

P: フィロズルチン, H: ヒドラングノール, 1~8: 市場品サンプル
 展開溶媒: ジエチルエーテル/ヘキサン/ギ酸混液 (5:5:1), 検出方法: 紫外線 (主波長254 nm) 照射

Fig. 1 アマチャの確認試験

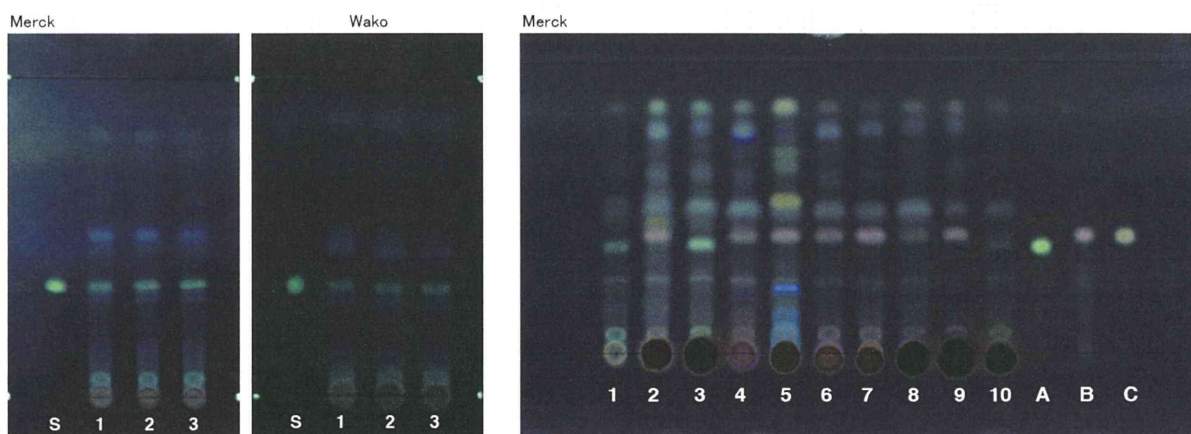
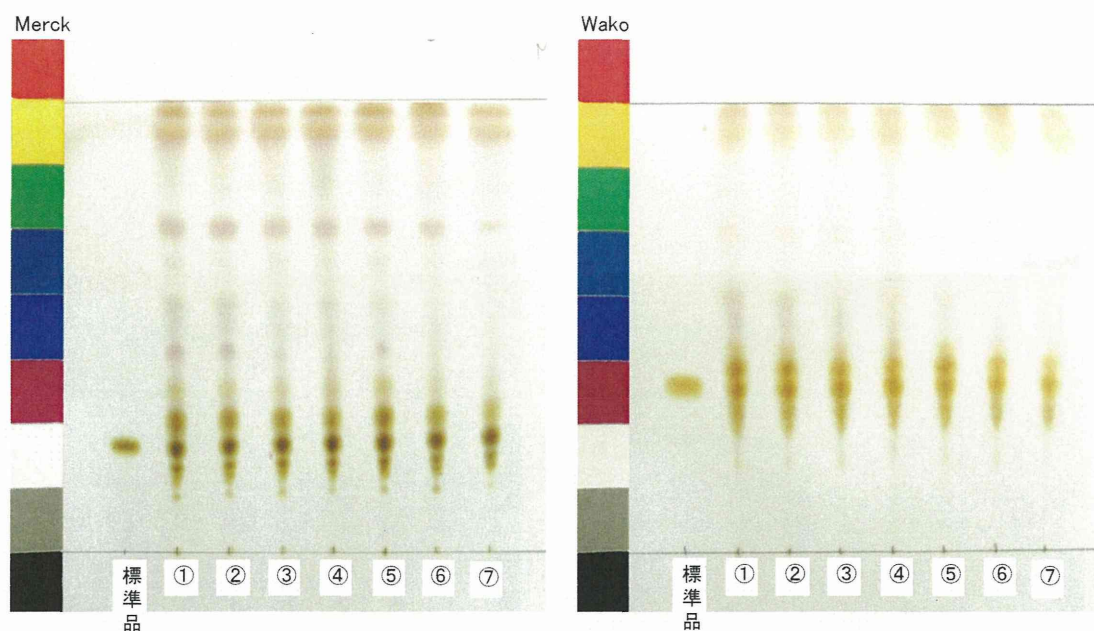


Fig. 2a. S: α-スピナスピロール, 1~3: 市場品

Fig. 2b. 1: カロコン, 2: ニンジン, 3: キキョウ, 4: パイモ, 5: カッコン, 6: ピヤクゴウ,
 7: サンヤク, 8: バクモンドウ, 9: テンモンドウ, 10: ゴシツ,
 A: a-スピナステロール, B: b-シトステロール, C: ステグマステロール

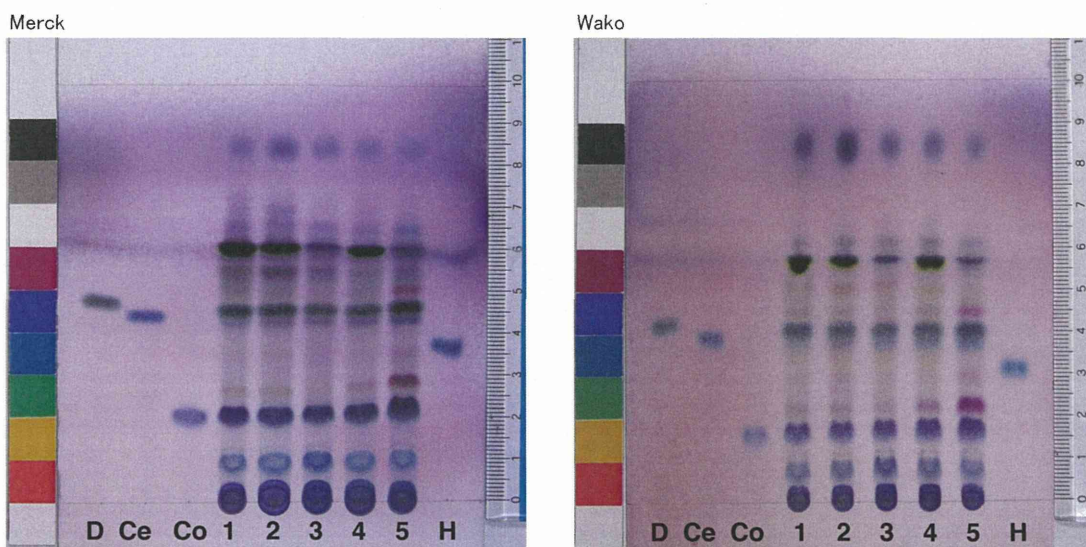
展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(100)混液(20:10:1)
 検出方法: 希硫酸噴霧, 105°C 10分間加熱, その後紫外線(主波長365 nm)照射

Fig. 2 カロコンの TLC 分析



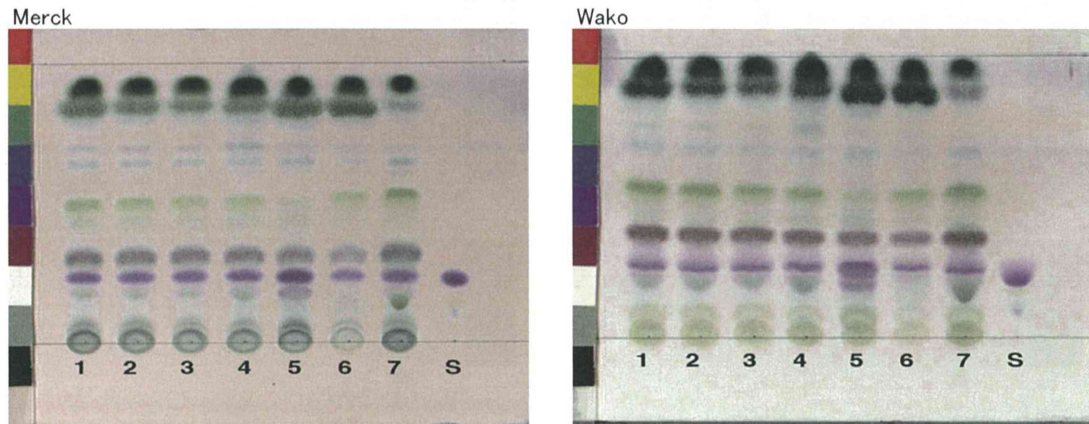
標準品：プラチコジンD, 1～7：市場品
 展開溶媒：酢酸エチル／1-プロパノール／水／酢酸(100)混液(7:5:4:1)
 検出方法：希硫酸噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 3 キキョウの TLC 分析



