

厚生労働行政推進調査事業費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
分担研究報告書

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査・分析及び量的概念を含む専ら医薬品の
規制に関する研究

研究分担者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

日本国外で流通する何首烏及び関連生薬の基原種調査

研究協力者 佐藤 直子 国立医薬品食品衛生研究所 前・生薬部非常勤職員
(現・食品添加物部研究員)

何首烏は日本薬局方収載生薬のひとつであり、古くから強壯、解毒、補血、緩下のために用いられている。一方、韓国では何首烏の代わりに白首烏が使用されてきたが、近年これと形態のよく似た異葉牛皮消との誤用が問題となっている。現在のところ、日本に医薬品として流通しているのは何首烏のみであり、白首烏及び異葉牛皮消の誤用は報告されていないが、今後日本でも白首烏配合製品が流通する可能性が高く何首烏と誤用される危険性も高まる。本研究では、日本国外として中国市場において何首烏、白首烏、異葉牛皮消として流通する生薬の基原種について、成分と遺伝子の両面から調べ実態を調査した。その結果、中国市場で何首烏として流通するものでも基原種に誤りはなく、日本では医薬品として認められていない白首烏や異葉牛皮消とは成分・遺伝子どちらの方法でも明らかに区別できることが示された。一方、白首烏と異葉牛皮消は基原種に混乱がみられた。

研究協力者

天倉 吉章 松山大学薬学部 教授
丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 室長
内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 室長
政田さやか 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

A. 研究目的

何首烏は、日本薬局方(第十六改正)収載生薬のひとつであり、ツルドクダミ(*Polygonum multiflorum* Thunberg)の塊根である。古くから、強壯、解毒、補血、緩下のために用いられているが、韓国では何首烏の基原植物が自生せ

ず、代わりに白首烏も使用されてきた。白首烏の基原種について、日本に公の定義はないが、韓国ではコイケマ(*Cynanchum wilfordii* Hemsley)の根を基原とする生薬であると規定されている(表1)¹⁾。

近年、白首烏配合の健康食品が主に更年期障害を改善する²⁾目的で、韓国国内で多く流通している。しかし、2015年4月、食品医薬品安全処(KFDA)が韓国市場に流通する白首烏配合製品を調査した結果、65%の製品に白首烏と形態のよく似た異葉牛皮消が違法に使用されていることが明らかとなった^{3, 4)}。異葉牛皮消は*C. auriculatum* Royle ex Wightの根である

が、*C. auriculatum* を妊娠中の雌豚に与えると流産を惹起するという報告があり、アメリカ食品医薬局 (FDA) が運営しているデータベースでは有毒植物として記載されているものである⁵⁾。今回のような白首烏と異葉牛皮消の誤用は韓国では古くから問題となっており、これまでに PCR 法を用いた両者の鑑別法が多く報告されており^{6,7)}、大韓薬典外韓薬 (生薬) 規格集にも記載されている⁸⁾。

現在のところ、日本に医薬品として流通しているのは何首烏のみであり、白首烏及び異葉牛皮消の誤用は報告されていない。しかし、上述の白首烏配合製品のなかにはアメリカですでに販売されているものもあり、日本でも機能性表示食品として許可を取る目的で日本人を対象とした臨床試験が行われている⁹⁾。今後、日本でも白首烏配合製品が流通する可能性が高く、それに伴い白首烏の流通が盛んになれば何首烏と誤用される危険性も高まる。そこで、日本国外 (中国市場) で何首烏、白首烏、異葉牛皮消として流通する生薬の基原植物について、成分と遺伝子の両面から調べ実態を調査したので報告する。

B. 研究方法

実験材料

本研究に使用した何首烏、白首烏および異葉牛皮消 (耳葉牛皮消) の詳細を表 2 に示す。これら生薬はすべて国内生薬メーカーを通じて入手した。

高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による分析

a) 試薬及び装置

高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) は、HPTLC Silica gel 60 F254 Glass plate (20×10 cm) (Merck 社製) を用いた。試料溶液注入には、TLC サンプルアプリーケーター リノマート V、TLC 画像の撮影には、TLC 撮影システム

