

## PCR-RFLP 法によるビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の妥当性確認試験

丸山卓郎<sup>a</sup>, 近藤健児<sup>b</sup>, 四柳雄一<sup>c</sup>, 山本豊<sup>d</sup>, 川崎武志<sup>e</sup>, 司馬真央<sup>b</sup>, 寺坂和祥<sup>f</sup>, 山根真由<sup>c</sup>, Shu Zhu<sup>g</sup>, 坂田こずえ<sup>a</sup>, 藤田正雄<sup>e</sup>, 穉山浩<sup>a</sup>, 西村直行<sup>c</sup>, 小松かつ子<sup>g</sup>, 水上元<sup>f</sup>, 合田幸広<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 国立医薬品食品衛生研究所 <sup>b</sup> 株式会社 ツムラ <sup>c</sup> 株式会社 島津製作所 <sup>d</sup> 株式会社 栃本天海堂  
<sup>e</sup> 株式会社 ウチダ和漢薬 <sup>f</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科 <sup>g</sup> 富山大学和漢医薬学総合研究所

### The Inter-Laboratory Validation Study for the Purity Test of Atractylodes Rhizome Targeted for Atractylodes Lancea Rhizome Based on PCR-RFLP

Takuro Maruyama<sup>a</sup>, Kenji Kondo<sup>b</sup>, Yuichi Yotsuyanagi<sup>c</sup>, Yutaka Yamamoto<sup>d</sup>, Takeshi Kawasaki<sup>e</sup>, Mao Shiba<sup>b</sup>, Kazuyoshi Terasaka<sup>f</sup>, Mayu Yamane<sup>c</sup>, Shu Zhu<sup>g</sup>, Kozue Sakata<sup>a</sup>, Masao Fujita<sup>e</sup>, Hiroshi Akiyama<sup>a</sup>, Naoyuki Nishimura<sup>c</sup>, Katsuko Komatsu<sup>g</sup>, Hajime Mizukami<sup>f</sup> and Yukihiko Goda<sup>a</sup>

<sup>a</sup>National Institute of Health Sciences (NIHS), 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup>Tsumura & Co., 3586 Yoshiwara, Ami, Inashiki, Ibaraki 300-1192, Japan

<sup>c</sup>Shimadzu Corporation, 1 Nishinokyo Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

<sup>d</sup>Tochimoto Tenkaido Co., Ltd., Oniya, Kaibara, Tamba, Hyogo 669-3315, Japan

<sup>e</sup>Uchida Wakan-yaku Co., Ltd., 4-4-10 Higashinippori, Arakawa-ku, Tokyo 116-8571, Japan

<sup>f</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

<sup>g</sup>Institute of Natural Medicine, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

(Received October 22, 2009)

An inter-laboratory validation study was performed for the purity test of Atractylodes Rhizome targeted for Atractylodes Lancea Rhizome based on a PCR-RFLP by 7 persons whose experience with PCR experiments ranges from 0 to 10 years. Twenty-five crude drugs derived from medicinal *Atractylodes* plants were distributed to each practitioner and the discrimination of them into Atractylodes Rhizome and Atractylodes Lancea Rhizome was carried out following the common experimental protocol. As a result, all practitioners achieved exact identification regardless of their experience with PCR or the kind of the instruments used in the test. This result indicates that the test is reliable for the discrimination of Atractylodes Rhizome and Atractylodes Lancea Rhizome.

