

令和元年5月29日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08304

研究課題名(和文) 分子生物学的手法を用いた動物由来生薬の基原生物鑑定法の構築

研究課題名(英文) Development of origin identification method for animal crude drugs using molecular biological techniques

研究代表者

中西 宏明 (NAKANISHI, Hiroaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90392274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物由来生薬の品質管理向上を目的に、遺伝子検査による基原動物の鑑定法を構築した。生薬からのDNA抽出は、市販のDNA抽出キットにひと手間加えることによって、簡便、かつ、あらゆる生薬に適用できる方法を考案した。基原の特定は、系統解析等で用いられる遺伝子領域の塩基配列を調べ、データベースと照合することによって実施した。24種33個体の生薬について基原を鑑定した結果、竜骨(哺乳類の骨の化石；DNAが抽出できなかった)を除く生薬については基原を特定できた。したがって、本法は動物由来生薬の基原鑑定法として実用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、従来の官能試験法、形態学的方法、化学的方法に続く方法として、生薬の品質管理に大いに役立つことが期待される。この方法は、客観的に動物種を判別できるだけでなく、粉末状になっても検査ができ、熟練度も不要である。学術面においては、様々な状態からのDNA抽出法を提示することで、薬学のみならず、法医学や食品学などの遺伝子研究に役立つものと考えられる。また、ワシントン条約等、捕獲に規制がある動物かどうかも判明できることから、食品偽装問題の解決等、社会的にも貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed an origin identification method using DNA analysis to improve quality control for crude drugs derived from animals. Thirty three samples in 24 kinds of crude drugs derived from animals were examined. DNA was extracted from almost all of the crude drugs by adjustment of commercially DNA extraction kit (QIAamp DNA Mini Kit). The species of origin were identified by BLAST analysis after sequencing the mitochondrial 16S rRNA, 12S rRNA and cytochrome oxidase I region. The origins were identified in all kinds of crude drugs except Longgu that DNA was not extracted. Our method proved very useful for identifying of the origins of crude drugs derived from animals.

研究分野：法生物学

キーワード：動物由来生薬 基原 鑑定 ミトコンドリアDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では、生薬は薬事法で医薬品として認められているため、医薬品・医薬部外品・健康食品として幅広く使用されている。生薬は、薬用となる植物または動物の特定の部位を乾燥したものであり、多くの場合は基原生物が生息もしくは栽培されている所からは遠く隔たった市場で取引されている。そのため、不純物が多い粗悪品や、基原生物が異なる偽品も出回っており、高品質な製品を市場に安定供給することは、生薬の品質管理にとって重大な課題である。生薬の品質管理の第一歩は、基原の正しい原材料を使用することであろう。したがって、生薬の鑑別・同定は、その品質管理に不可欠となっている。

生薬の鑑別・同定法としては、官能試験法、外部形態や内部組織の構造を比較する形態学的方法、含有化学成分を比較する化学的方法などが用いられてきた。しかしながら、これらの方法で用いられる鑑別指標(形態や含有化学成分)はいずれも生物(生薬)の表現形質であり、これらは生育環境や生物ステージによって変動する。このような表現形質を鑑別指標とする生薬の鑑別・同定法は、この点に本質的な欠陥がある。また、形態学的方法では、例えば粉末状など、大きく形態が変わった場合、鑑別することが難しくなる。

