

分担研究報告書

分担研究課題 グレーゾーンの植物体に関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長 丸山卓郎

遺伝子情報による「紅豆杉」製品の基原植物の同定について

研究要旨 健康食品市場に流通する紅豆杉製品の基原植物を同定するため、同製品及び *Taxus* 属植物試料について、葉緑体 DNA の *trnS-trnQ* IGS 領域の塩基配列解析を行い、同製品の基原植物を *Taxus wallichiana* var. *wallichiana* と同定した。

A. 目的

コウトウスギは、中国に分布するイチイ科イチイ属植物、*Taxus wallichiana* であり、原変種である var. *wallichiana* の他、var. *mairei* 及び var. *chinensis* の3変種が存在し、それぞれ、須弥紅豆杉、南方紅豆杉、紅豆杉と呼称される<sup>1)</sup>。コウトウスギも含めて、*Taxus* 属植物の多くには、抗腫瘍活性物質である paclitaxel (PTX) をはじめタキサン型ジテルペンアルカロイドが含まれている。PTX は、細胞分裂における微小管の脱重合を阻害することにより細胞死を誘導するため、正常細胞に比べて細胞分裂が活発な腫瘍細胞を優先して細胞死させることにより、腫瘍に対する治療効果を発揮する。その作用メカニズムから予想される通り、毒性も強いことから、薬機法で毒薬に定められている。コウトウスギの食薬区分上の扱いは、「ハクトウスギ」の項に、「ウンナンコウトウスギ」の別名で掲載されており、PTX 含量が高い葉及び樹皮が「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）」に、心材が「医薬品の効能効果を標榜しない限り医薬品とは判断しない成分本質（原材料）」に区分されている<sup>2)</sup>。

我々は昨年度、「紅豆杉」と称する健康食品製品の内部形態観察により、当該製品は、*Taxus* 属植物の心材からなり、「専ら医薬品」相当である

樹皮や葉の混入は含まれていないことを確認した<sup>3)</sup>。同製品の安全性評価のため、今年度は、同製品に使用されている *Taxus* 属植物の遺伝子鑑別と PTX 含量の定量を行なった。ここでは、このうち、遺伝子鑑別について報告する。

上述の通り、*Taxus wallichiana* には、3種の変種が存在するが、*Taxus* 属植物の遺伝子鑑別については、Hao らにより、葉緑体 DNA の *trnS-trnQ* IGS 領域の塩基配列が、上記の変種も含め、*Taxus* 属植物の分類に有用であることが示されている<sup>4)</sup>。このため、本研究では、同領域の塩基配列解析を行った。

なお、食薬区分リストにおいて、コウトウスギの正名とされているハクトウスギは、かつて *Taxus* 属に分類されていたが、現在は、*Pseudotaxus* 属に再分類され、*Pseudotaxus chienii* とされている。元来、ハクトウスギとコウトウスギは別植物であるが、現在では、属レベルで異なる植物であることから、ハクトウスギとコウトウスギを同一品目として収載するのは不適切である。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究で使用された試料を Table 1 に示した。1, 2 は、上海に所在する益大本草園より譲り受

けたもので、記載した学名は、譲渡の際に伝えられたものである。いずれの試料も、国立衛研生薬部に保管されている。紅豆杉製品 (Fig. 1) は、インターネット上の販売店より購入した。本品は、昨年度、山路らが内部形態観察に用いたものと同一ロット、同一包装内の別包品である。

## 2. 実験方法

各試料を液体窒素により凍結させた後、MM-400 (Retsche)により粉砕した。得られた粉末 20 mg を用い、Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega)によりゲノム DNA を抽出、精製した。

このものを鋳型に用いて、葉緑体 DNA の *trnS-trnQ* の遺伝子間領域を、PCR により増幅した。PCR の温度条件は、以下の通りである。95°C 10 min; 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 50 cycle; 72°C 7 min. MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) により PCR 産物を精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。シーケンスは、Fasmac 社に委託した。

