

# 和漢薬の基源から見た品質の多様性

和漢薬研究所 附属薬効解析センター

小松かつ子, 土田 貴志, 伏見 裕利, 難波 恒雄

現在日本は高齢化社会を迎えて疾病構造が大きく変わりつつある。最近でこそ病原性大腸菌 O157 の問題が浮上しているが、疾病全体から見ると従来の感染症は主要な疾患ではなくなり、これに替わって自己免疫疾患、悪性腫瘍、高齢に伴う退行性の心臓及び腎臓疾患、老年性痴呆、肝硬変などが治療の難しい疾病になってきている。このような疾病構造の変化は和漢薬方剤のニーズを徐々に増やしている。方剤の効果はそれを構成する生薬の品質の優劣に係わっているが、生薬は天然物に由来するため種々の品質のものが存在し、治療効果にばらつきを生じさせる原因になっている。その要因として、生薬名が同じでも基源が異なる物（異物同名品）が存在する、同属植物が使用される、その他産出地の違い、野生品と栽培品の違い、収穫時期、加工調製法、保存年数などが挙げられる。これらの内第一に解決すべき問題が生薬の基源に関するものである。基源を明らかにする方法には、生薬及び関連植物の組織形態を比較する方法 (1: Anatomical method)、成分組成を比較する方法 (2: Chemotaxonomical method)、及び近年著者らが研究を進めている分子生物学的手法を応用した方法 (3: Molecular biological

method)がある。本報では、専ら2の方法で基源を確証したことによって、同名または同類の生薬であっても品質が多様であることを明確にできた柑橘類生薬について紹介する。さらに、3の方法についても人参類生薬で報告する。

## 1. 柑橘類生薬の基源と品質

柑橘類の果実に由来する生薬には「陳皮」、「青皮」、「橙皮」、「枳実」、「枳殼」などがある。近代の薬理学では一般に健胃薬に分類されるが、中医学や漢方医学では臨床上区別して用いられる (Table 1)。柑橘類は食用の果実として多くの種や品種が開発、栽培され、それらが薬用に流用されるため基源は非常に複雑であり、現在成書には30種以上が薬用として記載されている。さらに、果実の成熟度、加工調製法や調製後の経過年数など様々な要因が品質に影響する。このように複雑な柑橘類生薬の品質を論じるためには先ず基源を同定する方法を確立する必要があると考え、成熟度や調整法によって成分の消長が少なく、多くの種類から成りかつこれまで報告されている薬理作用とも関連する成分群であるという点で、ポリメトキシフラボン

Table 1. 主要な柑橘類生薬

生薬名	用 部	用 途	薬 能	備 考
陳皮	成熟果皮	芳香性健胃, 駆風, 去痰, 鎮咳	理気, 健脾, 燥湿	肺, 脾の気分に入る
青皮	未熟果皮または 未熟果実	芳香性健胃, 消化不良, 腹部止痛	疏肝破氣, 消積化滯, 散結	肝, 胆の気分に入る 通気止痛の効果は陳皮 より強い
橙皮	成熟果皮	芳香性苦味健胃, 駆風, 香味		チンキ, シロップ
枳実	成熟果皮	芳香性苦味健胃, 去痰, 排膿, 緩下	行気寛中, 消食, 化痰	胸腹部の膨満感を去る
枳殼	成熟度の高い未熟果実 または成熟果実	”	”	枳実より作用が緩和で ある

類及びクマリン類，フラボノイド配糖体に着目し研究を行った。

### 1) 材料及び方法

植物材料には主として静岡県柑橘試験場で栽培されている，品種の明確な *Citrus* 属 27 種 1 変種，*Fortunella* 属 1 種及び *Poncirus* 属 1 種 1 変種の果実を，通常 8 月の未熟期と 12 月の成熟期に採取して用いた。生薬材料は柑橘類生薬 127 点（民族薬物資料館に保管）。標品としてフラボノイド，クマリン類，フラボノ

イド配糖体の計 37 成分（Chart 1）を単離若しくは購入した。新鮮果皮については，70% エタノール（ゲニン類及び poncirin 1~29 の場合）または 50% テトラヒドロフラン（フラボノイド配糖体 30~34 の場合）で振とう抽出して HPLC 用試料とした。乾燥果皮は，35°C 以下の乾燥した日当たりの良い室内に 2 週間放置して作製し，同様に処理した。生薬材料についても同様。HPLC 分析にあたっては，新鮮果皮中の 34 成分を簡便に分析できる 3 条件を設定した。条件 A はリン