一方、近年、分子生物学的な技術の進歩と遺伝子情報の蓄積に伴い、遺伝子型を確認することで種を鑑別する手法が確立されてきた。生物の進化は、遺伝子の突然変異により担われており、近縁種間における遺伝子の塩基配列の違いは、種の系統関係を反映している。この理論に基づき、生物種鑑別では、リボゾーム RNA(rRNA)やシトクローム酸化酵素 I(COI)をコードする遺伝子領域の塩基配列を利用し、系統発生的に種を区分する方法が採用されている。生薬の鑑別法についても、植物由来の生薬では、分子生物学的な手法による鑑別法が多く発表されている。この手法は、鑑別のための専門知識と熟練を必要とせず、客観的な結果が得られやすい等の利点がある。しかしながら、動物由来の生薬に、分子生物学的な手法を用いた鑑別法は未だ確立されておらず、方法の構築は、動物由来生薬における品質管理向上のための重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子生物学的な手法による動物由来生薬における基原動物の鑑定法を構築することである。動物由来生薬から DNA を抽出している報告はいくつか見られるが、統一された手法はなく、中には煩雑なものも散見される。そのため、まず、あらゆる動物由来生薬に適応できる簡便な抽出方法の確立を試みた。さらに、哺乳類・爬虫類を基原とする生薬を中心とした 17 種類 21 例について、実際に基原を特定できるのかをミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域の塩基配列を調べることによって確認した。

次に、今まで報告の少ない節足動物および環形動物由来の生薬(7 種類 12 例)について、確立した DNA 抽出方法を適用し、どの遺伝子をターゲットすれば基原動物が識別できるのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

まず、動物由来生薬から DNA を抽出する簡便で統一的方法を構築するために、17 種類 21 例の生薬(阿膠 1 例、熊胆 2 例、牛黄 1 例、麝香 1 例、海馬 2 例、鹿茸 2 例、水牛角 1 例、五靈脂 1 例、龜板 1 例、土鼈甲 1 例、牡蠣 1 例、石決明 1 例、烏賊骨 1 例、竜骨 1 例、蛤蚧 1 例、反鼻 1 例、蛇胆 2 例)を用いた。また、節足動物および環形動物由来の生薬における基原鑑定法の構築には、7 種類 12 例の生薬(蛇虫 2 例、蟬退 1 例、塵虫 1 例、白僵蚕 1 例、桑螵蛸 1 例、水蛭 2 例、地竜 4 例)を用いた。これらの生薬は、いずれも日本の漢方薬局または漢方薬メーカーから、なるべく原型に近い形で入手した。

(2) DNA 抽出法

DNA は、以下の 3 通りで抽出した。

基本プロトコール(阿膠、熊胆、牛黄、麝香、海馬、鹿茸、五靈脂、蛤蚧、反鼻、蛇胆に適用)

サンプルを破砕機で粉末状にし、1.5mL のサンプルチューブに入れた(1 本につき 50mg 以下)。チューブに ATL(キアゲン)を 200 μ L と Proteinase K(キアゲン)を 20 μ L を加え(海馬と鹿茸はさらに 1M DTT を 10 μ L 加える)、56 $^{\circ}$ C でオーバーナイト感作させた。続いて、TE 飽和フェノールを 500 μ L 加え、30 秒間よく混和したのち、15,000rpm \times 10 分で遠心分離を行い、上清を分取した。上清に AL(キアゲン)を 200 μ L を加え、混和したのち、70 $^{\circ}$ C で 10 分間感作させた。続いて、100%エタノールを 200 μ L を加え、よく混和したのち、QIAamp DNA Mini Kit(キアゲン)のカラムにアプライし、8,000rpm \times 1 分間、遠心分離した。この時、複数のチューブを用いている場合は、遠心分離を繰り返し、1 本のカラムにまとめた。カラムに AW1(キアゲン)を 500 μ L を加え、8,000rpm \times 1 分間、遠心分離したのち、AW2(キアゲン)を 500 μ L を加え、14,000rpm \times 3 分間、遠心分離した。最後に、カラムに Buffer EB(キアゲン)を 60 μ L を加え、10 分間静置したのち、8,000rpm \times 1 分間で遠心分離をして、DNA 溶液を溶出させた。

脱灰法(水牛角、龜板、土鼈甲、牡蠣、烏賊骨に適用)

サンプルをハンマー等でザラメ状に砕き、15mL チューブに入れた。チューブに 0.5M EDTA 7mL を加え、回転させながら 56 $^{\circ}$ C でオーバーナイト感作させた。3,000rpm \times 10 分間で遠心

