y	C
<i>C. aurantium</i>	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
<i>C. sinensis</i>	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C
<i>C. unshiu</i>	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
<i>C. reticulata</i>	K	R	C	R	Y	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C

塩基番号は文献1 Fig.1に従った。

表3. キジツモデル試料ITS1領域の変異点情報(基原植物種鑑別に肝要な変異点を示す)

(1) ダイレクトシーケンシング及びクローニング&シーケンシング解析サンプル

Direct Sequencing																
Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237	Judge	入手年・備考
NIB-0815	1	K	R	Y	G	T	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C	
中国江西省	2	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. sinensis
NIB-0822	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
NIB-1122	1	K	R	C	G	T	R	Y	M	Y	C	C	C	Y	C	
中国浙江省	2	K	R	C	R	T	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C	

Cloning & Sequencing																
Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237	Judge	入手年・備考
NIB-0815	1	K	R	C	G	Y	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
中国江西省	2	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. sinensis
NIB-0822	1	K	R	C	G	Y	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	
中国浙江省	3	K	R	C	G	Y	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	
NIB-1122	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
中国浙江省	2	K	R	C	R	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C	

(2) ダイレクトシーケンシング解析サンプル

Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237	Judge	入手年・備考
NIB-0813	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
中国江西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
NIB-0814	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
日本	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
NIB-0816	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
NIB-0817	Not amplified															2003
四国																
NIB-0818	1	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. sinensis
中国広西省																参考品
NIB-0819	3	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	4	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
NIB-0820	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C	C. unshiu
中国広西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C	C. unshiu
NIB-0821	Not amplified															2006
四国																
NIB-0823	3	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. hassaku
四国	4	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. hassaku
NIB-0824	1	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. hassaku
四国	2	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. hassaku
NIB-0825	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	4	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
NIB-0826	1	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. hassaku
	2	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. hassaku
四国	4	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C	C. hassaku
NIB-0827	1	K	R	C	G	T	R	Y	M	Y	C	C	C	Y	C	
中国浙江省	4	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
NIB-0828	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
NIB-0829	3	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	4	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	Y	
NIB-0831	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C	C. unshiu
中国広西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C	C. unshiu
NIB-0832	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C	C. unshiu
中国広西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C	C. unshiu
NIB-0833	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
和歌山県	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C	
NIB-0834	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
NIB-0835	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y	C. aurantium