なお、PCR において、試料 1-3 は 2-3 箇所、試料 4 は 5 箇所に分けて増幅を行った。PCR に用いたプライマーの配列を Table 2 に示した。

塩基配列の整列は、ClustalW により行い、系統樹は、Kimura の 2 パラメーターモデルにより作成した距離行列に基づき、NJ 法により構築した。

## C. 研究結果

全試料の塩基配列のアライメントを Fig. 2 に示した。中国の植物園より譲り受けた 2 つの標本 (試料 1, 2) は、どちらも同一の配列を示し、

全長 1684 bp であった。一方、イチイ *T. cuspidata* は、全長 1682 bp、紅豆杉製品は、1687 bp であった。特に、スパーサー領域の後半部 (1000 bp 以降 in Fig. 2) に、塩基の挿入/欠失が多く認められた。

それぞれの配列に対して blast search program による相同性検索を行った結果、試料 1, 2 の配列は、Hao らが *T. wallichiana* var. *mairei* の配列として登録しているもの (Acc. no.: EU107159) と一致したほか、その他の *T. wallichiana* var. *mairei* のものとして登録されている 7 つの配列と 99.7%以上の相同性を示した。一方、試料 3 の配列は、Hao ら、Wu らが *T. cuspidata* の配列として登録しているもの (Acc. nos.: DQ888591, MH463443) と完全に一致し、さらに、その他の *T. cuspidata* の配列 5 種と 99.76%以上の相同性を示した。紅豆杉製品の配列は、Hao らが *T. wallichiana* の配列として登録しているもの (Acc. no.: EU107147) と完全に一致し、その他の *T. wallichiana* (var. *wallichiana*) の配列 5 種と 99.82%以上の相同性を示した。

## D. 考察

本研究で明らかにした *Taxus* 属植物の *trnS-trnQ* IGS 配列に、Hao らが、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) に登録している *Taxus* 属植物の配列を加えて作成した系統樹を Fig. 3 に示した。試料 1, 2 の配列は、それぞれ、データベース上の *T. wallichiana* var. *mairei* からなるクラスターに配置された。同様に、紅豆杉製品の配列も、*T. wallichiana* var. *wallichiana* の配列からなるクラスターに配置された。

以上のことから、試料 2 は、*T. media* として

譲渡されたが、試料 1 と同じ、*T. wallichiana* var. *mairei* (南方紅豆杉) であった。また、今回、解析に用いた紅豆杉製品の基原植物は、相同性検索の結果からも予想された通り、*T. wallichiana* var. *wallichiana* であると同定された。

今回の研究に際し、*T. wallichiana* var. *mairei* を提供いただいた益大本草園は、中国国内で紅豆杉を栽培している薬用酒メーカーであり、同社によれば、紅豆杉の原料には、3 種あるとのことであった。おそらく、*T. wallichiana* の 3 変種であると予想される。同種は、中国分布種であり、日本国内には存在しないことから、今回の *T. wallichiana* var. *wallichiana* 以外の 2 変種も流通する可能性があるものと思われる。

#### E. 結論

健康食品市場に流通する紅豆杉製品の基原植物を同定するため、同製品及び *Taxus* 属植物試料について、葉緑体 DNA の *trnS-trnQ* IGS 領域の塩基配列解析を行い、同製品の基原植物を *Taxus wallichiana* var. *wallichiana* と同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 吉富太一，山路誠一，徳本廣子，袴塚高志，丸山卓郎，健康食品として販売されるコウト

ウスギ製品の基原植物，使用部位，paclitaxel 含量について，第 5 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019 年 9 月，東京)。

- 2) 吉富太一，山路誠一，徳本廣子，袴塚高志，丸山卓郎，イチイ *Taxus cuspidata* の部位別パクリタキセル含量と健康食品として販売されるコウトウスギ製品中の含量比較について，日本薬学会第 140 年会 (2020 年 3 月，京都)。

#### 参考文献

- 1) eFloras (2008). Published on the Internet <http://www.efloras.org> [accessed 2 April 2020] Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA.
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局長，薬生発 0322 第 2 号，医薬品の範囲に関する基準の一部改正について，平成 31 年 3 月 22 日。
- 3) 山路誠一，高橋直熙，丸山卓郎，厚生労働行政推進調査事業費補助金分担研究報告書「専ら医薬品」たる成分本質の判断のための調査・分析及びその判断基準・範囲の整備に関する研究，イチイ属植物由来植物製品の鑑別に関する研究. 2019, pp. 25-30.
- 4) C. D. Hao, L. Yang, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 260-265 (2008).