TLC ビジュアライザー (いずれも CAMAG 社製) を使用した。

検出は、紫外線 (UV) 照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液 (局方に準拠して調製) により行った。

b) 試料溶液の調製及び分析条件

各試料の試料溶液の調製は、以下のように行った。また、すべての試料溶液は HPTLC ガラスプレートにスポットし、約 7 cm 展開した。各スポットのバンド幅は 8 mm、バンド間隔 2 mm とした。

試料調製 各試料の粉末 0.5 g にメタノール 5.0 mL を加え、約 5 分間超音波処理を行った。自然ろ過後、得られたろ液を蒸発乾固し、残留物をメタノール 1 mL に溶解したものを試料溶液とした。

HPTLC 条件 注入量: 各 3 μ L, 展開溶媒: 酢酸エチル/水/メタノール/酢酸 (100) (200:10:10:3), 検出: UV 照射 (254, 366 nm), 希硫酸噴霧試液噴霧後、加熱。

塩基配列解析

a) DNA 抽出

生薬試料を 20–30 mg 量りとり、粉碎したものを DNA 抽出用試料とした。DNA 抽出には DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) 及び QIAcube™ (QIAGEN) を使用した。

b) PCR 条件

核 rDNA の Internal transcribed spacer region (以下 ITS 領域) の増幅には ITS5A 及び ITS4 を^{10,11)}、葉緑体 DNA *trnL-trnF* intergenic spacer (以下 *trnL-trnF* 領域) には *trnL*F-c 及び *trnL*F-f を¹²⁾、同じく葉緑体 DNA *trnH-psbA* intergenic spacer region (以下 *trnH-psbA* 領域) には *PsbA3_f* 及び *TrnHf_05* を^{13,14)} それぞれプライマーとして用いた。これらプライマー配列を表 3 に示す。

PCR 反応液は、どの領域を増幅する場合も同じく、KOD FX Neo (TOYOBO) 0.5 μ L, 2×PCR

buffer for KOD FX Neo 12.5 μ L, dNTPs 0.2 mM, forward 及び reverse primer 各 0.2 μ M を含むものに, 0.5 μ L の DNA 溶液を加え全量を 25 μ L とした. PCR 反応は DNA Engine thermal cycler (Bio-Rad) を用いて行い, 温度プログラムは (94°C, 2 min) \times 1 cycle, (98°C, 10 sec; 60°C, 30 sec; 68°C, 70 sec) \times 31 cycles, (68°C, 70 sec) \times 1 cycle とした. なお, 増幅産物はマイクロチップ電気泳動装置 MCE202 MultiNA (Shimadzu) を用いて泳動し確認した.

増幅産物精製及び配列解析

PCR 反応により得られた増幅産物は, MiniElute® PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し, ユーロフィンジェノミクス株式会社 に委託してダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した. これら配列について, BLAST 相同性検索により基原種を推定した.

C. 研究結果

高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による分析

何首鳥及び類似生薬計 19 検体について, HPTLC 分析を行った結果を図 1 に示す. 分析の結果, 何首鳥とラベルされている検体 (Sample nos. 1, 2, 5-7, 15-17; 以下パターン A) の分離パターンは白首鳥や異様牛皮消とされる検体の分離パターンと明らかに区別された.

一方, 白首鳥または異葉牛皮消とされる検体では, 2 種類の分離パターンが見られた (図 1). すなわち Sample nos. 3, 8-12, 14, 18 で見られたパターン (以下, パターン B) と Sample nos. 4, 13, 19 で見られたパターン (以下, パターン C) である. パターン B を示したのはほとんどが白首鳥として流通していたものであったが, Sample no. 18 のみ耳葉牛皮消として流通するものであった. また, パターン C を示した 3 検体のうち, Sample nos. 4, 19 は牛

皮消とされる検体であったが, Sample no. 13 のみ白首鳥として流通するものであった. これらの結果から, 入手した生薬試料の中に, 生薬のラベルと中身が異なるものが存在する可能性が示唆された. そこで, これら 19 検体について遺伝子配列から基原種の推定を試みることにした.