塩基番号は文献1 Fig.1に従った。

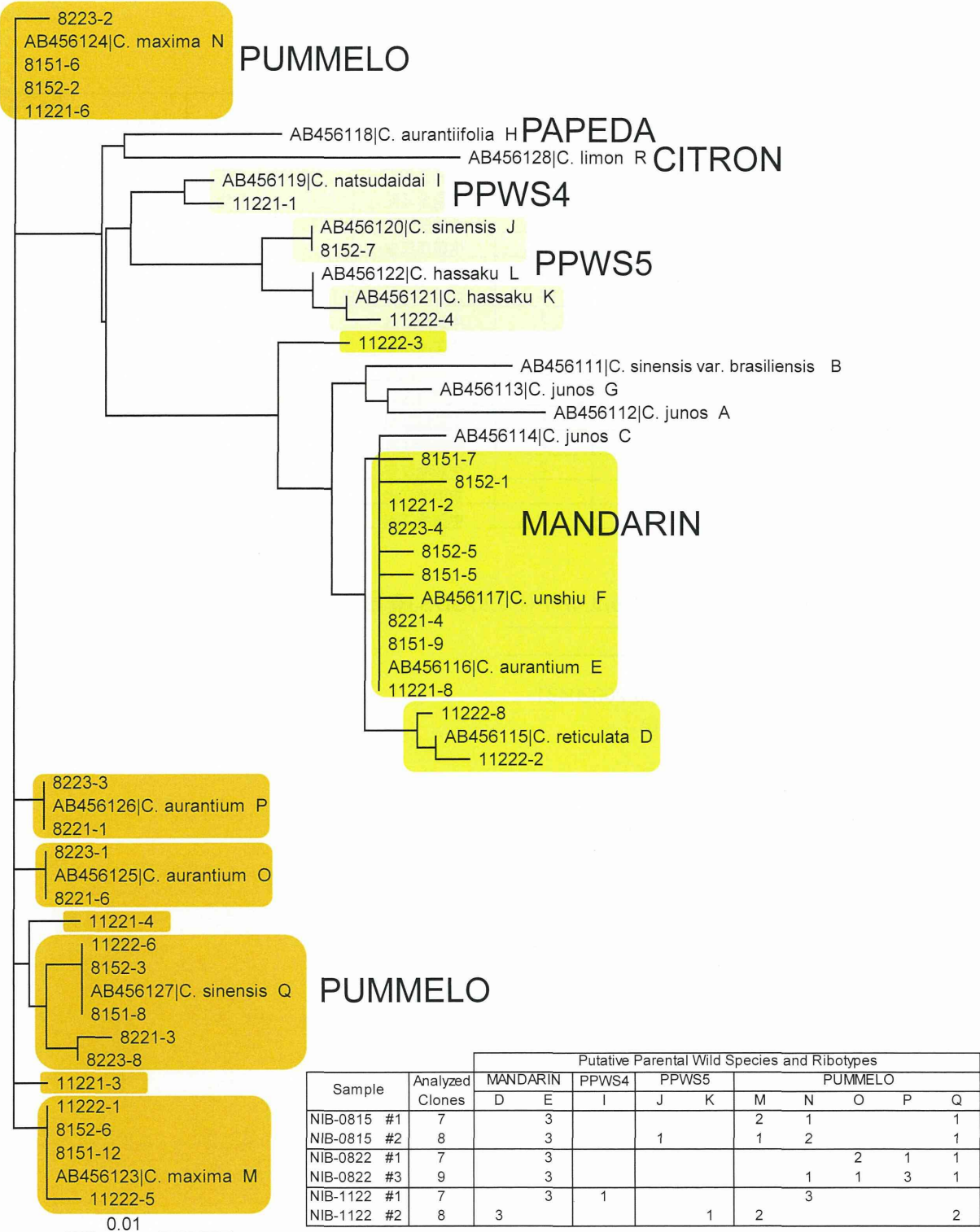


図1. カンキツ類の推定交配親(文献1)とモデル試料のITS領域の分子系統樹及びリボタイプ出現頻度

文献1記載の交配親Ribotype18種とモデル試料NIB-0815, 0822, 1122由来のリボタイプの分子系統樹。学名の前の記番号はaccession no.を、後の英字はRibotypeを示す。クローン名は試料番号、枝番、クローン番号の順である。(例11222-2: 試料番号NIB-1122検体#2クローン#2のITS領域の配列の意。表は、各検体におけるリボタイプの出現頻度を示す。相同性の高いクローンは同じリボタイプに分類した。

(図表) エンゴサクの部

表1. 生薬エンゴサク 市場流通品モデル試料一覧

管理番号	モデル試料 提供時形態	試料片数	供試検体数	塩基配列 情報取得 検体数	産地	等級等	提供者	導入年月日	モデル 試料 入手年
NIB-0783	刻	刻	4	4	中国浙江省		A社	01-Aug-13	2011
NIB-0784	原形	9	4	3	中国浙江省		B社	01-Aug-13	
NIB-0785	生	17	2	2	中国浙江省		C社	01-Sep-13	2011
NIB-0786	刻み	刻	4	2	中国浙江省		D社	01-Sep-13	2013
NIB-0890	原形	3	4	1	中国浙江省	乙級	E社	01-Sep-13	1987
NIB-0891	原形	9	2	2	中国浙江省		E社	01-Sep-13	2001
NIB-0892	原形	5	4	3	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2003
NIB-0982	原形	7	4	4	中国浙江省	乙級	E社	01-Sep-13	2005
NIB-0983	原形	3	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2006
NIB-0984	原形	4	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2011
NIB-0985	原形	5	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2012
NIB-0986	原形	5	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2013
NIB-0987	原形	6	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2013
NIB-0988	原形	5	4	3	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2013
NIB-1131	刻み	刻	4	4	中国浙江省		F社	01-Jan-13	2012