Table 1 Details of authentic *Taxus* plants used in this study.

Sample no.	Voucher no.	Scientific name	Source	Collection date
1	NIHS-DPP-11001	南方コウトウスギ ( <i>Taxus wallichiana</i> var. <i>mairei</i> L.K. Fu et Nan Li)	上海, 益大本草園	2017.06.24
2	NIHS-DPP-11002	<i>Taxus x media</i> Rehder	上海, 益大本草園	2017.06.24
3	NIHS-DPP-11003	<i>Taxus cuspidata</i> Siebold et Zuccarini	帯広市 (栽培)	2018.06.10
4	none	紅豆杉製品	online shop	unknown

Table 2 Primer sequences used in this study.

name	Sequence (5' to 3')	name	Sequence (5' to 3')
trnSQ-f	TTA CCG AGG GTT CGA ATC CCT C	trnSQ-r	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC
trnSQ-f1	GGT ACG ATT TTG GTC TCC ACA TT	trnSQ-r1	GGA GTA GGG AAT CAA TTT ATT GA
trnSQ-f2	GGT TAA TGA CAG CGA TCC AAG A	trnSQ-r2	CGA TAA TCT TAG CAA GAA GTA TCG A
trnSQ-f3	ATG ATG TAA AAG CTC AAA AGT ATT	trnSQ-r3	AAA TGA TCC CTT CCA ACC CG
trnSQ-f4	GGG GCG TGG CCA AGC GGT AAG GCA ACA GG	trnSQ-r4	ATT ACT ATT TGT CCC ATC TGG GAC G