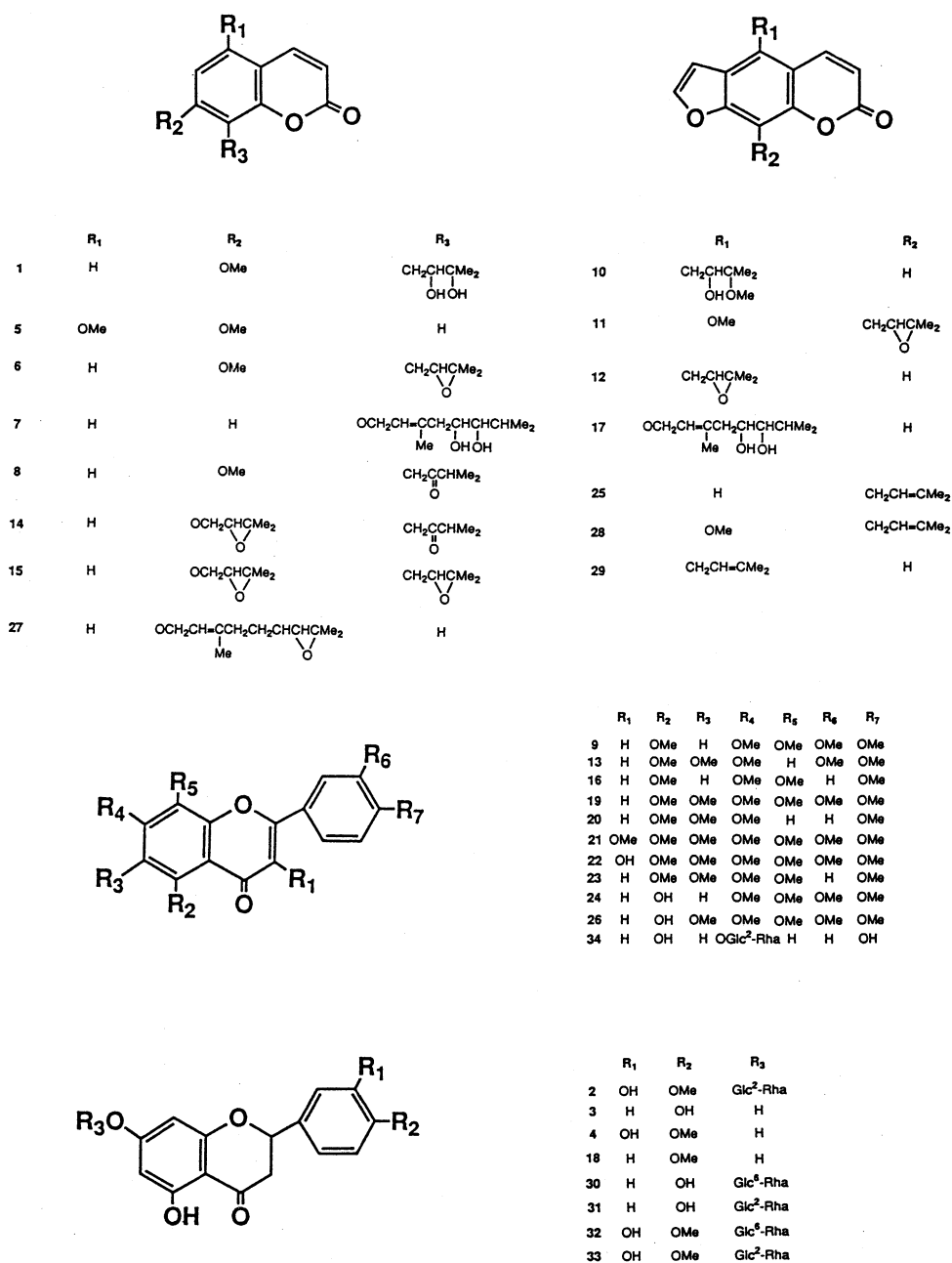


Chart 1.

酸バッファー, アセトニトリル, メタノールの3成分系の移動相でゲニン類16成分と poncirin (1~17) を分析した。条件Bも同様に3成分系の移動相でゲニン類12成分(18~29)を, 条件Cはリン酸バッファーとメタノールの2成分系の移動相で配糖体5成分(30~34)をそれぞれ分析した<sup>1)</sup>

## 2) Citrus 属5種の果皮成分の成熟に伴う変化

柑橘類生薬の基源とされる *C. unshiu* '青島温州', *C. reticulata* '太田ポンカン', *C. sinensis* '森田ネーブル', *C. natsudaidai* '川野夏橙', *C. aurantium* '臭橙'の新鮮果皮について, ポリメトキシフラボン類及びクマリン類14成分, フラボノイド配糖体4成分の成分組成と含量, 及びそれらの成熟に伴う変化を検討した<sup>2)</sup>。その結果, *C. unshiu*は19, 21, 23の含量が高く, *C. reticulata*は19, 23, 26, *C. sinensis*は13, 19, 20, *C. natsudaidai*は6, 29, *C. aurantium*は6, 19, 23が高含量であり, 種により含有成分パターンに差が認められた。これらの成分パターンは同種においては果実, 個体(樹木), 栽培環境の違いに係わらずいずれの果実でも同様で, 種に固有のものであると考えられた。ただし, 成分含量については同一個体内の果実間で若干の変動が認められた(標準的な着果数3の個体では変動係数が20%以下)。一方, 成熟に伴う変化につい

ては, 各種に固有な成分パターンは成熟期を通じて維持されていた。果皮1gあたりの各成分の含量は比較的パラレルに変化し, *C. unshiu*, *C. reticulata*は8~10月頃, *C. natsudaidai*, *C. aurantium*は7月が最大で, その後成熟につれて低下する傾向にあった。フラボノイド配糖体はいずれの時期も *C. unshiu*, *C. reticulata*, *C. sinensis*は30, 32の rutinose 系配糖体が主で, *C. natsudaidai*, *C. aurantium*は31, 33, 34の neohesperidose 系配糖体が主であった。これらの含有パターンも季節を通じて維持されていたが, 各成分の含量は未熟期ほど高く, 成熟するにつれて減少した。次に, 柑橘類の品種による差異を明確にする目的で, *C. unshiu*の普通系の2品種と早生系の3品種, 及び *C. natsudaidai*の4品種について同様に検討した<sup>3)</sup>が, それぞれ *C. unshiu* '青島温州' 及び *C. natsudaidai* '川野夏橙'と同様の成分組成並びに成熟に伴う変化を示した。ただし, 成分含量に差が見られ, *C. unshiu*については普通系の品種は21が高含量で, 早生系の品種は7が8~10月に高かった。*C. natsudaidai*では'ニューセブン'が他品種に比べいずれの成分も低含量であった。なお, 果皮の組織形態についても検討し, 種及び品種間の差異を明らかにすると同時に, 組織学的特徴が成熟度の判定に重要であること

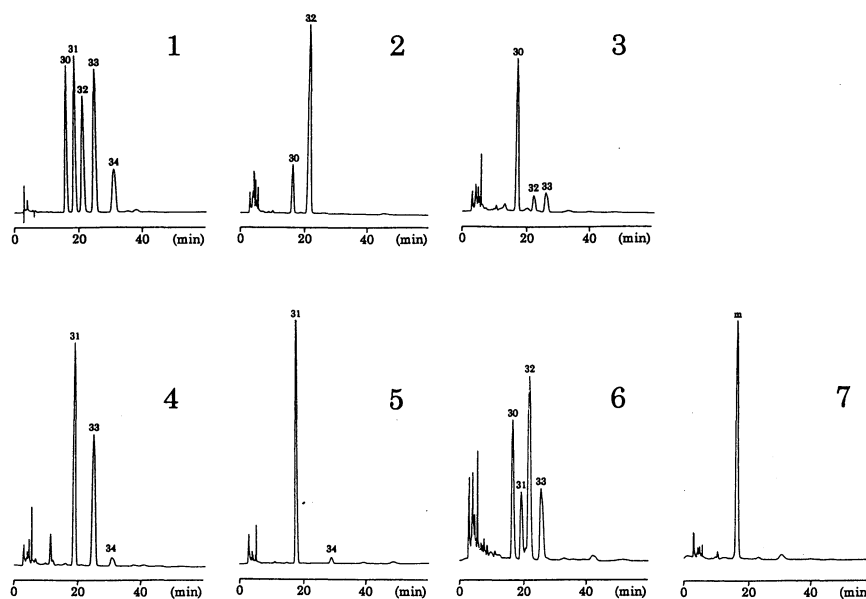


Fig. 1 HPLC Profiles of the Compounds 30-34 of Dried Peels of *Citrus*, *Fortunella* and *Poncirus* Species

1, standard solution; 2, *C. unshiu* (type R<sub>1</sub>); 3, *C. madurensis* (type R<sub>2</sub>); 4, *C. aurantium* (type N<sub>1</sub>); 5, *C. grandis* (type N<sub>2</sub>); 6, *C. junos* (type NR); 7, *F. crassifolia* (type O).

Column, YMC-ODS A-312 S-5 (6×150 nm); mobile phase, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.4)-MeOH (65 : 35); flow rate, 1.0 ml/min; column temp., 40°C; detection, UV 284 nm.