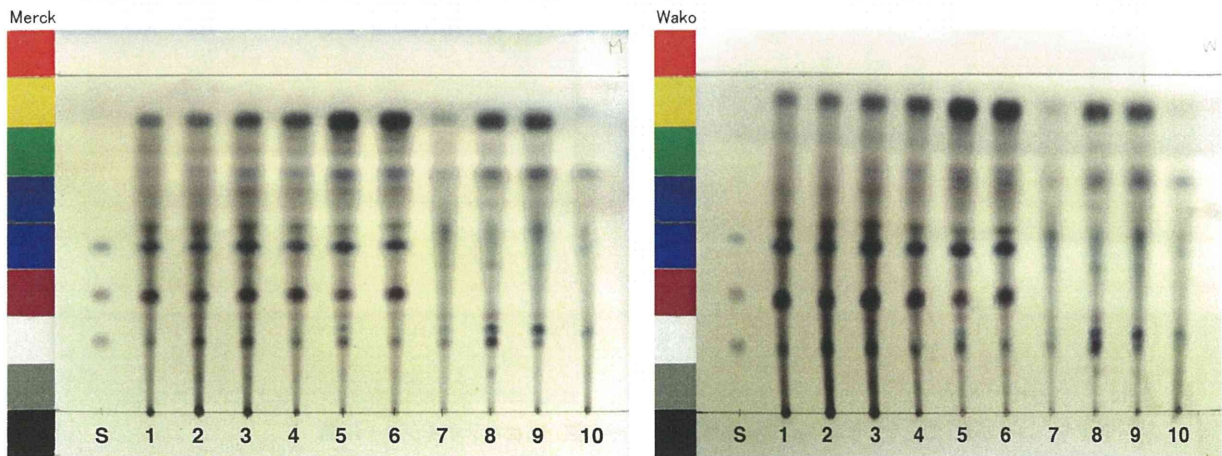
D: デオキシコール酸, Ce: ケノデオキシコール酸, Co: コール酸, H: ヒオデオキシコール酸
 1～5: 市場品
 展開溶媒：トルエン／酢酸(100)混液(2:1)
 検方法出：噴霧用4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 4 ゴオウの TLC 分析



S: プランタゴゲアニジン酸, 1~6: 市場品, 7: 薄層クロマトグラフィー用シャゼンシ
 展開溶媒: アセトン/酢酸エチル/水/酢酸(100)混液(10:10:3:1)
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧, 105°C10分間加熱

Fig. 5 シャゼンシの確認試験



S: アリソールA, アリソールB, アリソールBモノアセテート混合物, 1~10: 市場品
 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン/酢酸(100)混液(10:10:3)
 検出方法: 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 6 シュクシャの確認試験

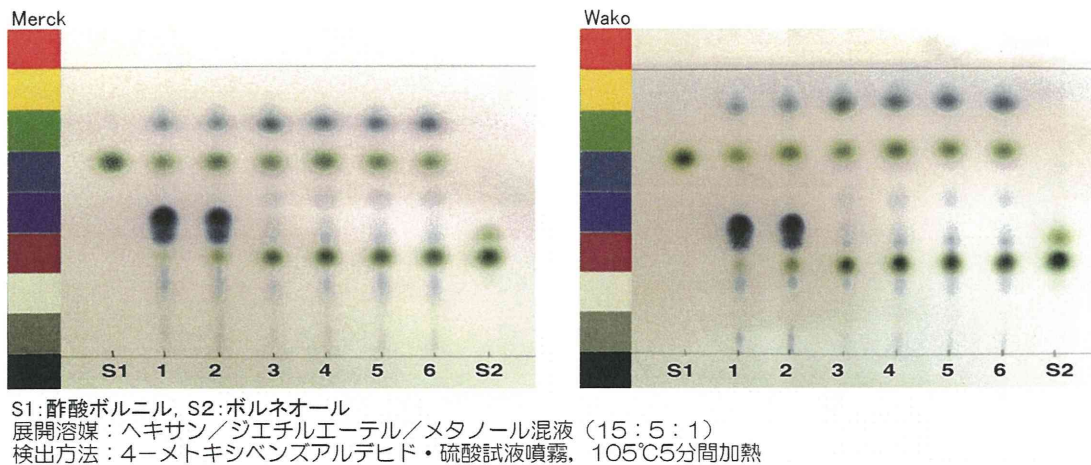


Fig. 7 タクシャの確認試験

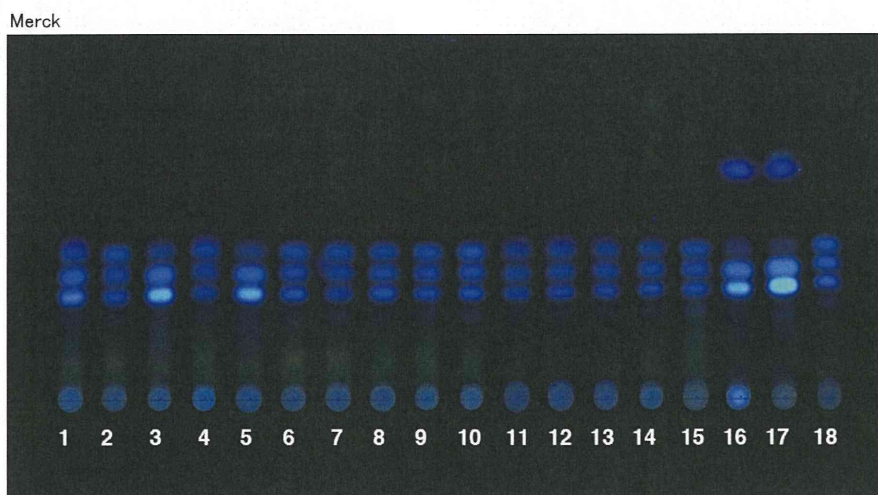


Fig. 8a 1~18: 基盤研提供サンプル

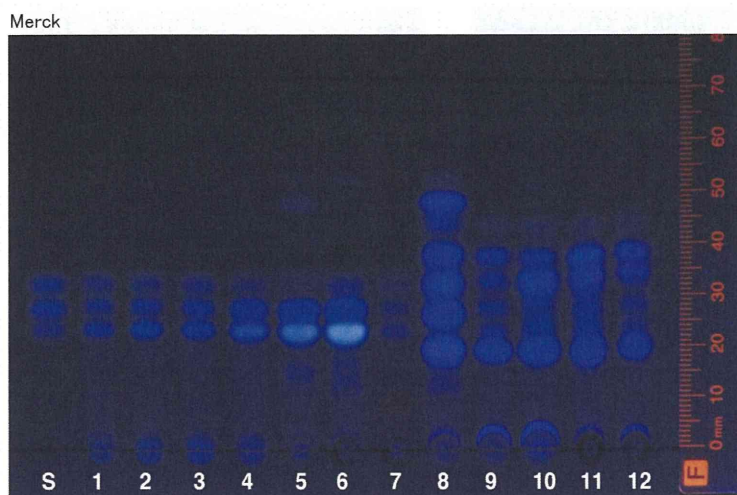


Fig. 8b S: 混合物, 1~5: 陳皮, 6~7: 青皮, 8: 付桔紅, 9~10: 橙皮, 11~12: 枳實

展開溶媒: ヘキサン/アセトン混液 (1:1)
 検出方法: 紫外線 (主波長 365 nm) 照射

Fig. 8 チンピの TLC 分析

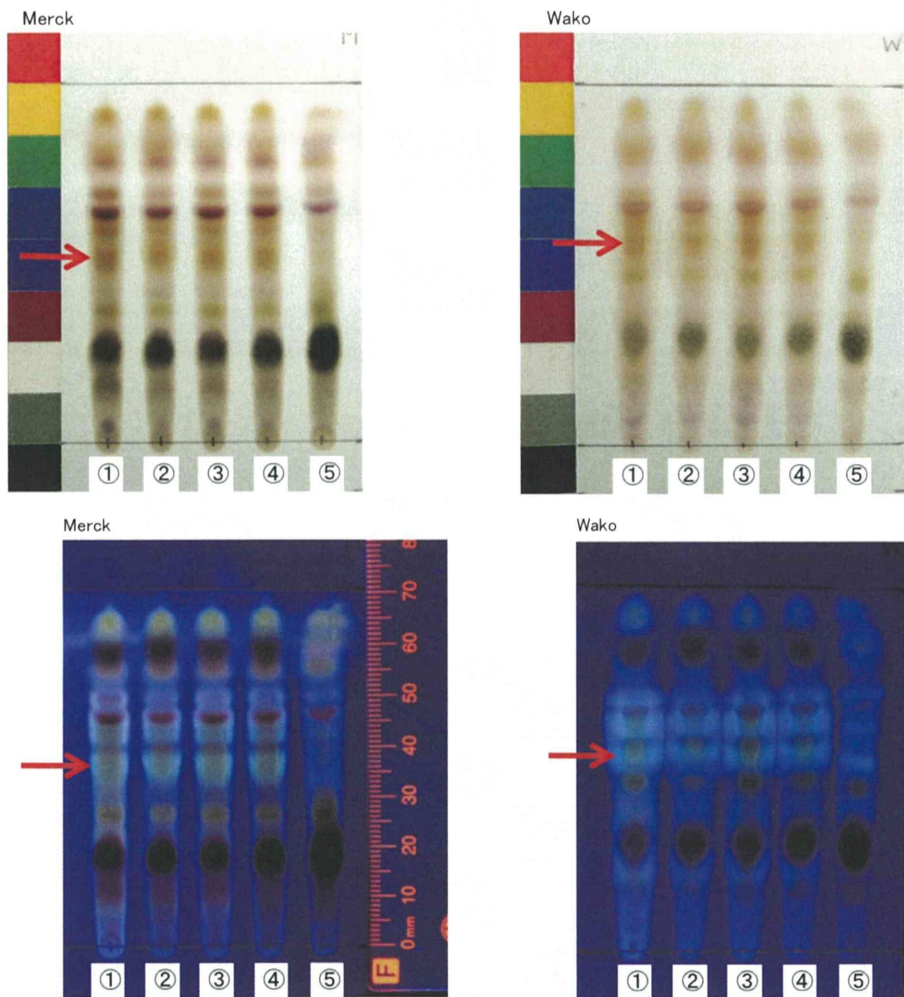


Fig. 9a. 1~5: 市場品

展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水混液(8:3:1)