分離し、上清を取り除き、再度滅菌水 7mL を加え、混和することで洗浄を行い、これを 3 回繰り返した。チューブに ATL を 400 μ L と Proteinase K を 50 μ L を加え、56 でオーバーナイト感作させた。続いて、TE 飽和フェノールを 1mL 加え、30 秒間よく混和したのち、3,000rpm \times 10 分で遠心分離を行い、上清を分取した。上清に AL を上清と等量加え、混和したのち、100%エタノールを上清と等量を加え、よく混和した。反応液を QIAamp DNA Mini Kit のカラムにアプライし、8,000rpm \times 1 分間、遠心分離した。この時、遠心分離を繰り返し、1 本のカラムに全量アプライした。続く操作(カラムの洗浄から)は と同様に行った。

TBONE EX KIT 法(石決明、竜骨に適用)

サンプルをハンマー等でザラメ状より少し大きく砕き、Solution A が入ったチューブに入れ、攪拌させながら 23 でオーバーナイト感作させた。続いて、Solution B を 1.8mL 加え、56 で 2 時間感作させた。 の EDTA の洗浄と同じ要領で、滅菌水で 3 回洗浄した(最後に水分を完全に取り除く)。続いて、Solution C を 700 μ L 加え、56 でオーバーナイト感作させた。反応液 2mL を分取し、TE 飽和フェノールを 500 μ L 加え、15 回転倒混和させた。13,000rpm \times 5 分間、遠心分離をし、上清を分取した。上清に AL を 500 μ L を加え、混和したのち、100%エタノールを上清と等量を加え、よく混和した。反応液を QIAamp DNA Mini Kit のカラムにアプライし、8,000rpm \times 1 分間、遠心分離した。この時、遠心分離を繰り返し、1 本のカラムに全量アプライした。続く操作(カラムの洗浄から)は と同様に行った。

なお、節足動物および環形動物由来の生薬は、いずれも の方法で DNA 抽出を実施した。

(3) ターゲット遺伝子と PCR 増幅

ターゲットとした遺伝子は、遺伝子での系統解析でよく用いられる、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域、12S rRNA 領域および Cytochrome Oxidase I (COI) 領域とした。用いたプライマーは表 1 の通りである。なお、動物生薬 17 種類 21 例においては、16S rRNA での検討のみを行い、節足動物および環形動物由来の生薬 7 種類 12 例においては、すべてのターゲットについて検討した。

表 1 用いたプライマーの一覧

Target		Sequence (5'-3')
16S rRNA	Forward	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
	Reverse	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT
12S rRNA	Forward	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT
	Reverse	AAGAGCGACGGGCGATGTGT
COI	Forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

PCR 増幅条件は、動物生薬 17 種類 21 例においては、20 μ L の反応液中に 10 μ L の 2 \times Premix Ex Taq Hot Start(タカラバイオ)、0.5 μ L の 10 μ M プライマー(最終濃度;各 0.25 μ M)、2 μ L の抽出 DNA 溶液(10ng/ μ L 以下)を含み、GeneAmp PCR system 9700(9600 emulation mode)で 98 10 秒のち、98 10 秒、55 30 秒、72 1 分を 35 サイクル(牡蠣、石決明、烏賊骨および竜骨は 40 サイクル)で PCR を実施した。節足動物および環形動物由来の生薬については、すべてのターゲットに共通で、20 μ L の反応液中に 10 μ L の KOD One PCR Master Mix(東洋紡)、1 μ L の 10 μ M プライマー(最終濃度;各 0.5 μ M)、2 μ L の抽出 DNA 溶液(10ng/ μ L 以下)を含み、GeneAmp PCR system 9700(9600 emulation mode)で 98 10 秒、55 5 秒、68 1 秒を 40 サイクルで PCR を実施した。