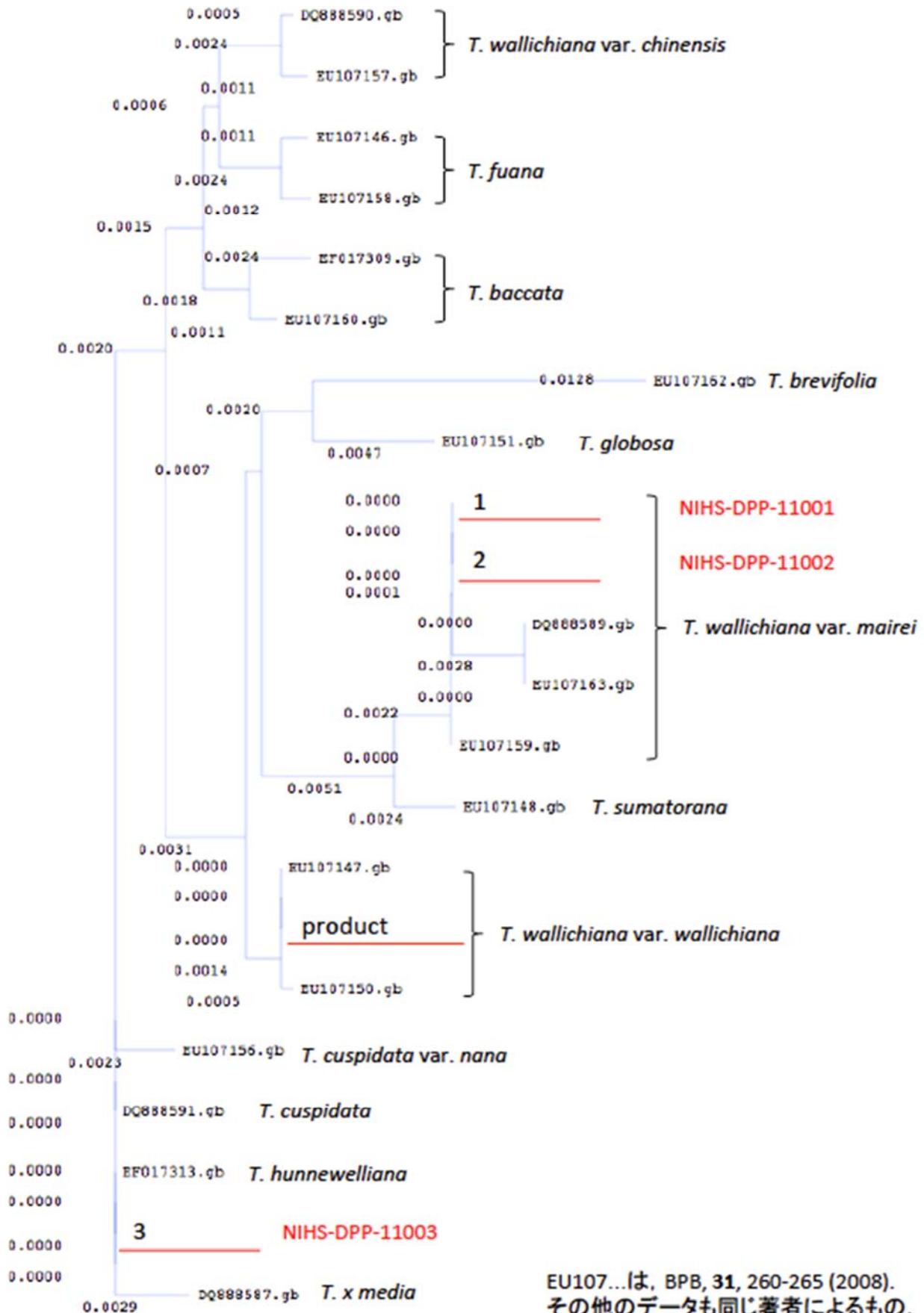
Fig. 1 紅豆杉製品の包装とティーパック内の植物組織片

1	801	CGATACTTCTTGCTAAGATTATCGAAAACCTACGGCAGCTTGCCAAGCAAMGGCTAAGAGAAAAAAGAACAAAGGTATAATTGGCATTATATCTACAATT	900
2	801	.....	900
3	794	.....	893
product	799	.....	898
*****			
1	901	GGATCAGAAATAGCATAAGCCTCGGGCAATTTGGCTAAAAATGGATTATTCAAATGAAAAGCGGCATCGTCTAGACAAATATTGAGGTTGAGTATAACTG	1000
2	901	.....	1000
3	894	.....	993
product	899	.....	998
*****			
1	1001	GCATTTTGATTCTCCGATCAATAAAAAATGATGTAAGGCTCAAAAGTATTTTGCCAATTAATCGAAATTATTGGCAAG-----ATTATACTTTGAGTT	1094
2	1001	.....	1094
3	994	.....	1087
product	999	.....ATTATA.....	1098
*****			
1	1095	TTCGGGTTGGAAGGGATCATTTCTTCATAAATAATTTAACCATCTGATAGAGAATGACCAATTAATAGATATTCTGTGTTCTTTTTCCGTTCCCAAC	1194
2	1095	.....	1194
3	1088	.....	1187
product	1099	.....	1192
*****			
1	1195	CGAATTACTTAAAAATAAGCTATTAATAAATATACAATCGATATCCATATAAGAAATCTAATAAGAATAATACAAGAATAATACAATTAGATTAGAAT	1294
2	1195	.....	1294
3	1188	.....-T.....	1286
product	1193	.....T.....	1292
*****			
1	1295	GGAACCTTGTGTTGAATATATAAACAGATATAGGATCTTATATGCATTCATCATATAAGAATGGGGCGTGGCCAAGCGGTAAGGCCAACAGGTTTTGGTCC	1394
2	1295	.....	1394
3	1287	.....C.....A.....GCAT.....	1386
product	1293	.....GCA-A.....	1391
*****			
1	1395	TGCTATTGCGAAGGTTTCAATCCTTTTCGTCAGATGGGACAAATAGTAATATTTCAAATAAATTGCTGTCAATAGTTTCACTAGTTTCAATCAAAACAAA	1494
2	1395	.....	1494
3	1387	..T.....A..A.....C.....	1486
product	1392	..T.....A..A.....C.....	1491
*****			
1	1495	AGTAGAAAATAAAATACTTGCATAGAAAATACAGAAATAGTATAATAATTTTCAGTCTCGATTAGACTGGAGATGTCGAAAGATAAAGAAGTAACAGAGG	1594
2	1495	.....	1594
3	1487	..G.....	1586
product	1492	..G.....T.....	1591
*****			
1	1595	GTATCCCACCTT-----GAACTAATATCCACCAAAATCAATTTAAATGAAATTTATGAGATCCGATTATCTCATGATTCGTTCCCAATAAGGG	1684
2	1595	.....	1684
3	1587	.....GAACTG.....	1682
product	1592	.....GAACTG.....	1687
*****			