検出方法: 希硫酸噴霧, 105°C5分間加熱(上), その後紫外線(主波長365 nm)照射(下)

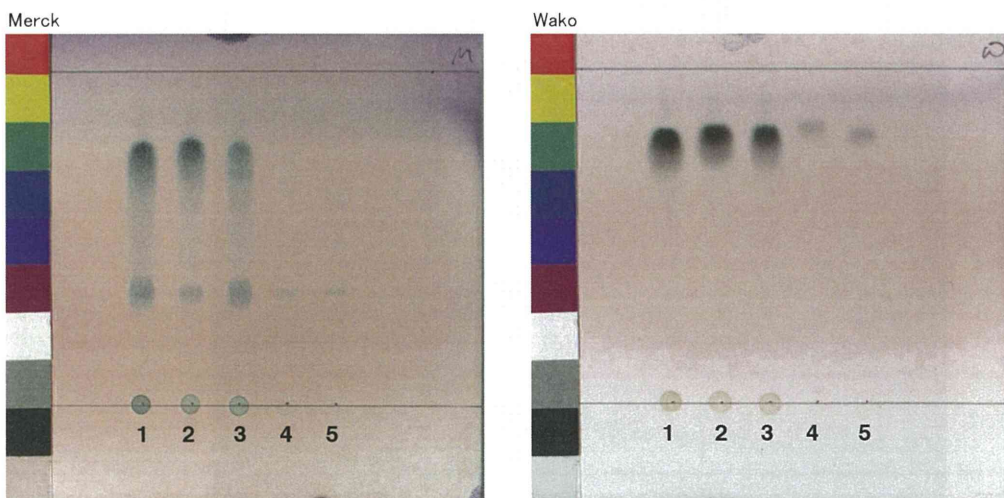
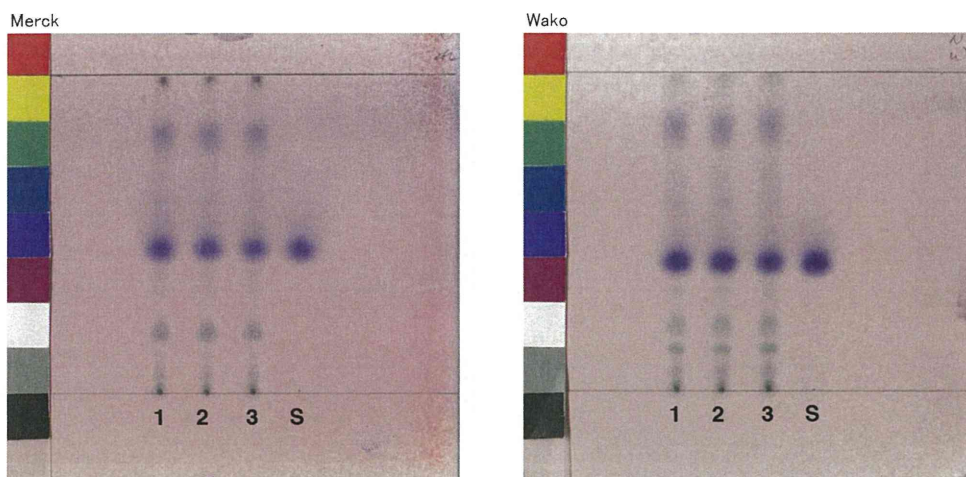


Fig. 9b. 1~3: 市場品, 4: イヌリン, 5: バクモンドウの多糖画分

展開溶媒: エタノール(99.5)/水/酢酸(100)混液(120:80:1)

検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液, 105°C5分間加熱

Fig. 9 バクモンドウの TLC 分析



S: メントール, 1~3: 市場品
 展開溶媒: ヘキサン/アセトン混液(7:3)
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液噴霧, 105°C 5分間加熱

Fig. 10 ハッカの確認試験

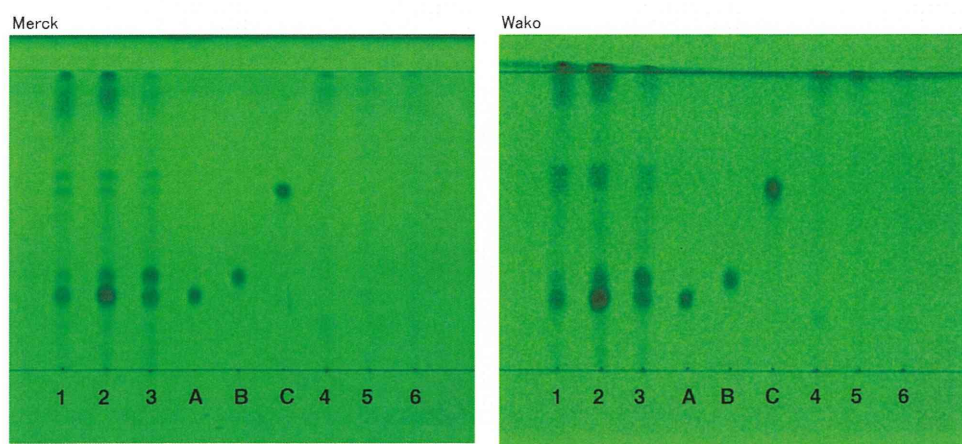


Fig. 11a. A: 1'-*O*-グルコシルシミフギン, B: 4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノール, C: *sec-O*-グルコシルハマウドール
 1~3: ボウフウ, 4~6: ハマボウフウ
 検出方法: 紫外線(主波長254 nm)照射

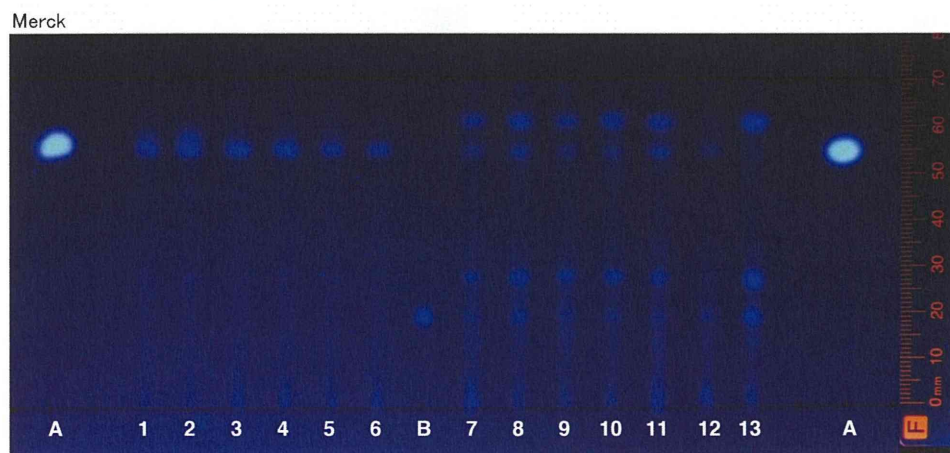


Fig. 11b. A: スコブレチン, B: 4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノール, 1~6: ハマボウフウ, 7~13: ボウフウ
 検出法: 紫外線(主波長365 nm)照射
 展開溶媒: ギ酸エチル/2-ブタノン/ギ酸/水混液(20:5:5:1)