表2. *Corydalis*属植物の葉緑体DNA *trnL-trnF*領域のDDBJ登録配列

Accession No.	Plant species
AY328202	<i>Corydalis temulifolia</i>
AY328203	<i>Corydalis</i> sp. Gong 20020431
DQ912916	<i>Corydalis ambigua</i>
DQ912917	<i>Corydalis incisa</i>
EU326049	<i>Corydalis falconeri</i>
FJ626561	<i>Corydalis</i> sp. Hong 99105
HE603349	<i>Corydalis cheilanthifolia</i>
HE603350	<i>Corydalis paczoskii</i>
HE603351	<i>Capnoides sempervirens</i>
KF849816	<i>Corydalis incisa</i>

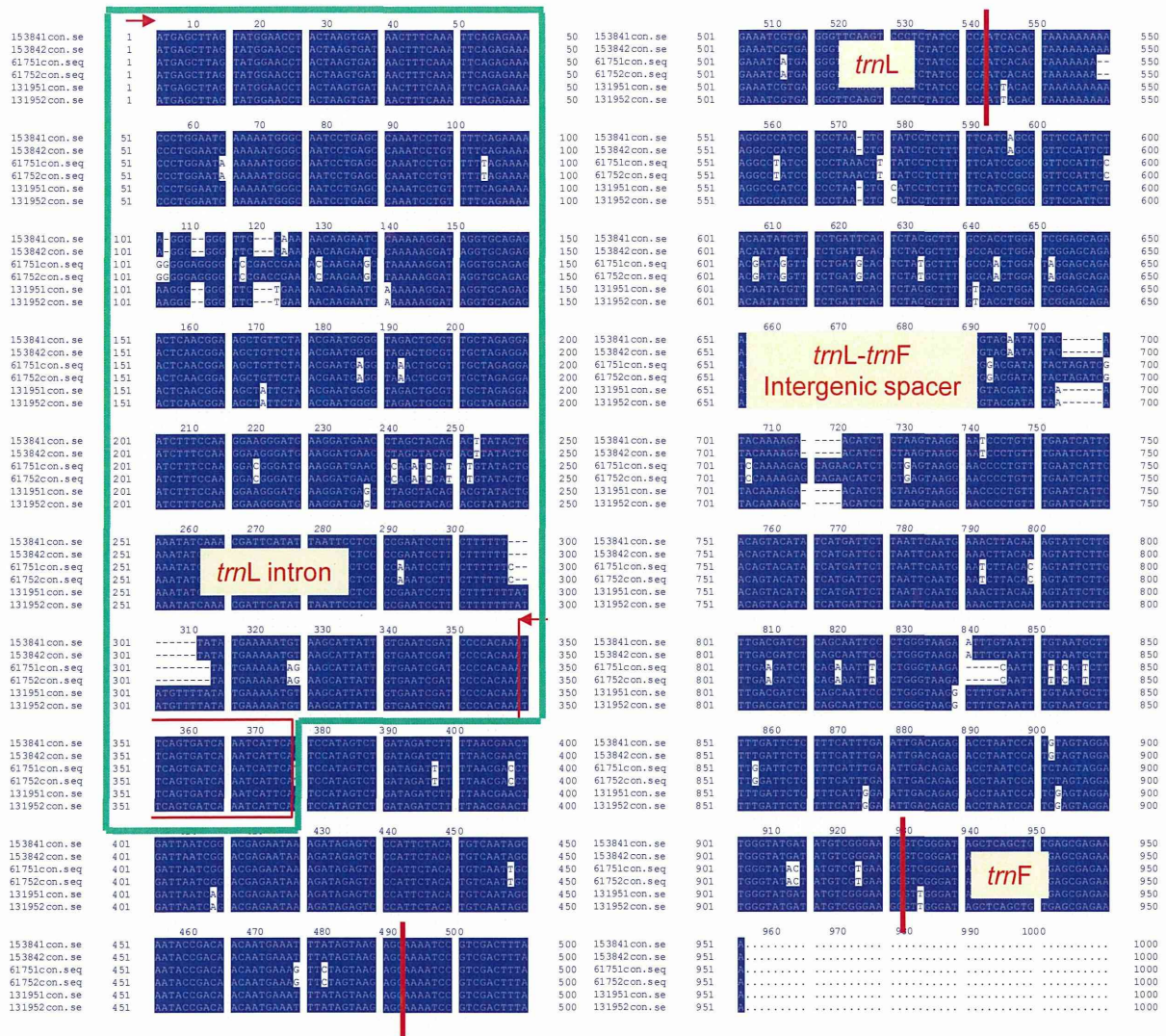


図1. *Corydalis*属植物葉緑体DNA *trnL-trnF*領域の塩基配列アラインメント

薬用植物資源研究センター北海道研究部保有のエンゴサク(15384:中国)、コウライエンゴサク(6175:韓国)、エゾエンゴサク(13195)の3種各2検体より得られた葉緑体DNA *trnL-trnF*領域の塩基配列情報。上段からエンゴサク(中国) *Corydalis turtschaninovii*、コウライエンゴサク(韓国) *C. nakaii* (*C. ternata*)、エゾエンゴサク *C. ambigua*それぞれの2検体の塩基配列を示す。3'末端より301 bpの*trnL*-intron領域についてモデル試料の塩基配列情報を収集した。赤枠部は*trnL*-intron領域の増幅に使用したアンチセンスプライマーの位置を示す。赤の縦線は、*trnL* intron、*trnL*、*trnL-trnF* intergenic spacer、*trnF*各領域の境界を示す。

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの
拡充と情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 成分分析データ情報、カテゴリー横断研究及びさく葉標本に関する研究
—生薬の LCMS による成分分析データの構築に関する検討に関する研究—

研究分担者 渕野 裕之（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
栽培研究室長

研究協力者 高橋 豊 エムエスソリューションズ株式会社