を見出している。

### 3) *Citrus* 属, *Fortunella* 属及び *Poncirus* 属の果皮の成分

柑橘類生薬の基源の同定には、ポリメトキシフラボン類、クマリン類などの成分組成並びに含有比率が有用であると考えられた。そこで、新たにフラボノイド及びクマリン類 14 成分を単離し、またこれにフラボノイド配糖体 6 成分を加えて計 34 成分について、静岡県産の 3 属 29 種 2 変種の未熟及び成熟果実の果皮を対象にして、HPLC 法による一斉分析を行った<sup>1)</sup>。その結果、配糖体の含有パターンに 7 タイプ、すなわち rutinose 系配糖体を主成分にする R 型に 2 タイプ (32 を主とする R<sub>1</sub> 型, 30 を主とする R<sub>2</sub> 型), neohesperidose 系配糖体を主成分にする N 型に 3 タイプ (33 を顕著に含有する N<sub>1</sub> 型, 33 を殆ど含有しない N<sub>2</sub> 型, 2 を含む N<sub>3</sub> 型), 及び両系の配糖体を有する NR 型, 今回分析対象とした配糖体を殆ど含まない O 型があることがわかった (Fig. 1)。各種は新鮮果皮中のゲニン類の成分組成と含有比率の違いにより大きく 13 タイプに区別され、さらに配糖体の含有パターンと組み合わせることにより、14 タイプに分類することができた。乾燥果皮中では一部の成分が変化したが、乾燥後も各タイプごとに特有のパターンを示し、それらの区

別は可能であった。なお、乾燥により減少する成分は 6, 11, 12, 27 などの分子内にエポキシ環を有する成分で、一方増加する成分は 1, 8, 17 などエポキシ環の開裂などによると考えられるものの他, 3, 4 などのフラバノンも一部の種で増加した (Fig. 2)。

タイプ分類の結果を Table 2 に示す。タイプ I ~ IV は配糖体が R<sub>1</sub> 型で, V は R<sub>2</sub> 型。ゲニン類はクマリン類を主体とする I とフラボン類を主体とする II ~ V に分かれる。タイプ III, IV には初生柑橘亜属と後生柑橘亜属の種が属し, 田中の分類<sup>4)</sup> には一致しなかった。タイプ III の *C. unshiu* と *C. nobilis* var. *kunep* は分析条件 A で保持時間 26 分付近に顕著な未同定ピーク e があることで共通する (Fig. 3)。タイプ IV には後生柑橘亜属ミカン節コミカン亜節に属する *C. reticulata* を始めとする 7 種すべてが含まれた。各種はゲニン類の成分パターンだけでは区別することができなかった (以下 *C. reticulata* 系と称する)。このタイプには中国産陳皮の基源とされる *C. tangerina*, *C. erythroa*, *C. kinokuni*, 日本産陳皮の基源の 1 種とされる *C. leiocarpa* などが含まれる<sup>5)</sup>。タイプ VI には初生柑橘亜属ザボン節の *C. grandis*, *C. paradisi*, *C. hassaku* とダイダイ節の *C. natsudaidai*, *C. aurantium* が属し, 配糖体は *C. grandis*, *C. paradisi* が N<sub>2</sub> 型で他は N<sub>1</sub>

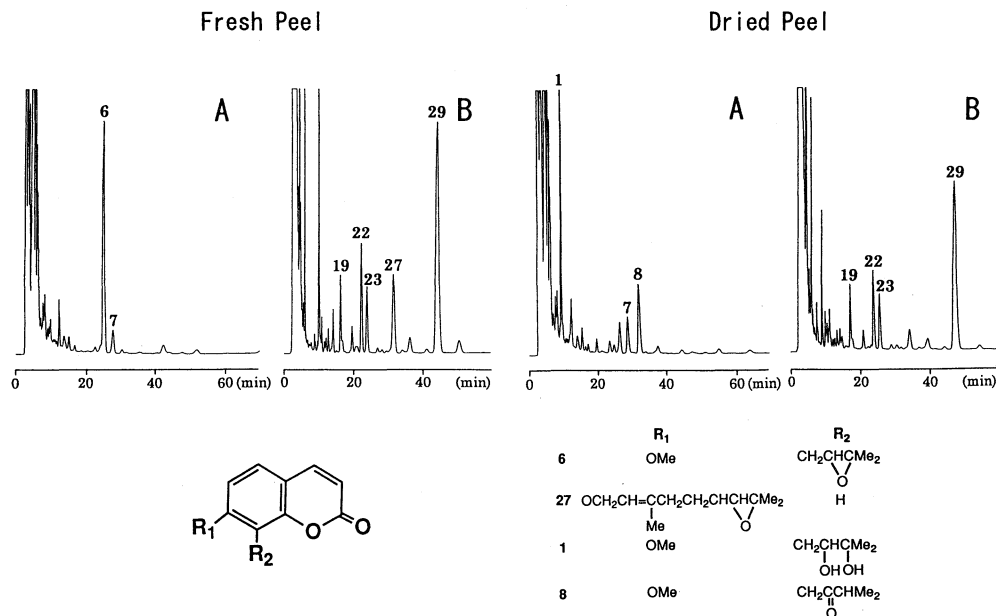


Fig. 2 HPLC Profiles of Compounds 1-29 of Fresh and Dried Peels of *C. natsudaidai*

A and B represent HPLC conditions. Conditions A: column, YMC-ODS A-312 S-5 (6×150 mm); mobile phase, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.4)-MeCN-MeOH (150 : 53 : 47); flow rate, 1.0 ml/min; column temp., 35°C; detection, UV 300 nm. Conditions B: column, YMC-ODS A-312 S-5 (6×150 mm); mobile phase, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.4)-MeCN-MeOH (10 : 7 : 3); flow rate, 1.0 ml/min; column temp., 35°C; detection, UV 230 nm.

Table 2. Division of *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* spp. according to Flavonoid-glycosides and their genins