Fig. 11 ボウフウの TLC 分析

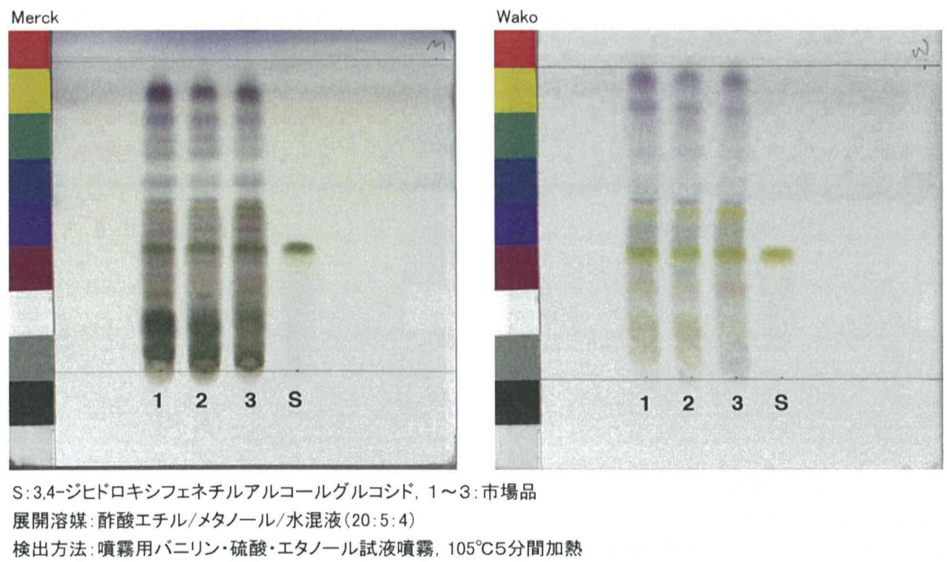


Fig. 12 モクツウの TLC 分析

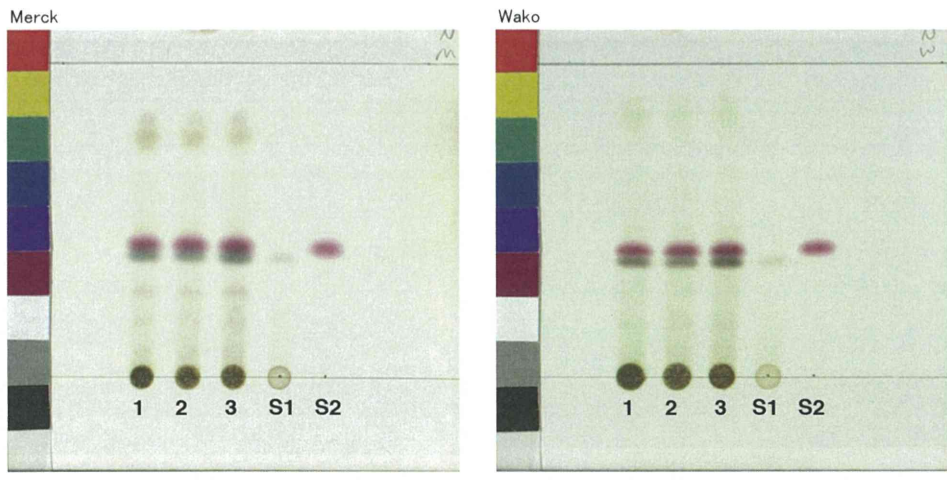


Fig. 13a. 検出方法: 2,4-ジニトロヒドラジン試液噴霧, 105°C5分間加熱

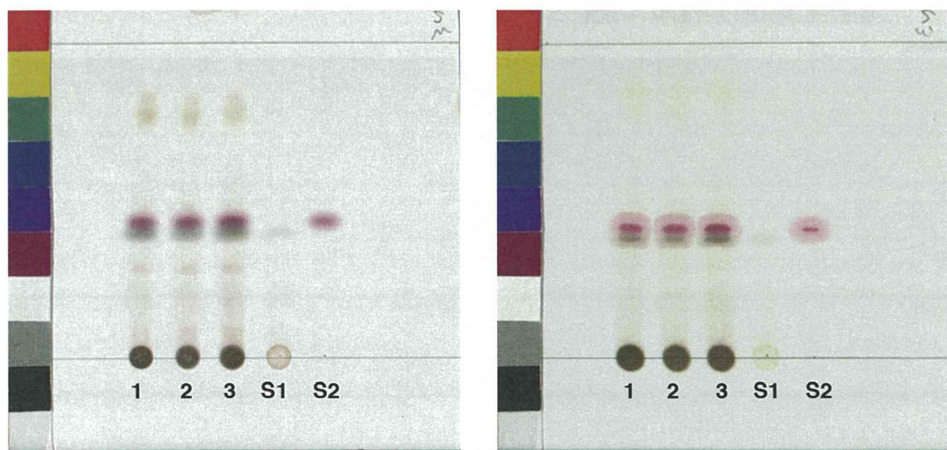
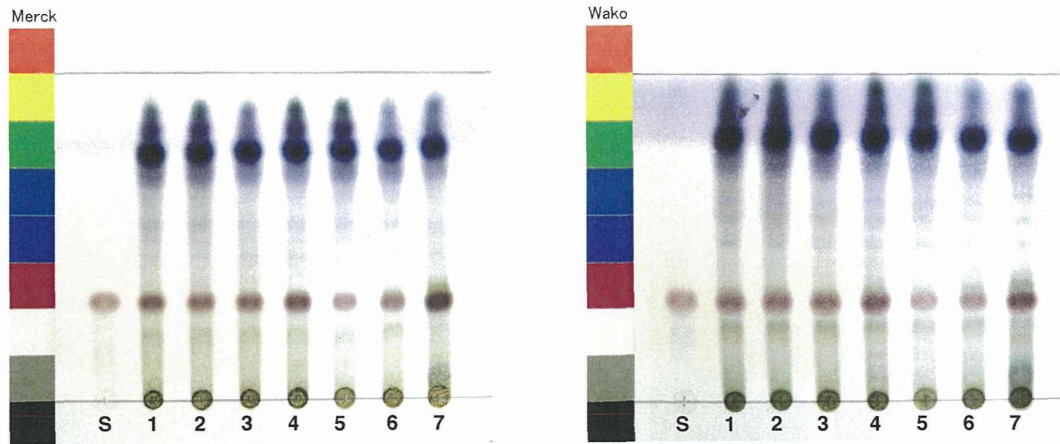


Fig. 13b. 検出方法: 希硫酸噴霧, 105°C5分間加熱

S1: コスツノリド, S2: デヒドロコスツスラクトン, 1~3: 市場品
 展開溶媒: ヘキサン/アセトン混液 (7:3)

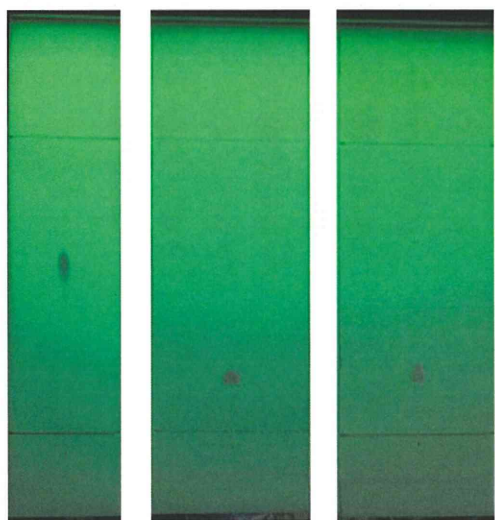
Fig. 13 モッコウの確認試験



S: レンギョール, 1~7: 市場品
 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水混液 (20:3:1)
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧、105°C5分間加熱

Fig. 14 レンギョウの確認試験

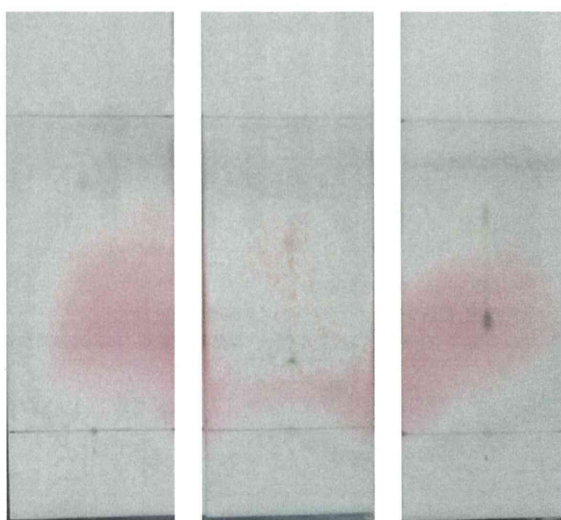
グリチルリチン酸



①和光既
存品
Rf値:0.57
②試作品
Rf値:0.19
③MERCK品
Rf値:0.21

展開溶媒:1-ブタノール/水/酢酸(100)混液(7:2:1)
検出方法:紫外線(主波長254 nm)照射

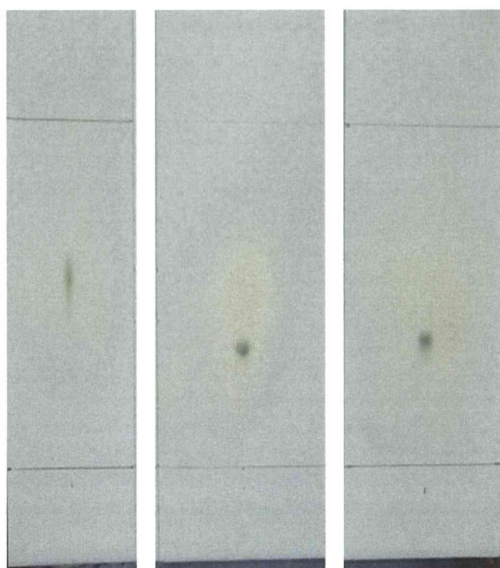
イヌリン



①和光既存品
Rf値:0.79
②試作品
Rf値:0.21
③MERCK品
Rf値:0.36

展開溶媒:エタノール(99.5)/水/酢酸(100)混液(120:80:1)
検出方法:4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・エタノール試液噴霧,
105°C5分間加熱