ITS 領域, psbA-trnH 領域及び trnL 領域の塩基配列解析

表 2 に示す何首鳥及び類似生薬について, ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域の配列を調べ, 基原種の推定を行った (表 4, 5). なお, Sample no. 8 からは DNA が抽出されなかった.

生薬購入時に何首鳥とラベルされている検体 (Sample nos. 1, 2, 5-7, 15-17, HPTLC パターン A に該当) はすべて, 何首鳥の基原植物である *P. multiflorum* の ITS 及び *trnL-trnF* 領域 (表 4) と最も高い配列相同性を示した. これら検体の *trnH-psbA* 領域の配列はダイレクトシーケンスでは解析できなかったものの, ITS 及び *trnL-trnF* 領域の結果から生薬購入時に何首鳥とラベルされている検体 (Sample nos. 1, 2, 5-7, 15-17) はすべて *P. multiflorum*, すなわち何首鳥の正しい基原種から生産されたものであることが示された. これにより, HPTLC でパターン A を示す検体は何首鳥であると考えられた (表 5).

一方, 白首鳥 (Sample nos. 3, 9-14) 及び異葉牛皮消 (Sample nos. 4, 18, 19) とされている検体の ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域を解析したところ, どの領域でも sample nos. 3, 9-12, 14, 18 のグループと sample nos. 4, 13, 19 のグループにわかれた. これらのグループはそれぞれ HPTLC のパターン B (ただし Sample no. 8 は DNA 抽出されなかったため含まれず) とパターン C とに完全に一致した. パ

ターン B 検体の ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域はそれぞれ *C. auriculatum* の ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域 (GenBank accession nos. EU580717, KT220734 and JX028242) と一致した. このことから, HPTLC でパターン B を示す検体の基原種は *C. auriculatum* であると推定された(表 5). 一方, パターン C 検体の ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域は, *C. wallichii* のもの(GenBank nos. LN896989, LN896868 and LN896761) とそれぞれ最も高い配列相同性を示した. そのため, これらの基原種は, *C. wilfordii* でも *C. auriculatum* でもない *Cynanchum* 属植物由来である可能性が考えられた(表 5).

以上の結果をまとめると(表 5), 生薬購入時に何首烏とラベルされていた検体はすべて, 生薬名から予想される基原種と遺伝子から推定される基原種が一致した. 一方, 白首烏あるいは異葉牛皮消とラベルされていたもので予想される基原種と遺伝子から推定される基原種が一致したと考えられるものは Sample no. 18 のみであった. 残りの検体については, 白首烏として購入した検体の殆どは異葉牛皮消の基原種 (*C. auriculatum*) 由来のものであり, 異葉牛皮消として購入したものは *Cynanchum* 属と推定されるものの, 基原種は不明であった.

D. 考察

本研究で用いた検体は, 表 2 に示すようにすべて中国産生薬である. 一方, 白首烏の基原植物を公に定義しているのは韓国のみである. 今回, 白首烏の基原種が異葉牛皮消の基原種と入れ替わっている可能性があるという結果を受け, 中国で両生薬の基原植物がどのように規定されているかを調べた(表 1). 中国の薬局方である中国薬典には白首烏, 異葉牛皮消ともに中国薬典への収載はないが, 中国で扱われる生

薬を記載している中薬大辞典には両生薬に関する記述がある. これによると, 白首烏[bai-shou-wu]の基原植物は *C. auriculatum* Royle ex Wight とされており¹⁵⁾, 韓国で白首烏の基原植物とされる *C. wilfordii* の根は隔山消[ge-shan-xiao]と記されていた¹⁶⁾. さらに, 白首烏の別名として隔山消が, 隔山消の別名として白首烏が挙げられており, 両生薬の区別が曖昧であることが推察されたうえ, どちらかといえば *C. auriculatum* の根が白首烏として認識されているように思われた. 中国から報告された白首烏を題材とした科学論文でも, *C. auriculatum* と *C. wilfordii* の両方が bai-shou-wu (白首烏) の基原として記述されていた¹⁷⁾. 本研究で用いた検体はすべて中国産であったため, 白首烏として購入したほとんどの生薬でその基原種が異葉牛皮消のものに入れ替わるという現象が起こったと考えられる. 今後, 韓国産の白首烏や異葉牛皮消の遺伝子についても検討したいと考えている.