蓮沼 タミ（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

今年度作成した熱水抽出エキ스는、イレイセン 17 種類、エンゴサク 15 種類、カンキョウ 17 種類、キクカ 12 種類、キジツ 24 種類、キョウカツ 10 種類、ケイガイ 10 種類、コウジン 12 種類、サンソウニン 13 種類、シコン 17 種類、ショウマ 16 種類、ドクカツ 18 種類、シンイ 23 種類、チョレイ 23 種類、ブシ 7 種類、ボクソク 3 種類の 16 品目 237 種類において行った。6 種類の生薬の LC/MS 測定の変量解析の結果ではサンシュユ、サンヤクについては産地によるグループ分けがある程度できたが、他は明確でなかった。ゴミシは黒竜江省産と遼寧省産での判別分析において、黒竜江省のマーカー化合物候補として Wuweizidilactone H が推定された。チモの一部の試料中のピークには異性体の存在によるものと推定され分裂するものが多く現れた。サンシュユは Morroniside および Loganin に相当すると思われるピークを確認した。サンヤクについては一部特殊な元素に由来すると思われる中性フラグメントが観察されており、成分的に興味深いものが含有されている可能性がある。エンゴサクに関しては Glaucine, Corydaline, Dehydrocorydaline に相当すると思われるピークが確認された。イレイセンに関しては、5 つの産地のものがあつたが、広西省のみが特徴的なピークを示し、それは配糖体の集合体であると推定された。

A. 研究目的

薬用植物総合データベースは、薬用植物に関わるあらゆる分野に対してその生産や利用に関して有益な情報を提供する日本で初めての薬用植物の総合情報データベースであり、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが中心となり、多くの大学や企業の協力のもと現在構築が進められている。このデータベースは、既に薬

用植物資源研究センターが先立って公開を始めている薬用植物データベースを基盤とし、さらに成分情報や薬理活性情報、遺伝子情報、栽培情報、培養情報などあらゆる薬用植物のニーズに応える内容を構築している。これらのデータベースに集積される予定の情報は、最終的には研究者や薬用植物栽培農家のみならず、生薬関連業界振興にも大いに役立つものとなると考えられる。

薬用植物の成分情報は今回の総合情報データベースの最も重要な部分を占めており、生薬の薬効や品質評価にも絡み、この分野の情報の充実がデータベースの根幹をなすものと考えられる。今回この薬用植物総合データベース構築に関する基盤整備の一環として、昨年度同様、成分情報に関して現在日本において流通している多くの生薬の LCMS を用いた検討を行い、基原や産地などのバラエティ比較を行うことを試みた。