Type <sup>1)</sup>	Species			Type of Flavonoid-glycosides <sup>2)</sup>	Main Components of Genins (Compound No.) <sup>3)</sup>	
	<i>Citrus</i>		<i>Fortunella</i>		Fresh Peel	Dried Peel
	<i>Archicitrus</i>	<i>Metacitrus</i>				
I	<i>C. aurantifolia</i>			R <sub>1</sub>	5, 11, 12, a, b, c, d	5, c, d
	<i>C. limon</i>					
II	<i>C. sinensis</i>			R <sub>1</sub>	13, 19, 20	→
III	<i>C. iyo</i>	<i>C. nobilis</i> var. <i>kunep</i>		R <sub>1</sub>	9, 13, 16, 19, 21, 23	→
	<i>C. tamurana</i>	<i>C. unshiu</i>				
IV	<i>C. tankan</i>	<i>C. reticulata</i>		R <sub>1</sub>	9, 13, 16, 19, 23, 26	→
		<i>C. tangerina</i>				
		<i>C. succosa</i>				
		<i>C. erythroa</i>				
		<i>C. kinokuni</i>				
		<i>C. sunki</i>				
		<i>C. leiocarpa</i>				
V	<i>C. madurensis</i>			R <sub>2</sub>	19, 22, 23	→
VI	<i>C. grandis</i>			N <sub>2</sub>	6, 7, 17, f, g	1, 7, 17, f, g
	<i>C. paradisi</i>					
	<i>C. hassaku</i>			N <sub>1</sub>	19, 21, 23, 27	8, 19, 21, 23
	<i>C. natsudaikai</i>					
	<i>C. aurantium</i>					
VII	<i>C. ichangensis</i>			N <sub>2</sub>	6, 23, 27, g	7, 8, 23, g
VIII	<i>C. wilsonii</i>			N <sub>2</sub>	6, 7, 12, 25, 27	7, 8, 25
IX	<i>C. junos</i>			NR	28	→
X	<i>C. hanayu</i>			NR	9, 13, 16, 19, 23	→
X I	<i>C. sudachi</i>			NR	i, j, k	→
X II	<i>C. sphaerocarpa</i>			NR	12, 19, 21, 23	→
X III	<i>P. trifoliata</i>			N <sub>3</sub>	11, 12, 25, 28, b	→
X IV	<i>F. crassifolia</i>			O	n	→

<sup>1)</sup> Each type is defined according to components.

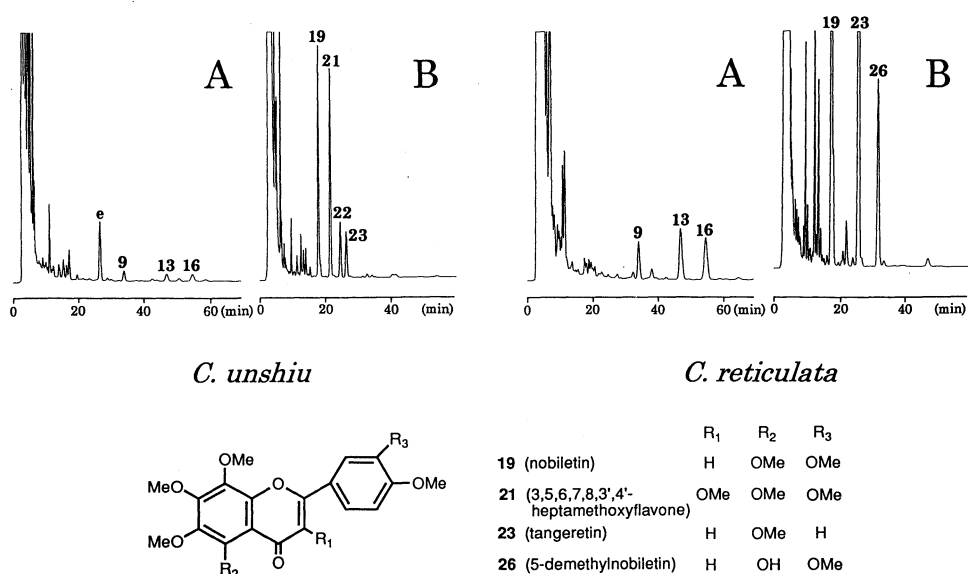
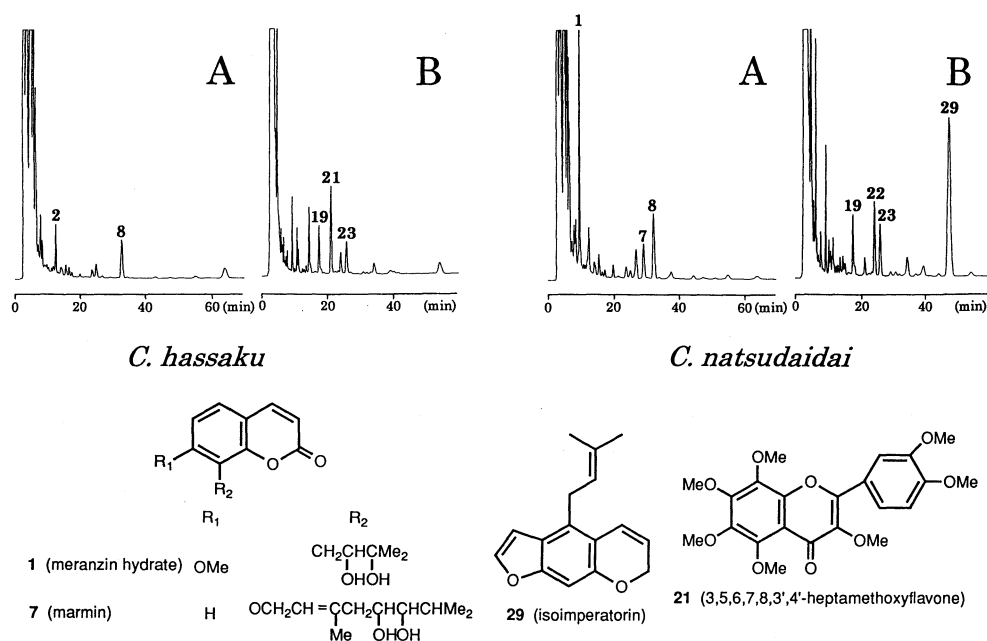
<sup>2)</sup> R<sub>1,2</sub>: rutinose type glycosides mainly as hesperidin (R<sub>1</sub>) or narirutin (R<sub>2</sub>). N<sub>1,2,3</sub>: neohesperidose type glycosides, on which neohesperidin is much (N<sub>1</sub>), or less (N<sub>2</sub>), or poncirin is much (N<sub>3</sub>). NR, O: both rutinose and neohesperidose types glycosides are present (NR), or absent (O).

<sup>3)</sup> meranzin hydrate (1), poncirin (2), naringenin (3), hesperetin (4), limettin (5), meranzin (6), marmin (7), isomeranzin (8), isosinensetin (9), 5-(2-hydroxy-3-methoxy-3-methylbutoxy) psoralen (10), byak-angelicol (11), oxypeucedanin (12), sinensetin (13), poncimarin (14), isoponcimarin (15), 5, 7, 8, 4'-tetramethoxyflavone (16), 5-[(6,7-dihydroxy-3,7-dimethyl-2-octenyl) oxy] psoralen (17), isosakuranetin (18), nobiletin (19), tetra-O-methylscutellarein (20), 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone (21), 3-hydroxy-5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxyflavone (22), tangeretin (23), 5-hydroxy-7, 8, 3', 4'-tetramethoxyflavone (24), imperatorin (25), 5-demethylnobiletin (26), epoxyaurapten (27), phellopterin (28), isoimperatorin (29), narirutin (30), naringin (31), hesperidin (32), neohesperidin (33), rhoifolin (34). a~n: unknown compound. →: same components as in fresh peel.