E. 結論

何首烏として流通する生薬については, 本研究で調査した限りでは正しい基原植物が用いられていた. 何首烏の基原植物として定められているものは日中韓で一致していることもあり, 何首烏として扱われているものの中に日本で医薬品としては認められていない白首烏や異葉牛皮消が混入する可能性は低いと思われた.

一方, 中国で流通している白首烏と異葉牛皮消の基原植物は, 韓国で定められているものと異なることが明らかとなった. この一因として, 中国と韓国とで白首烏の基原植物とされる種が一致していないことが挙げられる. そのため, 輸入先が中国か韓国かによって基原植物が異なる可能性が高く, 同じ「白首烏」を入手したつもりでもその品質が大きく異なる危険性が

示唆された。日本での流通実績がほとんどなく定義の曖昧な原料を健康食品等で使用する場合、異物同名が存在しないかなどを見極める必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 佐藤 (増本) 直子, 内倉崇, 杉脇秀美, 好村守生, 政田さやか, 内山奈穂子, 丸山卓郎, 天倉吉章, 袴塚高志: 国外で流通する何首烏及び関連生薬の基原種について. 日本生薬学会第 63 回年会 (2016. 9)

2. 誌上発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

参考文献

- 1) The Korean Herbal Pharmacopoeia. Korea Food and Drug Administration, p. 98 (2002).
- 2) Chang A, Kwak BY, Yi K, Kim JS (2012) The effect of herbal extract (EstroG-100) on pre-, peri- and post-menopausal women: a randomized double-blind, placebo-controlled study. *Phytother. Res.* **26**: 510-516.
- 3) Ministry of Food and Drug safety, Korea. <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=676&seq=27270> (accessed 2016-12-13).
- 4) 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部, 食品安全情報 (化学物質) No. 9/2015. p. 22. <http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/2015/foodinfo201509c.pdf> (accessed 2016-12-13).
- 5) U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Poisonous Plant Database. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/Planttox/Detail.CFM?ID=11513> (accessed 2016-12-13).
- 6) Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Lee KH, Kim JH, Seong RS, Kang TS, Lee JH, Jang YM (2015). Development of primer sets for the detection of *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*. *J. Food Hyg. Saf.* **30**: 289-294.
- 7) Kim MK, Wang H, Kim YJ, Sathiyamoorthy S, SaengKwon W, Yang DC (2013). Molecular authentication by multiplex-PCR of three similar medicinal plant species: *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*). *J. Med. Plants Res.* **7**:2584-2589.
- 8) Ministry of Food and Drug safety, Korea. 대한약전외한약(생약) 규격집수재생약(KH P) “Cynanchi Wilfordii Radix.” http://www.mfds.go.kr/files/upload/herbmed/photo_data/KHP1352.pdf (accessed 2016-12-13).
- 9) UMIN Clinical Trials Registry (UMIN-CTR). “Clinical study on the efficacy and safety of EstroG-100J for menopausal symptoms: randomized double-blinded controlled study”. UMIN test ID: UMIN000015967. https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000018381 (accessed 2016-12-13)
- 10) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322

- in: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. & White, T. (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- 11) Downie SR, Katz-Downie DS (1996) A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* **83**: 234–251.
 - 12) Taberlet PL, Gielly G, Pautou J, Bouvet K (1991) Universal primers for amplification of three non-coding region of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**:1105–1109.
 - 13) Samg T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* **84**:1120–1136.
 - 14) Tate JA, Simpson BB (2003) Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* **28**: 723–737.
 - 15) 南京中醫葯大學編著, 中葯大辭典 上 (第二版)., 上海科學技術出版社, p. 1007 (2006).
 - 16) 南京中醫葯大學編著, 中葯大辭典 下 (第二版)., 上海科學技術出版社, p. 3395 (2006).
 - 17) Zhang X, Shan L, Huang H, Yang X, Liang X, Xing A, Huang H, Liu X, Su J, Shang W (2009) Rapid identification of acetophenones in two *Cynanchum* species using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**: 715–725.