(4) シークエンスならびに BLAST 解析

シークエンス反応は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(サーモフィッシャー)で行い、3500 genetic analyzer(サーモフィッシャー)で電気泳動を行い、Sequencing Analysis Software v.5.2(サーモフィッシャー)および Sequencher v.4.7(Gene Codes)で解析した。シークエンス結果の相同性解析は、BLAST 解析 (blastn; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)で実施し、ハイスコアの種をピックアップした。

4. 研究成果

(1) 動物由来生薬から DNA を抽出する簡便で統一的方法を構築について

用いたサンプル量、抽出された DNA 濃度および BLAST 解析結果を表 2 に示す。竜骨からは DNA は抽出できなかったが、残りのサンプルでは、抽出された DNA 量は PCR 増幅を行うのに充分だった。実際に 16S rRNA 領域での PCR 増幅は、ほとんどのサンプルで可能で、マッチ率 97%以上の相同性をもって基原を確認することができた。したがって、本研究で提案する 3 通りの抽出方法は、動物生薬からの DNA 抽出に有効であることが示された。また、本法は、2 種類の市販キットさえ用意すれば、誰でも簡単に DNA 抽出することができ、簡便性も伴うことが示された。

一方で、PCR 産物は、竜骨と阿膠および海馬 2 例のうちの 1 例で得られなかった。竜骨は DNA が抽出されないためと考えられたが、阿膠はその製法(口バの皮を沸騰させてなめすため、

DNAが分解する)、海馬はDNAの低分子化に原因があると考えられた。実際に阿膠については、非常に短い増幅産物長(66bp)を増幅させるロバ特異的プライマーを用いてPCRしたところ、PCR産物が得られ、シークエンスの結果、ロバのDNAであることが確認された。

表2 用いたサンプル量、抽出されたDNA濃度およびBLAST解析結果

No.	生薬名	用いた量	抽出されたDNA量 ($\mu\text{g/g}$ sample)	BLAST解析結果	マッチ率 (一致塩基数/登録塩基数)
1	阿膠	5 g	0.1128	PCR増幅せず	—
2-1	熊胆	10 mg	86.4	ヒグマ	100% (551/551)
2-2	熊胆	20 mg	1.563	ツキノワグマ	99% (550/552)
3	牛黄	100 mg	0.744	ウシ、コブウシ	100% (547/547)
4	麝香	50 mg	1.788	ヤマジャコウジカ	100% (549/549)
5-1	海馬	500 mg	0.2436	PCR増幅せず	—
5-2	海馬	10 mg	39.48	タカクラタツ	100% (572/572)
6-1	鹿茸	10 mg	162.0	アカシカ	100% (547/547)
6-2	鹿茸	10 mg	207.0	アカシカ	99% (546/547)
7	水牛角	100 mg	2.292	スイギュウ	100% (549/549)
8	五霊脂	200 mg	100.5	ミミゲモモンガ	99% (541/544)
9	亀板	10 mg	15.66	クサガメ	99% (552/553)
10	土鼈甲	20 mg	32.7	スッポン	100% (556/556)
11	牡蠣	2 g	0.00603	マガキ	100% (530/530)
12	石決明	1 g	0.102	エゾアワビ	99% (525/526)
13	烏賊骨	1 g	0.3054	トラフコウイカ	98% (494/502)
14	竜骨	2 g	0.00132	PCR増幅せず	—
15	蛤蚧	10 mg	261.6	トッケイヤモリ	97% (547/566)
16	反鼻	10 mg	253.8	ニホンマムシ	99% (501/503)
17-1	蛇胆	10 mg	205.8	アミメニシキヘビ	99% (492/493)
17-2	蛇胆	10 mg	166.8	ニホンマムシ	99% (501/503)