B. 研究方法

(1) 熱水抽出エキスの作成

昨年度に引き続き生薬関連業界に協力のもと収集された、現在市場に流通している生薬について、昨年度と同様に粉碎後に熱水抽出を2時間行い、凍結乾燥1週間により、最終的に熱水抽出エキス（いずれもアモルファス状）を得た。表1に、それらの生薬名、産地、等級などを示した。また表2には、作成した熱水抽出エキスの作成条件（使用生薬量、使用溶媒量、加熱条件、凍結乾燥日数、エキス収量）を示した。また本報告書の最後に作成したエキス収量を生薬20g中の収量(g)に換算したグラフを示した。

(2) 熱水抽出エキスの LCMS データの取得

これら熱水抽出エキスについて、我々は LCMS による質量分析スペクトルを測定した。抽出方法：熱水抽出2時間、熱時吸引濾過または遠心分離、凍結乾燥1週間で行なった。

LCMS の検討

【条件検討内容】

LC/MS における質量分析部装置は ThermoFisher Scientific 社製 LTQ Orbitrap Elite を用いた。また HPLC 装置部分は ThermoFisher Scientific 社製 Ultimate 3000 を用いた。

ゴミシ

試料：正イオン検出測定においては、1mg/mL の濃度になるように水／メタノール (1/1) 溶液を加え、1分間超音波後遠心分離後、上澄を 0.2 mg/mL に希釈して 3μL 注入。負イオン検出測定においては、2mg/mL の濃度になるように水／メタノール (1/1) 溶液を加え、1分間超音波後遠心分離後、上澄を 3μL 注入。

MS 条件：

ESI ニードル電圧 +3,000 V

キャピラリー温度 275 °C

ヒーター温度 450 °C

測定 m/z 範囲 100~2,000

スペクトル記録スピード 0.1 秒／スペクトル

設定質量分解能 30,000

CID 電圧 35 V

プリカーサー m/z 範囲 3.5

HPLC 条件：

カラム SunShellC18, 2.1×100, 2.6μm

移動相 A = 0.1 % 酢酸／超純水、B = 0.1 % 酢酸／アセトニトリル

B = 5% (0 min)–100 % (15min) –100 % (17 min)

移動相流量 0.25mL/min

カラム温度 40°C

DAD 波長範囲 190–400 nm

チモ

試料：1mg/mL の濃度になるように水／メタノール (1/1) 溶液を加え、1分間超音波後遠心分離、上澄を注入。注入量 10μL

MS 条件：

ESI ニードル電圧+3,000 V

キャピラリー温度 275 °C

ヒーター温度 450 °C

測定 m/z 範囲 100~2,000

スペクトル記録スピード 0.1 秒／スペクトル

設定質量分解能 30,000

CID 電圧 35 V

プリカーサー m/z 範囲 3.5

HPLC 条件 :

カラム SunShellC18, 2.1×100, 2.6 μ m
移動相 A = 0.1 % 酢酸/超純水、B =
0.1 % 酢酸/アセトニトリル
B = 2%(0 min) -70 % (15min) -100 %
(16 min) -100 % (17 min)
移動相流量 0.5mL/min
カラム温度 40℃

DAD 波長範囲 190 - 400 nm

サンシュユ

試料 : 1 mg/mL の濃度になるように水/メ
タノール (1/1) 溶液を加え、1 分間超音波
後遠心分離、上澄を注入。注入量 : 5 μ L

MS 条件 :

ESI ニードル電圧+3,000 V
キャピラリー温度 275 °C
ヒーター温度 450 °C
測定 m/z 範囲 100~2,000
スペクトル記録スピード 0.1 秒/スペ
クトル
設定質量分解能 30,000
CID 電圧 35 V
プリカーサー m/z 範囲 3.5

HPLC 条件 :

カラム SunShellC18, 2.1×100mm, 2.6 μ m
移動相 A = 10 mM ギ酸アンモニウム
/超純水、B = 0.1%ギ酸/アセトニト
リル
B = 1% (0 min) -1% (1 min) -40%
(12min) -100% (14min) -100% (16 min)
移動相流量 0.3mL/min
カラム温度 40℃