型, ゲニン類は *C. grandis* 以外はフラボン, クマリン類の両者が存在し, 種により成分組成が異なった (Fig. 4)。タイプVII, VIIIは配糖体がN<sub>2</sub>型, IX~XIIはy NR型である。タイプVIII~XIIは後生柑橘亜属ユズ節に属するが, 種によりゲニン類の組成が大きく異なった。タイプXIII, XIVにはそれぞれ *Poncirus* 属, *Fortunella* 属が属し, *Citrus* 属とは異なる特有の成分パターンであった。

#### 4) 柑橘類生薬の基源

前項で確立したタイプ分類を日本及び中国市場で入手した「陳皮」, 「青皮」, 「橙皮」, 「枳実」及び「枳殼」の各市場品に適用して基源を明らかにした<sup>6)</sup>。日本産陳皮はすべて *C. unshiu* であった。中国産陳皮は *C. unshiu* と *C. reticulata* 系が両国市場に同程度見られ, その他 *C. grandis* (化州橘皮, 橘紅と称す), *C. sinensis* などが見られた。日本国内で中国産橘皮として入手し

Fig. 3 HPLC Profiles of Dried Peels of *C. unshiu* and *C. reticulata*Fig. 4 HPLC Profiles of Dried Peels of *C. hassaku* and *C. natsudaidai*

たものはすべて *C. reticulata* 系であった。中国産青皮は *C. reticulata* 系が主で、その他 *C. unshiu*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. natsudaidai* など。日本産橙皮は *C. hassaku* または *C. iyo*, 中国及びハイチ産橙皮は *C. aurantium* などであった。日本産枳実及び枳殻は *C. hassaku*, *C. natsudaidai* 及び両種の混合品など、中国産枳実には *C. aurantium* が主で、日本市場には同種その他、「緑衣枳実」と称し *P. trifoliata* ‘枸橘’に由来するものも多かった。その他中国市場に *C. sinensis*, *C. un-*

*shiu*, *C. reticulata* 系, *P. trifoliata* などがあり、両国市場に混合品が多数認められた。中国産枳殻は *C. aurantium* が主で、その他中国市場に *C. natsudaidai*, *C. wilsonii*, *C. reticulata* 系などが流通していた。市場品の成熟度は、陳皮、橙皮が成熟果実の果皮、青皮が未熟果実の果皮、枳実は無熟果実、枳殻は枳実より成熟度が高い果実であった。なお、中国産枳実の市場品中大多数を占めたものの基源を *C. aurantium* としたが、これらには日本産の *C. aurantium* ‘臭橙’にはほと

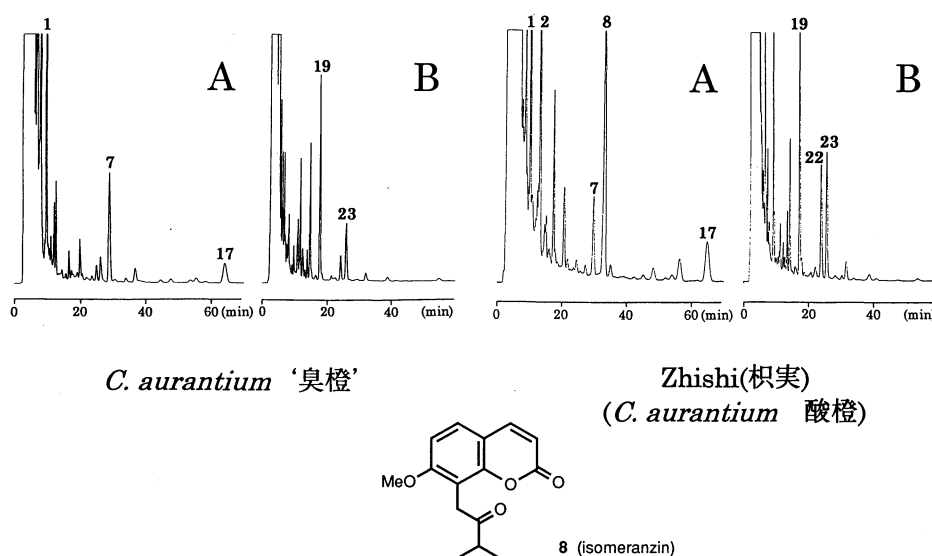


Fig. 5 HPLC Profiles of Dried Peels of *C. aurantium* '臭橙' and Zhishi (枳实)

んど認められない8が存在した (Fig. 5)。しかし、その他の成分パターンは類似し、また多くの成書で枳実の基源として先ず *C. aurantium* (中国植物名: 酸橙) が挙げられていることから、同種に由来するものとした。

### 5) 品質評価

日本産陳皮の基源であった *C. unshiu* と中国産陳皮

の半数を占めていた *C. reticulata* 系の果皮はともにフラボノイド配糖体として hesperidin (32) を主成分にする。しかし、ポリメトキシフラボン類に違いがあり、*C. unshiu* は nobiletin (19), 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (21) などの含量が高く、一方 *C. reticulata* 系は 19, tangeretin (23) が非常に高含量で、また 5-demethylnobiletin (26) の含量も高い。Fig. 6

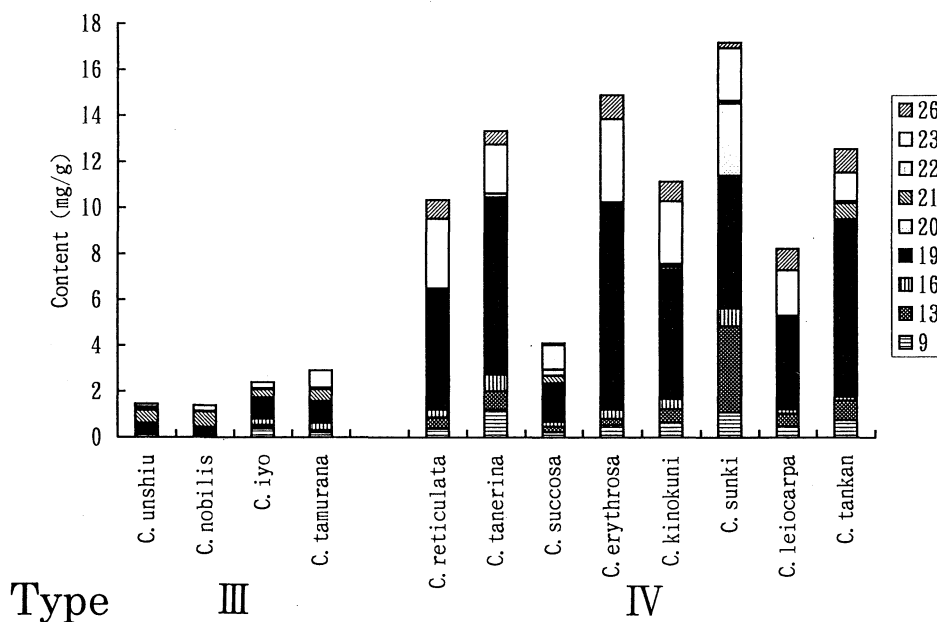


Fig. 6 Contents of Polymethoxyflavonoids of Dried Peels of *Citrus* Species

9: isosinensetin, 13: sinensetin, 16: 5,7,8,4'-tetramethoxyflavone, 19: nobiletin, 20: tetra-*O*-methylscutellarein, 21: 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, 22: 3-hydroxy-5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone, 23: tangeretin, 26: 5-demethylnobiletin.