表 1 各国における生薬名とその基原植物名のちがい

基原植物（学名）	和名	生薬名		
		日本	韓国	中国
<i>Polygonum multiflorum</i>	ツルドクダミ	何首烏 ^{1)*}	何首烏 ^{2)*}	何首烏 ^{3)*}
<i>Cynanchum wilfordii</i>	コイケマ	—	白首烏 ^{4)*}	隔山消, 隔山牛皮消, 白首烏 ⁵⁾
<i>Cynanchum auriculatum</i>	—	—	牛皮消	白首烏, 隔山消 ⁵⁾

¹⁾日本薬局方第 17 改正, ²⁾大韓薬典, ³⁾中国薬典, ⁴⁾大韓薬典外韓薬（生薬）規格集, ⁵⁾中薬大辞典.

*各国で公定規格が整備されているもの.

表 2 本研究で用いた生薬市場品

Sample no.	購入時の生薬名	流通市場	産地
1	何首烏	中国	四川省
2	何首烏	中国	四川省
3	白首烏	中国	江蘇省
4	異様牛皮消	中国	広西
5	何首烏	中国	四川省
6	何首烏	中国	四川省
7	何首烏	中国	四川省
8	白首烏	中国	広西
9	白首烏	中国	江蘇省
10	白首烏	中国	江蘇省
11	白首烏	中国	江蘇省
12	白首烏	中国	江蘇省
13	白首烏	中国	江蘇省
14	白首烏	中国	江蘇省
15	何首烏	中国	広西
16	何首烏	中国	四川省
17	何首烏	中国	四川省
18	耳葉牛皮消	中国	江蘇省
19	耳葉牛皮消	中国	江蘇省

表 3 本研究で用いたプライマー配列

プライマー名	配列
ITS5a	5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
PsbA3_f	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'
TrnHf_05	5'-CGCGCATGGTGGATTACAAATCC-3'
trnLF-c	5'-CGAAATCGGTAGACGCTA-3'
trnLF-f	5'-ATTGAACTGGTGACACGAG-3'

表 4 GenBank に登録されている *P. multiflorum* 由来配列の accession nos. と、それら配列と最も高い相同性を示した生薬の一覧

GenBank accession no.		
ITS 領域	<i>trnL-trnF</i> 領域	Sample no.
EF016288	EU402451	1
	EU024783	5, 7
EU596382	EU402451	2
EF016292	EU402488	6, 15
EU808016	EU402460	16, 17

表 5 本研究に用いた中国市場品における、遺伝子配列から推定された基原種及び HPTLC パターン

Sample no.	購入時の生薬名	生薬名から予想された学名	遺伝子配列から推定された学名	HPTLC パターン
1	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
2	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
3	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>	B
4	異様牛皮消	<i>C. auriculatum</i>	<i>Cynanchum</i> spp.	C
5	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
6	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
7	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
8	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	— ^{a)}	B
9	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>	B
10	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>	B
11	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>	B
12	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>	B
13	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>Cynanchum</i> spp.	C
14	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>	B
15	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
16	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
17	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>	A
18	耳葉牛皮消	<i>C. auriculatum</i>	<i>C. auriculatum</i>	B
19	耳葉牛皮消	<i>C. auriculatum</i>	<i>Cynanchum</i> spp.	C