Fig. 2 TrnQ-trnS IGS sequence alignment of *Taxus* plants and *Taxus walichiana* heart wood product

1	1	TTTCTCCGTTCACTCACTTCAAATGAATCCTAAAATTTTTAACTATAGACCTTTTTATTCTTTACGCCAGGATTCGTCCTGGATCGTTCGATAGA	100
2	1	.....	100
3	1	..A.....	99
product	1	.....	100
.....			
1	101	AATCCGAAGATAAATAGAGAAACAAAAATATAACTACTGTGTAACGAACAGCTTAAGAGTAAGCATTATCTAATCTCCAGGATTCTTATTAGATTAC	200
2	101	.....	200
3	100	.....	199
product	101	.....	200
.....			
1	201	AAAGGAATAGATCATCAATCTTTGCATCATATAATTGATACTTCAATACCAAGCAATATTACCATTTTAAATCTAAAATGGTACGATTTTGGTCTCCACA	300
2	201	.....	300
3	200	.....	299
product	201	.....	300
.....			
1	301	TTATGTGGGAGATCAATTAAAAATATGAATTTATTAATATTTTGAAATTTACTCTTTGCTTGGGATTGAAGAGTTGAAATAGGGACTCAACTCCTA	400
2	301	.....	400
3	300	.....T.....T.....T-CT.....	394
product	301	.....T.....T-CT.....	399
.....			
1	401	GTTCAACTATCCTAAACAAGTTTAGGATCGTCAGAATCAATAAATTGATCCCTACTCCCTTTTTTGAATTAATCTAACGGATATTTCTCTATGT	500
2	401	.....	500
3	395	.....A.....	494
product	400	.....	499
.....			
1	501	CATTTGCATCAATATCTAATAGCCCAACTCTCCCTATGATGGGGTTTCGGAAGTACTAAGACGAATTAAGGATTGAGCCTGGGAGGTAGGTATTT	600
2	501	.....	600
3	495	.....	594
product	500	.....	599
.....			
1	601	TGATCTGTTGGCAACCAGAATAGAATTGCTGCTTCAAAAATAAGCAGCAGAACAGGAAAAATTAATTCTACAAAATAAAATTTGGTTAATGACAGCG	700
2	601	.....	700
3	595	.....A.....G.....	693
product	600	.....	698
.....			
1	701	ATCCAAGATCCATCAATATATGAAATGGAATAAAAGTATGGATACAATATTTAAATGGTTTTGCATCAAGTTAATTGTTCTTTTTATAAAAAGAAAT	800
2	701	.....	800
3	694	.....A.....	793
product	699	.....A.....	798
.....			

Fig. 2 Continued



EU107...は, BPB, 31, 260-265 (2008).  
その他のデータも同じ著者によるもの。

Fig. 3