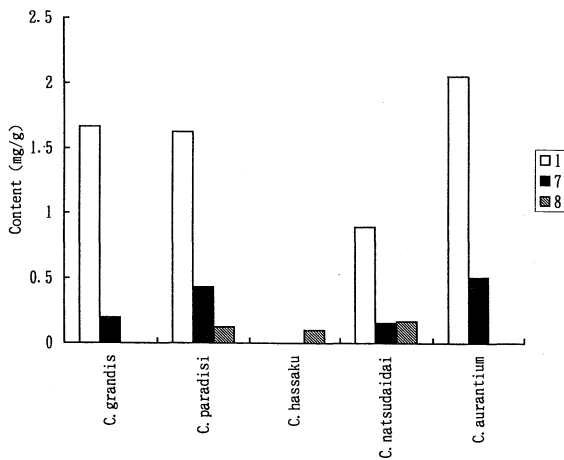


Fig. 7 Contents of Coumarins of Dried Peels of Citrus Species  
1: meranzin hydrate, 7: marmin, 8: isomeranzin.

にポリメトキシフラボン類の含量を示すが、*C. reticulata* 系が属するタイプIVの各種は *C. unshiu* の約5~10倍量を含んでいた。これらの成分のうち抗潰瘍作用が19<sup>7)</sup>、抗炎症作用が sinensetin (13), 19, 23<sup>8)</sup>、抗アレルギー作用が19<sup>9)</sup>、13及び23<sup>8)</sup>、c-AMPホスホジエステラーゼ阻害作用が19, 23, 26<sup>10)</sup>に報告されている。また、交感神経作動性作用<sup>11)</sup>を有する synephrineの含量も *C. reticulata* 系で高いことが報告されている。<sup>12)</sup>これらの成分は陳皮、青皮の薬効と関連があると考えられることから、*C. reticulata* 系を基源とする生薬の使用が望ましいと考えられる。なお、これらの成分の含量は未熟期ほど、すなわち青皮で高い。枳実及び枳殻については、日本産がこれまで報告のなかった *C. hassaku*、及び *C. natsudaidai* など、中国産が *C. aurantium* であった。これら3種はフラボノイド配糖体として neohesperidin (33) を主成分にする。*C. hassaku* には *C. natsudaidai* に存在するクマリン類の meranzin hydrate (1), marmin (7), isoimperatorin (29) が認められず、反対にポリメトキシフラボン類の 21 が高含量であった。*C. aurantium* も 1 を主成分とするが、29 はほとんど含まなかった。Fig. 7 に枳実及び枳殻の主な基源種のクマリン類の含量を示す。抗潰瘍作用<sup>13)</sup>が報告されている 7 は *C. aurantium* に最も多かった。これらの種にはポリメトキシフラボン類や synephrine は少なく、薬効上クマリン類の作用も重要であると考えられることから、*C. hassaku* の使用については検討していく必要があると考える。なお、33 に抗炎症<sup>14)</sup>、29 に鎮痛作用<sup>15)</sup>が報告されている。

## 6) まとめ

数種の柑橘類果実の成分を詳細に検討し、フラボノ

イド及びクマリン類の含有パターンは多様であるが概ね種のレベルで一定であり、成熟に伴っても変化せず、基源同定に有用であることを見出した。フラボノイド及びクマリン類34成分の簡便な HPLC 分析法を開発し、この分析法により柑橘類3属29種2変種を14タイプに分類することができた。このタイプ分類は広範な市場品に適用可能で、これまで科学的に明らかにされていなかった市場品の基源を解明し、現在市場品の複雑、多様な実態を明らかにした。同時にポリメトキシフラボン類及びクマリン類の組成及び含量を指標にして品質評価を行い、陳皮、青皮、枳実、枳殻として薬用に適する種を考察した。柑橘類の歴史的経緯など<sup>16,17)</sup>から、陳皮及び青皮は *C. reticulata* 系、枳実及び枳殻は *C. aurantium* が本来の正品であると考えられるが、日本では食用種を流用する傾向が強かった。今後、今回検討できなかった精油成分についても各種における組成及び含量を調べ、さらに薬理面での品質評価とも併せて、生薬としての最適種並びに各種の特徴を明確にする必要がある。

## 2. 遺伝子解析による生薬の同定法開発 — 人参類生薬について —

植物の系統分類学では低次分類群を対象とした遺伝子解析として、Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析、Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 分析及び特定遺伝子領域の塩基配列を比較する方法が用いられている。生薬は乾燥後長期間保存された微生物汚染の可能性のあることから、RFLP 及び RAPD 分析の適用には問題がある。そこで、科さらには種のレベルで遺伝子の塩基配列に違いがあることが報告されている18S ribosomal RNA 遺伝子及び *matK* 遺伝子について、塩基配列の異同から生薬を同定する方法の開発を検討した。生薬には、同じ属の数種が薬用に供される人参類を選んだ。

### 1) 材料

植物材料としてウコギ科の *Panax ginseng* 1点、*P. japonicus* 2点、*P. quinquefolius* 1点及び *P. notoginseng* 3点のそれぞれ新鮮な地下部、生薬材料として人参2点(日本産、韓国産)、竹節人参1点、広東人参1点及び三七人参3点、さらに対象としてキキョウ科の *Platycodon glandiflorum* の根に由来する桔梗を用いた。生薬材料は1990年以降に入手したものである。

### 2) 全DNAの抽出<sup>18)</sup>

新鮮な地下部を液体窒素で凍結した後粉末とし、PBS-EDTA液で洗浄、界面活性剤及びタンパク分解



酵素を用いて37度で12時間酵素反応を行った。次にPhOH/CHCl<sub>3</sub>抽出及びCetyltrimethylammonium-bromide (CTAB)抽出によって精製した後、エタノール沈殿法でDNAを塩析させた。生薬については外皮を取り除いた後粉碎機で粉末として同様に処理した。得られた全DNAを1%アガロースゲルで電気泳動した結果、新鮮な植物材料からは再現性良く20 kb以上のDNAが得られたが、生薬からは種々の長さに切断されたスミア状のDNAが確認された。