バイカリン



①和光既
存品
Rf値:0.55
②試作品
Rf値:0.35
③MERCK品
Rf値:0.39

展開溶媒:1-ブタノール/水/酢酸(100)混液(4:2:1)
検出方法:塩化鉄(Ⅲ)・メタノール試液

Fig. 15 Wako の試作品 TLC プレートと既存品との性能比較

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 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究
－漢方薬に使用される薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究－

研究分担者 小松 かつ子 富山大学 和漢医薬学総合研究所 教授
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
研究分担者 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
研究協力者 朱 姝 富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教
研究協力者 佐々木 陽平 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 准教授

7種類の繁用生薬の遺伝子鑑別に関する情報を整備することを目的にして、現在の日本市場に流通している生薬市場品の遺伝子解析を行い、各生薬の基原種の同定に有用な遺伝子領域を次のように明らかにした；キョウカツ：ITS 領域、ケイガイ：ITS 領域、イレイセン：ITS 領域、カンキョウ：trnL-trnF IGS 領域、キジツ：ITS1 領域、エンゴサク：trnL intron 領域。それぞれの領域の塩基配列解析の結果、キョウカツは *Notopterygium incisum*、ケイガイは *Schizonepeta tenuifolia*、イレイセンは *Clematis mandshurica*、カンキョウは *Zingiber officinale*、キジツは *Citrus aurantium*、*C. hassaku* 及びこれらの近縁種、エンゴサクは *Corydalis turtschaninovii* をそれぞれ基原とするものと判断された。キクカについては ITS1 領域と trnH-psbA IGS 領域を検討したが、多数の近縁植物の存在、倍数性、*Chrysanthemum x morifolium* の複雑な種分化の過程などの要因により、基原種鑑別が不可能であった。ただし、trnH-psbA IGS 配列において、*C. morifolium* 由来と推定された試料は全て同一の遺伝子型に帰属された。

A. 研究目的

生薬の安全性と有効性を担保するために行われる品質評価では、第一に生薬の基原の同定が不可欠である。この同定を最も客観的に行なう方法が遺伝子解析である。本研究は、「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、漢方処方配合される重要な生薬

を順次取り上げ、それらの基原植物の遺伝子鑑別に関する情報を収集することにより、同定に有用な遺伝子領域を選択し、実際に現在の日本市場に流通している生薬市場品に対して当該領域の遺伝子解析を行ない、有用性の検証を行なうこと、及び市場品の基原と遺伝子型を明らかにし、日本薬局方に規定されている基原植物と比較することを目的とする。

なお、本研究で収集した遺伝子鑑別に関する情報及び生薬市場品の遺伝子解析結果は、薬用植物総合情報データベースに構築する。

今年度は7種類の生薬、すなわち、キョウカツ、ケイガイ、イレイセン、カンキョウ、キクカ、キジツ、エンゴサクを対象にして研究を行なった。

本報告書では生薬ごとに研究の方法と結果を報告する。

B. 研究方法

研究材料

本研究で使用した試料は、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(生薬市場品)の一部を譲渡されたものである。試料の詳細は、生薬ごとに記す。

1. キョウカツ (小松、朱)

A.1. 研究目的

『神農本草経』の上品の「独活」の別名として「羌活」、「羌青」の名がある。しかし、現在市場に流通する中国産の羌活は、独活とは全く別の植物に由来する。羌活は、鎮痛、鎮痙、新陳代謝賦活薬として、頭痛、関節痛、リウマチ、身体不随、身体疼痛などに応用する。その基原として、『第十六改正日本薬局方』には、セリ科の *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 又は *N. forbesii* Boissieu の根茎及び根が規定されている。『中華人民共和国薬典(2010年版)』でも同様である。

日本漢方生薬製剤協会から発行された原料生薬使用量等調査報告書(2)によると、平成22年度の国内使用量は14,957 kgで、すべてが中国からの輸入品である。

今回、日本市場に流通する「キョウカツ」の基原種を明らかにする目的で、国際塩基

配列データベース(INSD; DDBJ/EMBL/GenBank)に登録されている *Notopterygium* 属植物の遺伝子情報を調べた後、核DNAのITS領域の塩基配列を解析した。

B.1.1. 実験材料

キョウカツ10市場品につき各1検体を取り、試料とした。また、対照として、四川省理県で収集した *N. incisum* に由来する羌活市場品1検体を加えた(Table 1-1)。

B.1.2. 実験方法

1) データベース登録遺伝子情報の検索

INSDにおいて‘*Notopterygium*’をキーワードに検索を行い、*Notopterygium* 属植物の種間識別に関する登録遺伝子情報を抽出した。

2) ITS領域の塩基配列の解析

試料の一部を削り、約100 mgをsteal beads数粒とともに2 mlチューブに入れ、-80°Cで1時間冷凍した。Tissuelyser(Qiagen, Germany)で30/秒、2.5分間振動させ、試料を粉末にした。Steal beadsを取り除き、DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)を用いて全DNAを抽出した。その後、抽出液の一部(2 µL)について1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全DNAの状態を確認した。得られた全DNAを鋳型とし、PCR法でITS1-5.8S-ITS2の全領域をプライマーセットITS-1Fと18S-25S-3'Rを用いて増幅した。増幅が困難なものについては、全領域を2分割し、それぞれプライマーセットITS-1FとIn-18S-25S-3'R, In 18S-25S-5'Fと18S-25S-3'Rを用いて増幅した(Fig. 1-1)。各プライマーの配列をTable 1-2に示した。PCR反応にはKOD-FX-Neo DNA polymerase(東洋紡社)を用いた。反応条件は、ホットスタート94°C 5分、続いて熱変性94°C 30秒、アニーリング55°C 30秒、

伸長反応 68°C 50 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 68°C 10 分で終了し、4°C で保存した。PCR 反応は Takara PCR Thermal Cycler TP600/650 で行った。得られた PCR 産物のうち一部 (2 µL) について 1% アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した後、その残りを Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega 社、USA) で精製した。この PCR 産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) でシークエンシング反応を行った。反応条件は、ホットスタート 96°C 1 分、続いて熱変性 96°C 10 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 4 分の条件を 25 サイクル行い、得られた産物を 4°C で保存した。反応終了後、BigDye X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) を用いて精製し、上澄み液を MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate に移し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。塩基配列データの収集には 3100-Avant Data Collection Software (v2.0, Applied Biosystems) を使用し、その後、Sequencing Analysis Software (v5.3, Applied Biosystems) を使用して配列の解析を行った。次に、得られた配列について、Software multalin program を用いて配列間の比較を行った。

C.1. 研究結果

1) データベース登録遺伝子情報の検索

INSD に登録されている塩基配列を検索し、遺伝子鑑別関連の登録データを抽出した (Fig. 1-2, Table 1-3 ; 2014 年 9 月時点)。キョウカツの基原種として規定される *N. incisum* と *N. forbesii* 以外に、*N. franchetii* Boissieu の登録があり、登録件数はこれら 3 種で 28 件であった。その内訳は、核 DNA の ITS 領域 (ITS1 のみ、ITS2 のみを含む) が 23 件、葉緑体 DNA の *rps16* 領域が 2 件、

rpl16, *matK*, *trnH-psbA* 領域が各 1 件であった。登録件数が多くかつ 3 種ともに登録があった領域は ITS 領域であった。3 種の ITS 配列を比較すると、*N. incisum* 及び *N. forbesii* に若干の種内多型が認められるものの、3 種を区別できることがわかった。そこで、キョウカツ市場品について ITS 領域を解析した。

2) ITS 領域の塩基配列

INSD に ITS の全領域が登録されている *N. incisum* には 3 検体があり、それらは上流から 100 番目及び 536 番目の塩基が異なった。アクセッション番号 DQ278168 は T₁₀₀-T₅₃₆, GQ379335 は C₁₀₀-C₅₃₆, EU236180 は T₁₀₀-C₅₃₆ の配列を有した。一方、*N. forbesii* では 7 検体で全領域が登録され、それらは 5 箇所 (88 番目、97 番目、154 番目、204 番目、209 番目) の塩基の違いにより 2 大別された。*N. franchetii* の GQ379334 は 420 番目の塩基が A、520 番目の塩基が C である以外は *N. forbesii* の 1 タイプ (JF694085, GU390407) の配列に一致した。*N. incisum* と *N. forbesii* の ITS 配列には 25-27 箇所塩基置換が認められ、両種は鑑別可能であった。