DAD 波長範囲 190 - 400 nm

サンヤク

試料 : 2mg/mL の濃度になるように水/メ
タノール (1/1) 溶液を加え、1 分間超音波
後遠心分離、上澄を注入。注入量 : 正イオ
ン検出 10 μ L、負イオン検出 15 μ L

MS 条件 :

ESI ニードル電圧+3,000 V

キャピラリー温度 275 °C

ヒーター温度 450 °C

測定 m/z 範囲 100~2,000

スペクトル記録スピード 0.1 秒/スペ
クトル

設定質量分解能 30,000

CID 電圧 35 V

プリカーサー m/z 範囲 3.5

HPLC 条件 :

カラム SunShellC18, 2.1×100, 2.6 μ m
移動相 A = 0.1 % 酢酸/超純水、B =
0.1 % 酢酸/アセトニトリル
B = 2% (0 min) -70 % (15min) -100 %
(16 min) -100 % (17 min)
移動相流量 0.25mL/min
カラム温度 40℃

DAD 波長範囲 190 - 400 nm

エンゴサク

試料 : 1 mg/mL の濃度になるように水/メ
タノール (1/1) 溶液を加え、1 分間超音波
後遠心分離、上澄を 10 倍希釈して 15 μ L 注
入。

MS 条件 :

ESI ニードル電圧+3,000 V

キャピラリー温度 275 °C

ヒーター温度 450 °C

測定 m/z 範囲 100~2,000

スペクトル記録スピード 0.1 秒/スペ
クトル

設定質量分解能 30,000

CID 電圧 35 V

プリカーサー m/z 範囲 3.5

HPLC 条件 :

カラム SunShellC18, 2.1×100mm, 2.6 μ m
移動相 A = 0.1%ギ酸/超純水、B =
0.1%ギ酸/アセトニトリル
B = 1% (0 min) -1% (0.5min) -5%
(1min) -35% (13min) -100% (15min)
-100% (16 min)

移動相流量 0.3mL/min

カラム 温度 40℃

DAD 波長範囲 190 – 400 nm

(3) 多変量解析について

今回取得した生薬の熱水抽出エキスに関しては、ThermoFisherScientific 社製ソフトウェアである SIEVE2.1 によるアライメントを行い、さらに Umetrics 社製多変量解析ソフトウェア SIMCA P+ 12.0 を用いて主成分分析 (PCA) と一部については判別分析 (OPLS) を行った。

C. 研究結果

(1) 生薬エキスの作成

今年度作成した熱水抽出エキスは以下の 16 品目 237 種類において行った。

イレイセン	17 種類 (中国産 17)
エンゴサク	15 種類 (中国産 15)
カンキョウ	17 種類 (中国産 17、不明 1)
キクカ	12 種類 (中国産 12)
キジツ	24 種類 (日本産 8、中国産 16)
キョウカツ	10 種類 (日本産 38、韓国産 6)
ケイガイ	10 種類 (中国産 10)
コウジン	12 種類 (日本産 1、中国産 11)
サンソウニン	13 種類 (中国産 13)
シコン	17 種類 (中国産 13、インド参考品 4)
ショウマ	16 種類 (中国産 16)
ドクカツ	18 種類 (中国産 18)
シンイ	23 種類 (日本産 5、中国産 18)
チョレイ	23 種類 (中国産 23)
ブシ	7 種類 (日本産 2、中国産 5)
ボクソク	3 種類 (日本産 3)

生薬 20g から得られたエキスの量 (g) をグラフにして示した。イレイセンは 2~5g、エンゴサクは多くのロットにおいて約 4g 前

後であった。カンキョウは 2g 前後、キクカは 7g、キジツは 3~8g 程度、キョウカツは 4g、ケイガイは 2.5g、コウジンは 8~10g、サンソウニンは 3.5g 程度であった。シコンは今回参考品として局方外である軟紫根とデンシフローラが含まれているが、それら局外品は多くて 1g 程度とエキスの収量は低いが、局方品は 4~9g であった。ショウマはロット間での差が大きく、低いものは 3g 程度であるが多いものは約 6.5g であった。シンイは 2.5~5g、ドクカツは 3g、ブシは 5~8g、ボクソクは 2g 程度であった。チョレイは全体的に収量が低く、多いものでも 0.5g 程度であった。チョレイはブクリョウと同様に強い疎水性であり、粉末にすると抽出時に水の表面に浮いてしまうために抽出が困難であった。