背景が灰色のものは、生薬名から予想される学名と遺伝子解析から推定された学名が異なっていた生薬。

^{a)} DNA が抽出されなかった製品

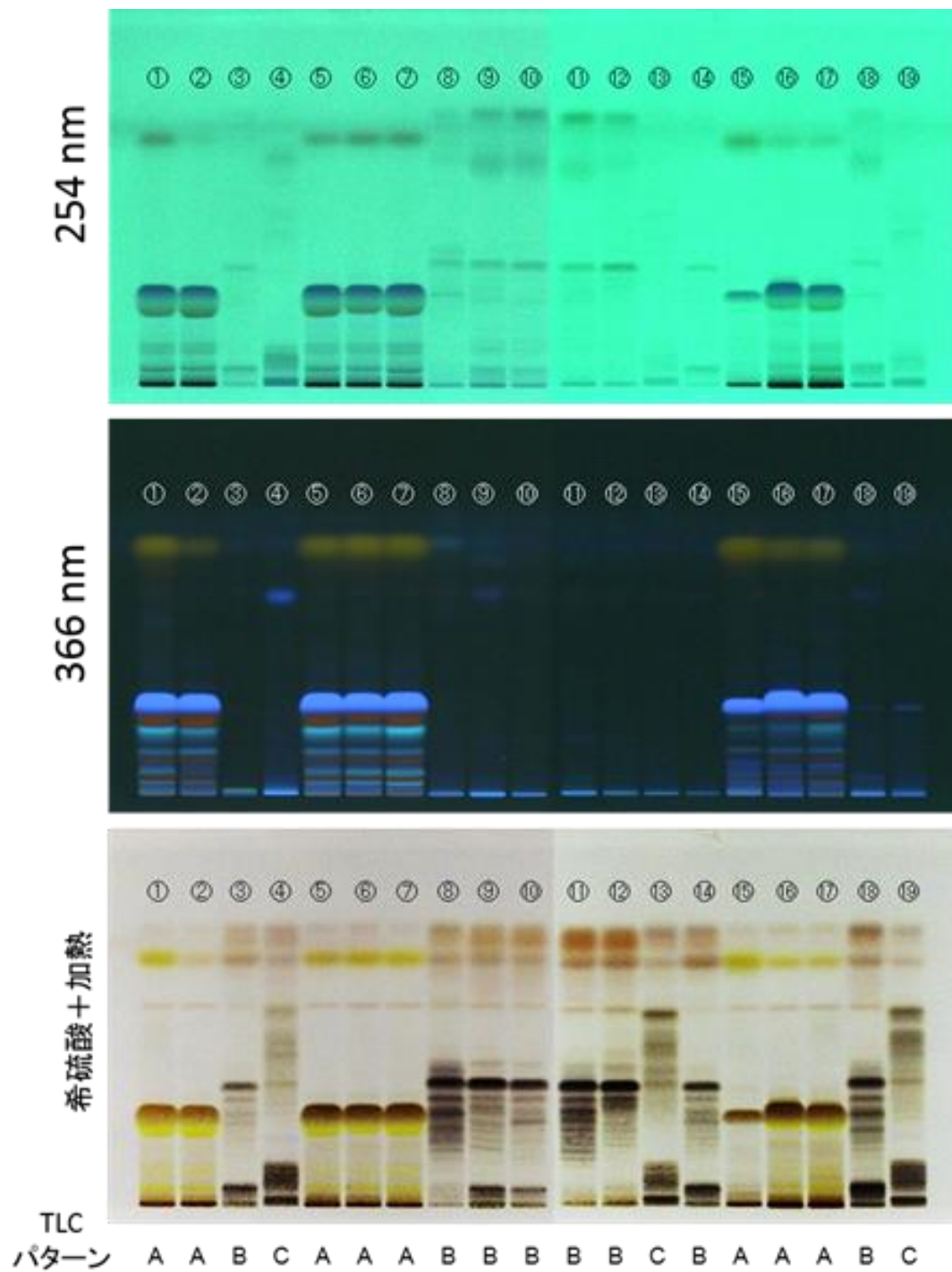


図1 何首烏，白首烏及び異葉牛皮消の HPTLC 分析結果
 数字は Sample no. を， TLC パターンは本文中のパターン A, B, C をそれぞれ示している.