### 3) 18S rRNA 遺伝子の塩基配列<sup>19)</sup>

18S rRNA 遺伝子は核遺伝子上に存在するタンパク合成に関与する遺伝子で、真核生物では数百~数千コピーが連なって存在する。この遺伝子の塩基配列は種でよく保存され、極めてゆっくりと進化することが知られている。<sup>20)</sup> 18S rRNA 遺伝子の両端に相当するプライマーを合成し、<sup>21)</sup> 前項で得られたDNA (10~100 ng) を鋳型として Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で当該遺伝子領域を増幅 (熱変成を94度で40秒、プライマーのアニーリングと伸長反応を65度で8分間行い、このサイクルを30回繰り返す<sup>22)</sup>) したところ、植物及び生薬ともに1.8 kbのPCR産物が増幅できた。対照としたDNAを加えずにPCR法を行ったものでは増幅が認められなかった。得られたPCR産物についてそれぞれダイデオキシターミネーターサイクルシーケンス法により塩基配列を決定した結果、すべて1809塩基対であった。*P. ginseng*, *P. japonicus* 及び *P. quinquefolius* の3種間では、上流から497, 499, 501, 712番目の塩基の位置で置換が認められ、これらの配列は各々対応する人參、竹節人參、広東人參の塩基配列と完全に一致した。また、富山県及び宮崎県で採集した *P. japonicus*, 日本産及び韓国産の人參では、当該

遺伝子領域の塩基配列は各々の種で一致し、産地による差異は認められなかった。なお、基源植物の属する科が異なる人參と桔梗では約40ヶ所で塩基配列が異なった。18S rRNA 遺伝子は2次構造をとることが報告されている<sup>23)</sup> ことから、GENETYXのソフトを用いて *Panax* 属3種における2次構造を検討した結果、置換が認められた500塩基付近はステムの形成に関係しないバルジループ内に含まれていた。

### 4) PCR-RFLP 分析及び MASA 分析<sup>24)</sup>

3種間の簡便な鑑別法を開発する目的で、PCR-RFLP法<sup>25)</sup> 及び Mutant Allele Specific Amplification (MASA) 法<sup>26)</sup> の応用を検討した (Fig. 8)。

18S rRNA 遺伝子の塩基配列の差異に基づいて制限酵素 *Ban* II 及び *Dde* I を選び、それぞれを用いて *Panax* 属3種及び人參類生薬3種のPCR産物を切断した。6%ポリアクリルアミド電気泳動法でフラグメントの解析を行った結果、制限酵素 *Ban* II を用いた場合、*P. ginseng* と人參に991塩基のフラグメントが確認され、一方 *P. japonicus* と竹節人參、*P. quinquefolius* と広東人參では499及び492塩基のフラグメントが確認された。次に *Dde* I を用いた場合、*P. quinquefolius* と広東人參のみで95と750塩基のフラグメントが確認された。このように、3種の鑑別には制限酵素 *Ban* II 及び *Dde* I を用いてPCR-RFLP法を行うことが有用であった。

PCR法ではプライマーの3'末端の塩基が異なると伸長反応が行われないことから、18S rRNA 遺伝子の塩基配列に置換が認められた499及び501塩基の位置にプライマーの3'末端が位置するように、3種に特異なプライマーを合成した (*Pgin*481F, *Pjap*481F, *Pqui*481F)。これらのプライマーを用いて *Panax* 属植

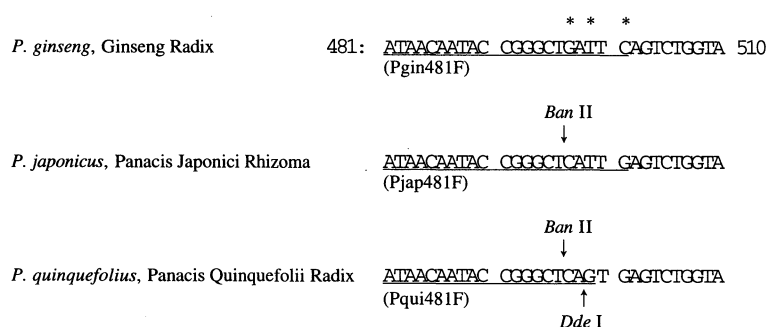


Fig. 8 18S rRNA Gene Sequences on Three *Panax* Species and Ginseng Drugs

The locations of different base substitutions, the restriction enzyme sites for PCR-RFLP analysis and the sequences of forward primers for MASA analysis are by an asterisk, arrow and underline, respectively.

物及び人参類生薬から得られた DNA を鋳型として、前項のPCR法の条件で増幅を行い、PCR産物の有無を1%アガロース電気泳動法により確認した。理論的には各プライマーに対応する種のDNAを鋳型にした場合のみPCR産物が得られるはずである。しかし、Pjap481Fプライマーでは対応する *P. japonicus* 以外に、*P. quinquefolius* でもPCR産物が得られた。そこでプライマーのアニーリング反応を65度で30秒に短縮し、また伸長反応を72度、2分に変えて再度PCR法を行った。その結果、*P. japonicus* 及び竹節人参でのみ増幅が認められた。以上、MASA法を行うための各種に固有なプライマーを作成し、またPCR法の条件を設定できた。

### 5) *matK* 遺伝子の塩基配列

*matK* 遺伝子は葉緑体遺伝子上の *trnK* のスプライシングに参与するマチュラーゼをコードする遺伝子とされ<sup>27)</sup> 母性遺伝をする。この遺伝子領域も種間の解析に用いられている<sup>28)</sup> ことから、生薬の同定をより確実に行うためこの領域も検討した。大井ら<sup>29)</sup> により報告されているプライマーを用いて、PCR法で *Panax* 属植物及び人参類生薬の *matK* 遺伝子の部分塩基配列を増幅し、塩基配列を決定した。その結果、*matK* 遺伝子の部分塩基配列はすべて1259塩基対で、*P. ginseng* と *P. japonicus* は相同であったが、*P. quinquefolius* は102番目の塩基の位置で置換が認められた。この置換は広東人参でも確認された。

### 6) *Panax notoginseng* の遺伝子の多型性<sup>30)</sup>

*P. notoginseng* (3点)と対応する生薬の三七人参(2点)の間では18S rRNA遺伝子、*matK* 遺伝子ともに塩基配列が5ヶ所まで異なっていた(各々をR1M1, R2M2とする)。そこで新たに雲南省文山県産「三七人参」の同一ロットから10個体を選んで遺伝子解析を行った。R1とR2の2系統を簡単に見分けるため、両者の塩基配列の違いに基づいて制限酵素 *Dde* I を選んだ。10個体から得られたDNAを鋳型にしてPCR法を行い18S rRNA遺伝子領域を増幅した後 *Dde* I で処理して電気泳動を行ったところ、2個体がR1、8個体がR2と同様のフラグメントパターンを示した。次に塩基配列に差異が認められた上流から491~730番目の塩基の領域の配列を決定したところ、前者はR1と同一であったが、後者はR2とは22ヶ所まで塩基配列が異なった。8個体の内1個体について全領域の塩基配列を決定した結果、さらに他の塩基の位置でも異なっており、R2とのホモロジーは96.5%であった(R3とする)。一方、この個体とR1と同一であった個体について *matK* 遺伝子の部分塩基配列も決定した

ところ、この配列はともにM1と一致した。このように三七人参には同一ロット内において、*matK* 遺伝子は相同であるが18S rRNA遺伝子の塩基配列が異なる個体が存在することがわかった(R1M1, R3M1)。