(2) 熱水抽出エキスの LCMS 結果

ゴミシン

保持時間約 9.8 分に観測されているピークに相当する成分は、正イオン検出による TIC クロマトグラムでは m/z 415.2112 $[M+H-H_2O]^+$ にメインピークが観測されている他、 m/z 433.2219 $[M+H]^+$ 、450.2487 $[M+NH_4]^+$ にも顕著なピークが観測され、このことから、この成分は Schisandrin と推定された。また、約 10.4 分に観測されているピークに相当する成分は、正イオン検出による TIC クロマトグラムでは、 m/z 399.1805 にメインピークが観測されている他、 m/z 417.1907 $[M+H]^+$ 、434.2181 $[M+NH_4]^+$ 、439.1729 $[M+Na]^+$ にもピークが観測され、この成分は Gomisin A と推定された。

また多変量解析において黒竜江省産と遼寧省産の判別分析を行ったところ negative mode において良好な結果を与えた。黒竜江省産を決定づけるマーカー化合物としての候補に保持時間 10.94 分の m/z 532 および 402 のピークが考えられた。これらはフラグメントと考えられ、 m/z 531.22 は精密質

量分析から $C_{28}H_{35}O_{10}$ と推定された。401 は 531 のプロダクトイオンであった。この分子式から基原植物であるチョウセンゴミシの成分として報告されているものとしては Wuweizidilactone H がある。よって、黒竜江省産のマーカー化合物は本化合物である可能性がある。

チモ

今回の試料は NIB-410 の一種類を除き、残りの 15 種類は全て河北省産である（410 は内蒙古産）。また等級についても一部を除き情報が少ないため、産地や等級による多変量解析によるクラス分けができなかった。また一部のモデル試料（NIB-524, 525, 526, 527）において、クロマトグラム中のピーク（TIC）が小さく分裂するという現象が見られた。チモにはサポニンが多く含まれていることが知られているが、これらの分裂の原因はサポニン中の糖の異性体によるものと推定された。しかしながらその違いについて特定はできなかった。

サンシュユ

各エキスにおいて、正負両イオン検出データ共に、PDA と TIC クロマトグラムに殆ど差異は見られなかった。PDA および TIC クロマトグラムにおいて、保持時間 6 分付近と 7 分付近に 2 本の顕著なピークが観測され、これらは観測精密質量から得られた推定組成から、それぞれ Morroniside, Loganin であると推測された。

PCA においては、浙江省、陝西省、四川省、奈良、韓国産と比較的まとまる傾向を示した。そこで、陝西省産と浙江省産の OPLS-DA を試みたところ、信頼度は高くなかったが、loading s-plot においては positive mode では 0.79 分付近の m/z 198 の比較的早い保持時間のものが、また negative mode でも 0.75 付近の m/z 304 のものが陝西省産のマーカー化合物と推定されたが化合物は特定できていない。

サンヤク

各エキスの PDA および TIC クロマトグラムにおいて、ピーク数・強度共に小さく、UV や ESI イオン化に対してシグナルレスポンスの高い成分は含まれてないことが示唆された。配糖体の特徴であるプロダクトイオンスペクトルにおける 162 Da の中性フラグメントを示した成分は一つのみであった。負イオン検出データにおいて、保持時間 9.17 分、9.47 分、9.77 分に観測された成分のプロダクトイオンスペクトルでは、それぞれ 81.9725Da, 81.9726Da, 81.9722Da の中性フラグメントの脱離が観測されており、この中性フラグメントの質量は、C, H, N, O などの元素から構成される通常の有機化合物ではあり得ない数値であり、特殊な元素によるものと考えられるが現在までのところ特定されていない。正イオン検出データにおいて、保持時間 14 分台に、プロダクトイオンスペクトルでリン脂質に特徴的な m/z 184 のフラグメントイオンを示す成分が観測された。