医薬基盤研究所より提供されたキョウカツ 10 市場品の内、6 市場品のみ ITS の全領域 (NIB-836, 837, 839, 843) または上流から 559 bp の領域 (NIB-840, 844) の塩基配列を決定できた (Fig. 1-3)。ITS 領域の塩基配列は、ITS1 領域が 216 bp、5.8S rRNA 遺伝子領域が 162 bp、ITS2 領域が 221 bp であった。

NIB-836, 839 は DQ278168 の配列と相同であり、NIB-837, 840, 843, 844 はこれに類似するが各々 1 箇所 (K₁₇₉, Y₃₅₂, Y₅₈₈, S₄₁₉) にヘテロ塩基が認められた。対照にした *N. incisum* 由来の四川省理県産羌活 (TMPW No. 28401) は EU236180 の配列と相同で

あった。

以上により、解析できた市場品はすべて *N. incisum* であると同定した。

D.1. 考察

N. incisum と *N. forbesii* にはそれぞれ種内多型が認められたが、両種は ITS 配列により明らかに区別可能であった。一方、*N. franchetii* の配列は *N. forbesii* に酷似していた。また *N. forbesii* において 5 箇所塩基が異なる 2 タイプが存在した。『和漢薬百科図鑑』¹⁾によれば、*N. franchetii* は *N. forbesii* のシノニムにされる。また、羌活の基原の一つとして *N. forbesii* Boissieu var. *oviforme* (Shan) Chang (= *N. oviforme* Shan) が記載されている。*N. franchetii* と類似した配列を示すものが *N. forbesii* であり、残りの 1 タイプは *N. forbesii* var. *oviforme* とも考えられる。

キョウカツ 4 市場品の内、3 市場品は DNA 量が少なかったため、また 1 市場品はコンタミが原因で、ITS 配列を決定できなかった。

E.1. 結論

キョウカツ 10 市場品の内 5 市場品について、ITS 領域のほぼ全領域の塩基配列を決定できた。得られた配列を INSD に登録されている *N. incisum* 及び *N. forbesii* の配列と比較した結果、すべての市場品が等級や名称に係わらず *N. incisum* であった。

F.1. 参考文献

1) 難波恒雄、『和漢薬百科図鑑』、I、1993、保育社、pp. 89-91.

2. ケイガイ (小松、朱)

A.2. 研究目的

荊芥は『神農本草経』の中品に「假蘇

の原形で記載され、発表、祛風、鎮痙薬として、感冒の発熱、頭痛、咽喉腫痛、瘡瘍腫毒、産後の中風、吐血、衄血、便血、崩漏などに応用する。

その基原として、『第十六改正日本薬局方』には、シソ科のケイガイ *Schizonepeta tenuifolia* Briquet の花穂が規定されている。『中華人民共和国薬典 (2010 年版)』でも同様である。

しかし、中国東北地方市場のものには *S. multifida* Briquet 及びナギナタコウジュ *Elsholtzia ciliate* (Thunb.) Hylander もまれに混入するとされる。その他、中国各省で様々な植物が荊芥と称される¹⁾。

日本漢方生薬製剤協会から発行された原料生薬使用量等調査報告書 (2) によると、平成 22 年度の国内使用量は 118,293 kg (使用量は 43 番目) で、すべてが中国からの輸入品である。

今回、日本市場に流通する「ケイガイ」の基原種を明らかにする目的で、国際塩基配列データベース (INSD; DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている *Schizonepeta* 属植物の遺伝子情報を調べた後、核 DNA の ITS 領域の塩基配列を解析した。

B.2.1. 実験材料

ケイガイ 10 市場品につき各 1 検体を取り、試料とした (Table 2-1)。

B.2.2. 実験方法

1) データベース登録遺伝子情報の検索

INSD において ‘*Schizonepeta*’ をキーワードに検索を行い、*Schizonepeta* 属植物の種間識別に関する登録遺伝子情報を抽出した。

2) ITS 領域の塩基配列の解析

試料の一部を削り、約 100 mg を steal beads 数粒とともに 2 ml チューブに入れ、

-80°Cで1時間冷凍した。TissueLyser (Qiagen, Germany) で 30/秒、2.5 分間振動させ、試料を粉末にした。Steal beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液の一部 (2 µL) について 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、プライマーセット ITS-1F と 18S-25S-3'R を用いて ITS-5.8S-ITS2 の全領域を PCR 法で増幅した (Fig. 2-1)。PCR 反応には KOD-FX-Neo DNA polymerase (東洋紡社) を用いた。反応条件は、ホットスタート 94°C 5 分、続いて熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 68°C 50 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 68°C 10 分で終了し、4°C で保存した。PCR 反応は Takara PCR Thermal Cycler TP600/650 で行った。得られた PCR 産物のうち一部 (2 µL) について 1%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した後、その残りを Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega 社、USA) で精製した。この PCR 産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) でシーケンシング反応を行った。プライマーは PCR 法による増幅で用いたものの他、In-18S-25S-3'R と In-18S-25S-5'F を使用した。反応条件は、ホットスタート 96°C 1 分、続いて熱変性 96°C 10 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 4 分の条件を 25 サイクル行い、得られた産物を 4°C で保存した。反応終了後、BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) を用いて精製し、上澄み液を MicroAmp Optical 96Well Reaction Plate に移し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。塩基配列データの収集には 3100-Avant Data Collection Software (v2.0, Applied Biosystems) を使用し、その後、

Sequencing Analysis Software (v5.3, Applied Biosystems) を使用して配列の解析を行った。次に、得られた配列について、Software multalin program を用いて配列間の比較を行った。

C.2. 研究結果

1) データベース登録遺伝子情報の検索

INSD に登録されている塩基配列を検索し、遺伝子鑑別関連の登録データを抽出した (Fig. 2-2, Table 2-3 ; 2014 年 12 月時点)。 *S. tenuifolia* と *S. multifida* の登録が計 18 件あり、その内訳は、核 DNA の ITS 領域 (ITS2 のみを含む) が 11 件、葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域が 3 件、*trnH-psbA* 領域が 2 件などであった。登録件数が多くかつ 2 種ともに登録があった領域は ITS 領域であった。2 種の ITS 配列を比較すると、7 箇所塩基置換が認められることから、ケイガイ市場品について ITS 領域を解析した。

2) ITS 領域の塩基配列

INSD に ITS の全領域が登録されている *S. tenuifolia* には 5 検体あり、1 検体 (EU591983) を除いて相同の配列を示した。これと、1 検体のみの登録があった *S. multifida* の配列とを比較した結果、上流から 66 番目、105 番目、375 番目、439 番目、481 番目、596 番目、619 番目の計 7 箇所の塩基の違いで区別できることがわかった。

医薬基盤研究所より提供されたケイガイ 10 市場品の内、NIB-853 以外の 9 市場品で ITS の全領域またはほぼ全領域 (NIB-860) の塩基配列を決定できた (Fig. 2-3)。ITS 領域の塩基配列は、ITS1 領域が 232 bp、5.8S rRNA 遺伝子領域が 163 bp、ITS2 領域が 228 bp であった。

9 市場品の ITS 配列はすべて同じで、INSD に登録されている *S. tenuifolia* の 4 検体の配列 (AB557591, JN802670,

EU383034, KM051459) と相同であった。

以上により、解析できた市場品はすべて *S. tenuifolia* であると同定した。

D.2. 考察

今回のケイガイ市場品はすべて河北省産であり、日局規定の *S. tenuifolia* の花穂に由来するという結果であった。*S. multifida* が荊芥として用いられるという記載は、『和漢薬百科図鑑』¹⁾のほか、『中華本草』²⁾にも認められた。ただし、吉林、遼寧、黒竜江、河北省等の自生地のみで使用されるとの記載であった。今回の結果から、ケイガイ市場品中に *S. multifida* が混入しても、ITS 配列により容易に区別できることがわかった。

E.2. 結論

ケイガイ 10 市場品の内 9 市場品について、ITS 領域の塩基配列を決定できた。得られた配列を INSD に登録されている *S. tenuifolia* 及び *S. multifida* の配列と比較した結果、すべての市場品が *S. tenuifolia* であった。

F.2. 参考文献

- 1) 難波恒雄、『和漢薬百科図鑑』、II、保育社、大阪、1994、pp. 52-53.
- 2) 国家中医薬管理局《中華本草》編委会編、『中華本草』、第 19 卷、第 7 冊、上海科学技术出版社、上海、1999、pp. 194-199.