### 7) まとめ

新鮮な植物と同様に生薬からもDNAを得ることができた。得られたDNAを鋳型としてPCR法により18S rRNA遺伝子及び *matK* 遺伝子領域の増幅が可能であり、その塩基配列は基源植物における配列と完全に一致した。このことから、種に固有な塩基配列をもつ遺伝子領域において、生薬と関連植物の間で塩基配列を比較することにより生薬の同定が可能であることが示唆された。ウコギ科の *Panax* 属植物では18S rRNA遺伝子及び *matK* 遺伝子領域に種のレベルで塩基配列の置換が認められ、この結果に基づいて3種類の人参類生薬の鑑別法を開発することができた。なお、同定におけるこれらの遺伝子領域の有用性は植物の分類群により異なると考えられる<sup>18)</sup>。 *P. notoginseng* 及び三七人参では18S rRNA遺伝子及び *matK* 遺伝子の塩基配列においてそれぞれ3系統、2系統が存在し、三七人参の同一ロット内においても *matK* 遺伝子の配列は相同であるが18S rRNA遺伝子の配列が異なる2系統が確認された。現在栽培品のみが存在する *P. notoginseng* の起源を考える上で興味深い知見である。これについては今後、個体数を増やして傾向を見極め、系統と産地との関連性、雑種基源である可能性、系統と品質との関連性について検討していく予定である。

### 結 語

「生薬は生きています」すなわち生薬は天産物に由来するため品質が流動的であり、いつの時代にも品質の評価は必要である。現在は柑橘類生薬のように食用の果実が流用されているだけであるが、今後遺伝子技術の進歩により様々な生薬が生まれるとも限らない。生薬の基源の解明は、多様な品質の生薬を一端収束させる手段である。この結果に併せて本草学的考察を行い古来の正品を明らかにし、またこれまでの成分化学的、生化学・薬理学的研究結果を統合していけば、今後どのような生薬を使用すればよいか、優良種と個々の生薬の特徴が解明できる可能性がある。品質評価においては生物学的な検討が少ない感があり、今後、基源、成分組成・含量とこの方面の研究との結合を考えていきたい。また、中国には「道地薬材」と称して、「歴代の産地で採れる生薬が最良の品質のものである」という思想がある。多様な品質の生薬が出現する現在、道

地薬材の品質がどのようなものか、興味を持たれるところである。

#### 参考文献

- 1) 土田貴志, 山本知枝, 山本恵一, 人見信之, 小坂昇, 岡田正道, 小松かつ子, 難波恒雄, *Nat. Med.*, **51**, 205 (1997).
- 2) 土田貴志, 山本知枝, 山本恵一, 人見信之, 小坂昇, 鹿野英士, 岡田正道, 小松かつ子, 難波恒雄, *Nat. Med.*, **50**, 114 (1996).
- 3) T. Tsuchida, T. Yamamoto, K. Yamamoto, N. Hitomi, N. Kosaka, M. Okada, K. Komatsu and T. Namba, *Nat. Med.*, **51**, 84 (1997).
- 4) T. Tanaka, *Bull. Univ. Osaka Pref.*, Ser. B., **21**, 139 (1969).
- 5) 難波恒雄, “和漢薬百科図鑑”, I, 保育社, 大阪, 1993, p.257.
- 6) 土田貴志, 山本知枝, 山本恵一, 人見信之, 小坂昇, 岡田正道, 小松かつ子, 難波恒雄, *Nat. Med.*, **51**, 231 (1997).
- 7) H. Takase, K. Yamamoto, H. Hirano, Y. Saito, A. Yamashita, *Jpn. J. Pharmacol.*, **66**, 139 (1994).
- 8) E. Middleton, Jr., G. Drzewiecki, J. Tatum, *Planta Med.*, **53**, 325 (1987).
- 9) 西本和光, 現代東洋医学, **5**, 55 (1984).
- 10) T. Nikaido, T. Ohmoto, U. Sankawa, T. Hamanaka, K. Totsuka, *Planta Med.*, **46**, 162 (1982).
- 11) 木下武司, 鮫島美枝子, 三川 潮, 生薬, **33**, 146 (1979).
- 12) L. Shi, Y. Gotou, K. Shindo, K. Ogawa, Y. Shida, Y. Sashida, H. Shimomura, C. Araki, T. Yoshida, *Shoyakugaku Zasshi*, **46**, 150 (1992).
- 13) 平野裕之, 高瀬英樹, 山本和典, 柳瀬晃子, 阿部健一, 斎藤雄二, *Nat. Med.*, **51**, 190 (1997).
- 14) 鹿野美弘, 斎藤謙一, 三浦五郎, 木島正夫, 生薬, **37**, 10 (1983).
- 15) Y.-F. Chen, H.-Y. Tsai, T.-S. Wu, *Planta Med.*, **61**, 2 (1995).
- 16) 岩政正男, “柑橘の品種”, 静岡県柑橘農業協同組合連合会, 静岡, 1976, pp.42, 49, 136, 137, 205, 214.
- 17) 塚本洋太郎総監修, “園芸植物大事典”, 小学館, 東京, 1994, pp.2340, 2343, 2344.
- 18) H. Fushimi, K. Komatsu, M. Isobe, T. Namba, *Phytomedicine*, **3**, 387 (1996).
- 19) H. Fushimi, K. Komatsu, M. Isobe, T. Namba, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1530 (1996).
- 20) 根井正利, “分子進化遺伝学”, 培風館, 東京, 1992, p.10.
- 21) M. L. Sogin, *PCR Protocols*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky ed., Academic Press Inc., San Diego, 1990, pp.307-314.
- 22) P. Kainz, A. Schmiedlechner, H. B. Strack, *Anal. Biochem.*, **202**, 46 (1992).
- 23) R. R. Gutell, B. Weiser, C. R. Woese, H. F. Noller, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **32**, 155 (1985).
- 24) H. Fushimi, K. Komatsu, M. Isobe, T. Namba, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 765 (1997).
- 25) S. M. Kahn, W. Jiang, T. A. Culberston, I. B. Weinstein, G. M. Williams, N. Tomita, Z. Ronai, *Oncogene*, **6**, 1079 (1991).
- 26) S. Takeda, S. Ichii, Y. Nakamura, *Hum. Mutat.*, **2**, 112 (1993).
- 27) K. Liere, G. Link, *Nucl. Acids Res.*, **23**, 917 (1995).
- 28) L. A. Johnson, D. E. Soltis, *Syst. Bot.*, **19**, 143 (1994).
- 29) K. Ooi, Y. Endo, J. Yokoyama, N. Murakami, *J. Bot.*, **70**, 328 (1995).
- 30) H. Fushimi, K. Komatsu, M. Isobe, T. Namba, Abstract Papers, International Symposium on Natural Medicines, Kyoto, Oct. 1997, p.58.