(2) 節足動物および環形動物由来の生薬の基原鑑定法について

表3に、用いたサンプル量、抽出されたDNA量、BLAST解析の結果を示す。すべてのサンプルにおいて、抽出されたDNA量は、少量(50mg以下)でもPCR増幅を行うのに充分だった。したがって、このDNA抽出方法が節足動物と環形動物にも適用できることが示された。BLAST解析では、蝉退、塵虫、白僵蚕および桑螵蛸において、12SrRNAとCOIでのマッチ率が99%を超えた。また、12SrRNAとCOIとで同じ種とマッチしたため、起源を確認することは容易だった。

水蛭2例は、いずれも12SrRNAとCOIで高いマッチ率(>97%)を示したが、同じ製薬会社から入手したにもかかわらず、種は異なっていた。同社は異なる年に水蛭を購入したため、それが原因である可能性があるかもしれない。4例の地竜のうち2例(No.7-3と7-4)は、16SrRNAとCOIにおいて高いマッチ率を示したが、残りの2例(No.7-1と7-2)ではマッチ率が低かった(93%以下)。地竜4例は、いずれも同じ製薬会社から提供されたものであるが、輸入国が高いマッチ率と低いマッチ率のもの間では異なっていた。このように、同じ製薬会社から提供される同じ生薬においてさえ、基原が輸入年や輸入国によって異なる症例が見られた。したがって、基原が従来の方法によって確認できないとき、分子生物学的の方法による基原同定は品質管理に役立つことが示唆された。

虻虫は2例とも多くの種にマッチし、それらのマッチ率は他の生薬より低かった。データベースに登録されている種が少ない場合、希少種は類似した種と低いマッチ率で示されてしまう場合がある。今回は、登録されているアブの種が十分でないが、アブは高い遺伝的多様性を持つ可能性が考えられた。さらに、虻虫は、さまざまなアブの種を基原としているため、アブの種がデータベースに登録されていなかった場合、基原を確認することは難しい場合があると考えられた。

桑螵蛸は16SrRNAで増幅されず、地竜4例はいずれも12SrRNAで増幅しなかった。また、蝉退、塵虫、白僵蚕および水蛭(No.6-2)は、16SrRNAで増幅されたにもかかわらず、混合シークエンスを示し、解析できなかった。

結論として、節足動物と環形動物に由来する生薬には、PCR増幅とシークエンスの成功率の点でCOI領域が最も適していると考えられた。また、基原の種は、同じ製薬会社でもロットによって異なる可能性があるため、本法はDNA鑑定ならではの品質管理に役立つことが示された。

表3 用いたサンプル量、抽出された DNA 濃度および BLAST 解析結果(節足・環形動物由来生薬)