3. イレイセン (佐々木)

A.3. 研究目的

威霊仙は宋代の『開宝本草』に初収載された生薬で去風湿薬として「疎経活血湯」などの漢方処方に配合され、神経痛、慢性関節リウマチなどの治療に用いられてきた。原植物はキンポウゲ科の *Clematis* 属植

物の根に由来するが、多くの異物同名品が使用された時代もあった。異物同名品とはシソ科クガイソウ *Veronicastrum japonicum* (Nakai) T. Yamazaki やユリ科の *Smilax* 属植物などであるが、現在の市場にはほとんど見られない。現在、『第十六改正日本薬局方』では、サキシマボタンヅル *Clematis chinensis* Osbeck, *C. mandshurica* Ruprecht 又は *C. hexapetala* Pallas の根及び根茎であるとされている。一方、『中華人民共和国薬典 (2010 年版)』では、*C. chinensis*, *C. hexapetala* 又は *C. mandshurica* の乾燥根及び根茎であるとされる。

現在、日本で使用している威霊仙はすべて中国からの輸入品である。生薬の品質評価のためには、基原種は日本薬局方規定の種であるか否か、規定種であればどの種かを鑑別することは必要不可欠である。*Clematis* 属については既報¹⁾により核 ITS 領域の塩基配列を比較することにより種の鑑別が可能であることが示されている。実験材料として、威霊仙の原植物となり得る 9 種 (*C. hexapetala*, *C. mandshurica*, *C. chinensis*, *C. terniflora* var. *robusta*, *C. terniflora* var. *koreana*, *C. brachyura*, *C. patens*, *C. florida*, *C. ianthiana*) が検討されており、これらの ITS 配列と比較することにより、同定可能である。そこで今回、日本市場に流通する「イレイセン」の基原種を明らかにする目的で、核 ITS 領域の塩基配列を解析した。

B.3.1. 実験材料

イレイセン 15 市場品につき各 1 検体を取り、試料とした (Table 3-1)。

B.3.2. 実験方法

試料の一部を削り、約 100 mg を液体窒素で凍結、粉碎し、1.5 mL チューブに入れた。この粉末に対し DNeasy Plant Mini Kit

(Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。抽出液の一部をとり、分光光度計により濃度を測定した。抽出した全 DNA のうち、一部は Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) (株式会社ニッポンジーン Lot No. 02253J) を使用してタンパク質を沈殿させた後、エタノール沈殿を行って DNA を精製した。次に PCR 法により核 ITS 領域を増幅した (Fig. 3-1)。使用したプライマーは、ITS1 領域についてはプライマーセット Akebi-F (GCT CCT ACC GAT TGA ATG GT) と Akebi-26SR (GTA AGT TTC TTC TCC TCC GC) である。PCR 法の反応液は、全量 25 μ L 中、dNTP 0.2 mM が 5 μ L、2xPCR buffer for KOD-FX-Neo 12.5 μ L、各プライマー 0.75 μ L、KOD-FX-Neo DNA polymerase (TOYOBO) 0.5U、鋳型の全 DNA 約 100 ng である。昇温プログラム (TaKaRa Thermal Cycler Dice) は、ホットスタート 94°C 2 分、熱変性 94°C 15 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 68°C 45 秒の条件を 30 サイクル行い、最後に 68°C 5 分で終了し、4°C で保存した。得られた PCR 産物のうち一部 (3 μ L) について 1.5% アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した後、その残り (22 μ L) を Fast Gene Gel/PCR Extraction kit (日本ジェネティクス株式会社) で精製した。この PCR 産物について BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) でシーケンシング反応を行った。昇温プログラム (株式会社アステックプログラムテンプコントロールシステム PC-320) はホットスタート 96°C 1 分、続いて熱変性 96°C 10 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 4 分の条件を 25 サイクル行い、得られた産物を 4°C で保存した。反応終了後、エタノール沈澱法によって精製し、ABI PRISM 310-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。増幅及びシーケンシング反応に使用

したプライマーは Fig. 3-1 のとおりである。塩基配列の解析、比較にはソフトウェア DONASIS Mac v.3.0 を使用した。

C.3. 研究結果

15 市場品から得た 15 検体について全 DNA を抽出し、ITS 領域について PCR 法による増幅を行った結果、3 検体 (NIB-0757, NIB-0758, NIB-1126) のみ増幅断片が得られた。塩基配列を解析した結果、*C. mandshurica* の配列と相同性を認めた。DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている同種の配列 JF778872 及び AB775147 と比較した結果を Fig. 3-2 に示す。18S, ITS1, 5.8S, ITS2 の領域は AB775147 と比較して決定した。すなわち、ITS1 領域は 172 bp, 5.8S rRNA 遺伝子領域は 159 bp, ITS2 領域は 220 bp であった。*C. mandshurica* と同属他種を鑑別し得る種特異的な塩基は ITS1 領域における 74 番目から 80 番目の配列 ACGGGTC である。また 143-144 番目が AA, 150-151 番目が GC, 159 番目が A であることから指示された。

D.3. 考察

日本市場に流通するイレイセンとして、*C. mandshurica* を原植物とするものを確認した。一方で、12 検体から PCR 法において ITS 領域を増幅するために適した DNA を得ることができなかった。理由として、威霊仙から抽出した全 DNA に不純物が含まれていること、DNA 自体が抽出されにくいことが挙げられる。このことは分光光度計の測定結果から充分考えられた。前者のような検体については全 DNA 溶液の精製試薬、例えば Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) (株式会社ニッポンジーン) や GENE CLEAN Kit (MP-Biomedicals) などを使用して精製を試みたがいずれも増幅を認めなかった。

塩基配列の解析が可能であった3検体はいずれも刻み（切断）生薬であった。全形または原形生薬からの全 DNA 抽出の際、始めは根の部分を使用していた。刻み生薬が成功した結果を受けて、同様に根の基部からの抽出を試みたがいずれも失敗に終わった。しかし刻み生薬のみが成功しているという事実を考えると、刻み生薬であることが有利である。今回は実施しなかったが、ある程度の大きさの全形生薬を切断、または粉末化し、これを検体として使用することで PCR 法に適した全 DNA を抽出できる可能性が考えられる。

E.3. 結論

既報¹⁾の ITS 領域の塩基配列に基づき、市場品イレイセンの原植物を検討した結果、解析可能であった3検体はいずれも、*Clematis mandshurica* と同定された。すなわち、第十六改正日本薬局方で規定される原植物の一つであることを確認できた。一方で12検体からはPCR法に適した全DNAを抽出、精製することができなかった。これについては今後、克服すべき課題である。

F.3. 参考文献

1) Han Y., Kitaoka F., Mano M., Sasaki Y., Mikage M., ITS analysis of *Clematis* plants from East Asia and the botanical origin of *Clematidis Radix* sold in modern markets. *J. Trad. Med.*, **30**: 91-101(2013).

4. カンキョウ（丸山）

A.4. 研究目的

カンキョウは、温補薬に分類される生薬の一つであり、一般用漢方処方の承認審査基準に収載される294処方のうち、約10%の処方に配合される重要生薬である。

第十六改正日本薬局方(JP16)において、

カンキョウは、ショウガ *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae) の根茎を湯通し又は蒸したものであると定義されている。一方、同じショウガを基原とする生薬として、ショウキョウがあり、このものは、JP16において、*Z. officinale* Roscoe の根茎で、ときに周皮を除いたものであると規定されている。

本研究班では、既にショウキョウの遺伝子情報が取得済みであり、10検体のショウキョウについて、葉緑体 DNA の *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列が、データベースに登録されていることから、本研究では、カンキョウについても、上記の塩基配列解析を行った。

B.4.1. 実験材料

カンキョウ17試料（市場品）につき各1検体を検討した（Table 4-1）。

B.4.2. 実験方法

各試料を、MM-300 (Qiagen) により粉碎し、試料の粉末、約 20 mg を TE buffer 300 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit (Promega) に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument (Promega) により、genomic DNA を抽出、精製した。

このものを鋳型とし、葉緑体 DNA の *trnL* 領域の exon 1, 2 及び *trnF* 領域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 *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域を含む DNA 断片をそれぞれ別々に増幅した。ただし、*trnL* intron 領域に関しては、nested PCR を用いたため、5' 側の 23 塩基が欠けた部分配列を増幅した。PCR に使用された各プライマーの配置及び配列を Fig. 4-1 に示した。PCR は、酵素に、BIOTAQ Hot Start DNA Polymerase (Bioline) を、PCR 試薬として

Ampdirect plus (Shimadzu) を用いて、以下の温度プログラムにより行われた: 95°C 10 min; 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 50 cycle; 72°C 7 min。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。塩基配列解析は、fasmac 社の受託解析により行われた。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

C.4. 研究結果

TrnL intron 領域の部分配列は、全 17 検体中、7 検体 (RgKw-6, 9, 10, 13-15, 17) で塩基配列を決定出来た。全ての配列が一致し、全長は、496 bp であった。この配列について、Blast Search Program による相同性検索を行ったところ、国際塩基配列データベース (INSD) 上の *Z. officinale* の配列 3 種 (Acc. Nos.: HM567394-96) と一塩基を除き、一致した。