多変量解析では主成分分析において、江蘇省、河南省、福建省と比較的明確にグループ分けされていた。また河南省と江蘇省において判別分析（positive mode）においては高い信頼度で両者が分離され、loading s-plot からは河南省を決定づけるマーカー化合物として、保持時間 0.77-1.3 分付近の m/z 153.1 のピークが推定されたが、江蘇省の試料の MS でも同保持時間に m/z 153.1 のピークは認められ、江蘇省の試料中にも含有されていると思われた。ただ MS クロマトグラム上では、含量は江蘇省の方が低い可能性があり、含量の違いによる判別結果と思われた。

エンゴサク

正負両イオン極性で条件検討を行ったが、負イオン検出では殆どシグナルが得られなかった。各エキスにおいて、PDA クロマト

グラムと TIC クロマトグラムに殆ど差異は見られなかった。PDA および TIC クロマトグラムにおいて顕著に観測されている 3 ピーク（保持時間 8.63 分、9.34 分、10.35 分）は、それぞれ Glaucine, Corydaline, Dehydrocorydaline であると推測された。

イレイセン

産地としては遼寧省、広西省、黒竜江省、内蒙古、東北の 5 つの産地があるが、主成分分析においては明確なグループ分けというものができなかった。TIC クロマトグラムの比較においては、広西省のみが得意なピークを 9 分付近に検出した。これはその MS クロマトグラムにより、高分子量でありかつ-162Da の違いのピークが混在していることから配糖体の混合ピークと推定された。それ以外の産地の試料間には極端に大きな差異は認められなかった。

D. 考察

生薬の熱水抽出エキスの作成においては、チョレイにおいて極端に少ないエキス収量であった。以前ブクリョウが同様に少ない終了であったが、キノコ類の場合、その主成分はエルゴステロールなどの疎水性成分が多く、そのため熱水抽出においては組織に溶媒（水）が十分に浸透しない可能性があった。

LC/MS 測定においては、今回測定したのは 6 種類の生薬であるが、多変量解析の結果ではサンシュユ、サンヤクについては産地によるグループ分けがある程度できていたが、他の種類については明確ではなかった。ゴミシについては黒竜江省産と遼寧省産での判別分析において、黒竜江省のマーカ化合物候補として Wuweizidilactone H が推定された。

チモにはサポニンに相当するピークを多く認めた。また一部の試料中のピークには分裂するものが多く現れ、これは異性体の

存在によるものと推定された。サンシュユについては Morroniside および Loganin に相当すると思われるピークを確認した。サンヤクについては一部特殊な元素に由来すると思われる中性フラグメントが観察されており、成分的に興味深いものが含有されている可能性がある。エンゴサクに関しては Glaucine, Corydaline, Dehydrocorydaline に相当すると思われるピークが確認された。イレイセンに関しては、5 つの産地のものがあつたが、広西省のみが特徴的なピークを示し、それは配糖体の集合体であると推定された。

E. 結論

LC/MS による 6 種類の生薬の分析検討の結果、主成分分析において産地によるグループ分けが可能であったものはサンシュユとサンヤクであった。

ゴミシにおいては黒竜江省のマーカ化合物においては Wuweizidilactone H が候補に挙げられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 渕野裕之：LC/MS, LC/NMR を用いた生薬・薬用植物の品質評価．川原信夫監修；薬用植物・生薬の最前線，シーエムシー出版（2014）p.43-52
- 2) 大根谷章浩，渕野裕之：生薬の一酸化窒素抑制活性と LC/MS メタボローム解析．特集「漢方とアレルギー」月刊アレルギーの臨床 2014 年 8 月号 p.78-81
- 3) 渕野裕之：生薬の LC/MS, LC/MS/MS 分析．中村洋監修「LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用」公益社団法人日本分析化学会編 オーム社 p.248-254
- 4) Hiroyuki Fuchino, Kana Tanouchi, Akihiro Daikonya, Hiroshi Wada, Osamu Iida, Koji Sugimura, Nobuo Kawahara Relationship