No.	生薬名	用いた量	抽出された DNA 量 (µg/g sample)	BLAST解析結果(マッチ率:一致塩基数/登録塩基数)		
				16S rRNA	12S rRNA	COI
1-1	虻虫	20 mg	15.30	Atylotus miser (アブ亜科の一種:496/512) Tabanus rufifurax (アブ属の一種:492/512) Haematopota pluvialis (ゴマフアブ:492/513)	Haematopota pluvialis (ゴマフアブ:343/358) Atylotus miser (アブ亜科の一種:342/358) Cydostomyia duplonotata (アブ科の一種:342/359)	Tabanus borealensis (アブ属の一種:643/657)
1-2	虻虫	20 mg	11.08	Tabanus rufifurax (アブ属の一種:497/511) Atylotus miser (アブ亜科の一種:494/511)	Cydostomyia duplonotata (アブ科の一種:344/362) Atylotus miser (アブ亜科の一種:343/361)	Hybomitra sp. (アブ科の一種:631/658) Tabanus asymmetricus (アブ属の一種:626/658)
2	蜂退	50 mg	0.16	解析不能	Graptopsaltria nigrofuscata (アブラゼミ:349/350)	Graptopsaltria nigrofuscata (アブラゼミ:657/658)
3	瘧虫	20 mg	1.48	解析不能	Eupolyphaga sinensis (シナゴキブリ:351/353)	Eupolyphaga sinensis (シナゴキブリ:658/658)
4	白僵菜	50 mg	1.92	解析不能	Bombyx mandarina (クワコ:354/354) Bombyx mori (カイコ:354/354)	Bombyx mori (カイコ:658/658)
5	桑螵蛸	20 mg	1.72	増幅せず	Tenodera sinensis (オオカマキリの一種:347/347)	Mantidae sp. (カマキリ科の一種:655/658) Tenodera sinensis (オオカマキリの一種:651/658)
6-1	水蛭	10 mg	1.27	Whitmania pigra (ウマビル:480/480)	Whitmania pigra (ウマビル:344/344)	Whitmania pigra (ウマビル:658/658)
6-2	水蛭	10 mg	0.61	解析不能	Hirudinaria manillensis (中国名「牛蛭」:300/309)	Poecilobdella manillensis (中国名「牛蛭」:655/655) Hirudinaria manillensis (中国名「牛蛭」:648/651)
7-1	地竜	20 mg	8.79	Megascolecidae sp. (フトミズ科の一種:448/485) Amyntas sp. (アズマフトミズ属の一種:443/480)	増幅せず	Megascolecidae sp. (フトミズ科の一種:564/657) Amyntas gracilis (ハウイミズ:563/658)
7-2	地竜	20 mg	1.44	Amyntas sp. (アズマフトミズ属の一種:444/480) Megascolecidae sp. (フトミズ科の一種:445/485)	増幅せず	Amyntas sp. (アズマフトミズ属の一種:567/653)
7-3	地竜	20 mg	1.15	Lumbricina sp. (ミズミズ目の一種:482/482) Amyntas aspergillus (タイワンシチュウヘンミズ:477/482)	増幅せず	Lumbricina sp. (ミズミズ目の一種:656/658) Amyntas aspergillus (タイワンシチュウヘンミズ:635/638)
7-4	地竜	20 mg	1.54	Amyntas aspergillus (タイワンシチュウヘンミズ:479/482) Amyntas medicus (アズマフトミズ属の一種:479/482)	増幅せず	Amyntas aspergillus (タイワンシチュウヘンミズ:654/658)

これらのことより、本研究の成果として、動物由来生薬から DNA を抽出する簡便で統一的方法を、市販のキットにひと手間加えることにより構築することができた。また、この抽出方法は、哺乳類や爬虫類等由来の生薬だけでなく、今まで報告の少なかった節足動物および環形動物由来の生薬にも適用できることが示された。また、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域、12S rRNA 領域および Cytochrome Oxidase I 領域を指標とすれば、基原鑑定できることが示された。したがって、本法が、従来の基原鑑定法に続く新しい鑑定法として実用化できると結論づけられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Nakanishi H, Yoneyama K, Hayashizaki Y, Hara M, Takada A, Saito K. Establishment of widely applicable DNA extraction methods to identify the origins of crude drugs derived from animals using molecular techniques. J Nat Med 2019; 73: 173-178. <https://doi.org/10.1007/s11418-018-1261-3>

[学会発表](計3件)

- 大森毅, 大津留修, 中西宏明, 笠松正昭, 杉田律子, 長岡功, 齋藤一之, 落合則子, 酒井シヅ. 医史的資料の分析～江戸期の医師井上貫流の遺した異物資料の成分検査～. 日本薬学会第137年会, 2017.
- 中西宏明, 米山克美, 林崎義映, 原正昭, 高田綾, 齋藤一之. 分子生物学的手法を用いた動物由来生薬の基原動物鑑定法の構築. 日本薬学会第138年会, 2018.
- 中西宏明, 米山克美, 原正昭, 高田綾, 齋藤一之. 分子生物学的手法を用いた節足および環形動物由来生薬の基原動物鑑定. 日本薬学会第139年会, 2019.

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 齋藤 一之

ローマ字氏名: SAITO, Kazuyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。