一方、*trnL-F* IGS 領域は、12 検体 (RgKw-1, 3, 6, 9-17) で塩基配列を決定出来た。本領域についても、全検体中において、同一の塩基配列を示し、全長は、328 bp であった。相同性検索の結果、データベース上の *Z. officinale* の配列 5 種 (Acc. Nos.: KF694893, HM567394-97) と完全に一致した。また、上記の配列は、いずれも本研究班で既に塩基配列解析が終了しているショウキョウ由来の配列と一致した。

D.4. 考察

市場に流通するカンキョウの *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析を行った結果、前者の領域において、10 検体、後者の領域において、5 検体が、PCR 増幅が出来ず、塩基配列の決定が不可能であった。既に遺伝子情報の取得が終了しているショウキョウの塩基配列解析では、い

ずれの試料においても、上記の 2 領域を一度の PCR で増幅出来ており、今回、各領域に分けて PCR 増幅を行ったにもかかわらず、PCR 産物が得られない試料が多く見出された背景には、カンキョウの調製時における熱処理による DNA の分解 (断片化) があると推察される。また、*trnL-trnF* IGS 領域において塩基配列が決定出来なかった 5 検体のうち、RgKw-4, 5, 7, 8 は、いずれも今回の試料の中では、入手年が古いものであることから (RgKw-2 は、入手年不明)、これらの検体では、時間経過により、試料中の DNA の分解が、他の試料よりも進んでいたため、PCR 増幅が出来なかったと推察された。*trnL-trnF* IGS 領域に比べ、*trnL* intron 領域において、PCR の成功率が低かった点については、後者の領域の方が、より長い配列を有していたことが要因と思われる。

塩基配列の決定が可能であった各検体における内部配列については、どちらの領域においても、JP16 で規定する基原植物である *Z. officinale* の配列と一致あるいは、ほぼ一致した。また、前述の通り、ショウキョウの国内市場品由来の配列とも完全に一致しており、生薬、ショウキョウ及びカンキョウの調製に用いられる *Z. officinale* の *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列は、安定していることが明らかになった。

INSD に登録されている *Zingiber* 属植物 5 種 (*Z. cylidricum*, *Z. junceum*, *Z. nimmonii*, *Z. odoriferum*, *Z. parishii*) の *trnL-trnF* IGS 領域の配列を、今回の研究で得られた同領域の塩基配列と比較した結果、*Z. officinale* と他の同属植物は、十分に区別可能であった。このことから、PCR 増幅の成功率も考慮すると、カンキョウの基原植物の鑑別には、*trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析が有用であると考えられる。

E.4. 結論

市場に流通するカンキョウの遺伝子情報の整備を目的に、葉緑体 DNA の *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、カンキョウの基原植物の鑑別には、PCR 増幅の成功率も考慮すると、*trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析が有用であると考えられる。

5. キクカ (丸山)

A.5. 研究目的

キクカは、辛涼發表薬に分類される生薬の一つであり、主な薬理活性として清熱、明目作用が知られている。また、一般用漢方処方方の承認審査基準に記載される 294 処方のうち、6 処方に配合される生薬である。

第十六改正日本薬局方 (JP16) において、キクカは、キク *Chrysanthemum morifolium* Ramatulle 又はシマカンギク *Chrysanthemum indicum* Linné (Compositae) の頭花であると定義されている。

本研究では、国際塩基配列データベース (INSD; DDBJ/EMBL/GenBank) 中の *C. morifolium*, *C. indicum* の登録情報を検索した上で、鑑別情報を得るために、適切と考えられた遺伝子領域について、塩基配列解析を行った。

B.5.1. 実験材料

JP16 では、キク及びシマカンギク由来のキクカの性状を下記のように規定している。キク由来：本品は径 15 ~ 40 mm の頭花で、総ほうは 3 ~ 4 列の総ほう片からなり、総ほう外片は線形~ひ針形、内片は狭卵形~卵形を呈する。舌状花は多数で、類白色~黄色、管状花は少数で淡黄褐色を呈し、ときに退化して欠くことがある。総ほうの外面は緑褐色~褐色を呈する。質は軽く、砕きやすい。本品は特有のにおいがあり、味

はわずかに苦い。

シマカンギク由来：本品は径 3 ~ 10mm の頭花で、総ほうは 3 ~ 5 列の総ほう片からなり、総ほう外片は線形~ひ針形、内片は狭卵形~卵形を呈する。舌状花は一輪で、黄色~淡黄褐色、管状花は多数で淡黄褐色を呈する。総ほうの外面は黄褐色~褐色を呈する。質は軽く、砕きやすい。本品は、特有のにおいがあり、味はわずかに苦い。

この記述に基づき、試料 (市場品) を確認した結果、KiKw-2, 8, 10, 12 が、キク由来、その他が、シマカンギク由来であると判断された (Table 5-1, Fig. 5-1)。

B.5.2. 実験方法

1) INSD 検索

DDBJ のホームページ上で提供されているサーチエンジン (<http://arsa.ddbj.nig.ac.jp/html/>) を用い、*C. morifolium*, *C. indicum* の配列情報を検索した。

2) 塩基配列解析

各試料、2 検体を、別々に、MM-300 (Qiagen) により粉碎し、試料の粉末、約 10 mg を TE buffer 200 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit (Promega) に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16Instrument (Promega) により、genomic DNA を抽出、精製した。

このものを鋳型とし、植物の核 rDNA 領域及び葉緑体 DNA の *trnH*, *psbA* 領域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 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域を含む 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, 50°C 30 sec, 68°C 30 sec, 50 cycle; 68°C 2 min。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。PCR による目的遺伝子領域の増幅、塩基配列解析のプロセスは、各検体、2 回行い、PCR 酵素による塩基の取り込みミスが疑われた試料については、3 回目の解析を行った。塩基配列解析は、fasmac 社の受託解析により行われた。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

C.5. 研究結果

1) INSD 検索

キク属の学名については、日局で使用されている *Chrysanthemum* 属の他に、Flora of Japan では、*Dendranthema* 属が使用されている。そこで、双方の属名を用いて、DDBJ のサーチエンジンにより、検索をかけた結果、'Dendranthema' を用いた場合においても、*Chrysanthemum* 属として登録されている配列のみが、結果として得られたことから、検索は、'Chrysanthemum' を用いて行うこととした。

C. morifolium, *C. indicum* 由来の塩基配列情報を検索した結果、それぞれ、8023、1783 件が見出された。この内、植物の分類に用いられる遺伝子領域の情報は、核 rDNA の ITS 領域に関するものが、194 及び 420 件、*trnL-trnF* IGS 領域に関するものが、7 及び 404 件、*trnH-psbA* IGS 領域に関するものが、9 及び 388 件であった。

TrnL-trnF 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域について、Liu ら¹⁾ 及び Zhao ら²⁾ が、論文報告している配列を抽出し、系統樹を作成したところ、Figs. 5-2, 5-3 のような結果となった。*TrnL-trnF* 領域が、アウトグループとして使用した *Artemisia* 属植物の配列と入り組んだ樹形を示したのに対し、*trnH-psbA* IGS 領域では、アウトグループである *Artemisia* 属植物の配列が、他の配列

と最も離れた位置に配置され、*C. morifolium* の 2 つの配列との間に、*C. indicum* の 4 つの配列が位置する結果となった。

上記の結果から、本研究では、核ゲノム遺伝子領域である ITS1 領域に加え、葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の配列解析を行うこととした。

2) ITS1 領域の塩基配列解析

医薬基盤研究所より提供を受けたデータベース用の 12 試料について、INSD の登録数が最も多かった ITS 配列の内、ITS1 領域を解析した。ただし、KiKw-5, 7 は、3 検体を試験に供したが、PCR 産物が得られたのは、1 検体のみであった。塩基配列解析の結果を Fig. 5-4, Table 5-2 にまとめた。解析可能だった 22 検体より、13 個の遺伝子型が見出され、その全長は、いずれも 255 bp であった。変異は、13 箇所認められ、そのすべてが、いずれかの遺伝子型で塩基の重複を示す部位であった。最も多くの検体が帰属された遺伝子型は、genotype 3 の 5 検体であり、この遺伝子型を持つものは、いずれもキク由来の試料であった。同一ロット内の 2 検体で、同じ遺伝子型を示したものは、KiKw-2, 8, 10 の 3 試料であった。Blast search program による相同性検索の結果、いずれの遺伝子型も、データベース上の *C. vestitum*, *C. rhombifolium*, *C. lavandulifolium*, *C. indicum*, *C. morifolium* などの配列と非常に高い相同性を示した。登録配列数が膨大なため、全てを確認することは不可能だったが、確認した限りにおいては、塩基の重複が見られた部位を除き、一致する配列であった。

3) *TrnH-psbA* IGS 領域の塩基配列解析

ITS1 領域と同様の方法で、*trnH-psbA* 領域の塩基配列解析を行った。ただし、このものについても、ITS1 領域と同様、KiKw-7