**Keywords:** purity test; Atractylodes Rhizome; Atractylodes Lancea Rhizome; polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); validation

天然物である生薬の品質を確保するためには、正しい基原のものを用いることが必須であり、基原が生薬の適否の判定基準であることは、日本薬局方の生薬総則第4項に明記されている<sup>1,2)</sup>。従来、生薬の基原種の鑑定は、

内部及び外部形態の特徴に基づいてなされているが、専門的な知識、技術を必要とし、近年、その担い手は減少傾向にある。一方、近年の分子生物学、遺伝子工学の進歩に伴い、遺伝子塩基配列の違いに基づき、生薬の分類、

鑑定を行う研究が、さかんに行われている<sup>3)</sup>。同方法は、従来までの組織形態や成分などの表現型 (phenotype) に基づく分類、鑑別と異なり、直接、遺伝子型 (genotype) を見るため、環境要因の影響を受けないという利点を有している。また、これまでの方法では困難とされた粉末生薬や種間雑種の同定に威力を発揮する。

このような状況を受け、第十五改正日本薬局方第一追補より、「遺伝子情報を利用する生薬の純度試験法」が、参考情報として収載されている<sup>4)</sup>。参考情報では、形態及び成分化学的な同定が困難であり<sup>5-8)</sup>、また、雑種個体が存在する<sup>9)</sup>生薬の一つとして朮類生薬を取り上げ、ビャクジュツ及びソウジュツの基原植物である4つの *Atractylodes* 属植物 (ビャクジュツ, *Atractylodes japonica* 及び *A. ovata*; ソウジュツ, *A. lancea* 及び *A. chinensis*) について、核 rDNA の ITS1 領域の塩基配列の違いに基づき、mutant allele specific amplification (MASA) 法により鑑別する手法が紹介され、この原理に基づき、ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験が示されている<sup>4,10)</sup>。この試験方法では、生薬からの DNA 溶液の調製法として、シリカゲル膜への DNA の吸着を利用した方法が採用されている。同法は、遺伝子組換え食品の検知法<sup>11)</sup>でも採用された方法であるが、操作がやや煩雑であるため試験実施者の技術差が出やすい方法でもある。従って、得られる DNA 溶液の品質に差が生じる場合があり、これは、次の PCR のステップの結果に影響を与えうる。また MASA 法は、PCR におけるプライマーと鋳型 DNA のアニーリング温度の僅かな違いを利用したものであるため、各試験機関での PCR 装置の精密な温度校正が要求されるなどの課題があった。

生薬からの DNA 調製において、煩雑な精製過程が要求される大きな理由は、試料由来の多糖類やフェノール類等、PCR 酵素阻害作用を有する物質を十分に除く必要があるためである。一方、最近では、試料由来の PCR 酵素阻害物質の作用を抑える働きを有する PCR 試薬が開発されている。このような PCR 試薬を用いた場合、検体に DNA 抽出試薬を加え、インキュベーションを行うのみの簡易な方法で調製した DNA 溶液でさえも、PCR の鋳型に用いることが可能であり、煩雑な DNA 調製のプロセスを回避できる。また、得られた PCR 産物を用いて、restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法による基原種鑑別を行うことにより、MASA 法のような PCR 装置の精密な温度校正の必要性も回避できる。

Kondo らは、このような視点に立ち、核 rDNA の ITS1 領域の塩基配列の違いを利用した PCR-RFLP 法によるビャクジュツとソウジュツの区別法を開発している<sup>12)</sup>。

本研究では、Kondo らにより論文報告された方法を基に、PCR-RFLP 法を利用したビャクジュツのソウジュツに対する純度試験法案を作成し、その適用性、実用性、信頼性及び目的適合性を評価するため、複数機関による妥当性確認試験を行った。すなわち、産官学からなる7つの機関に、同一の試料を未知検体として配布し、共通の試験法案 (プロトコール) により純度試験を行い、その試験結果が、全機関、同一の結果を導くかどうかを試験したので、その結果を報告する。

## 実験方法

実験条件のフローチャートを Fig. 1 に、利用した DNA 領域の塩基配列、プライマー、制限酵素部位の位置を Fig. 2 に示した。

### 1. 実験材料

試験対象としたソウジュツ及びビャクジュツは、基原種の同定済みのものを、生薬メーカー2社より、譲り受けた。この内、*A. lancea*, 7 個体; *A. chinensis* 及び *A. ovata*, 各 10 個体; *A. japonica*, 20 個体について、試験方法と同一の方法により、予め、PCR-RFLP 法における電気泳動パターンの確認を行った。

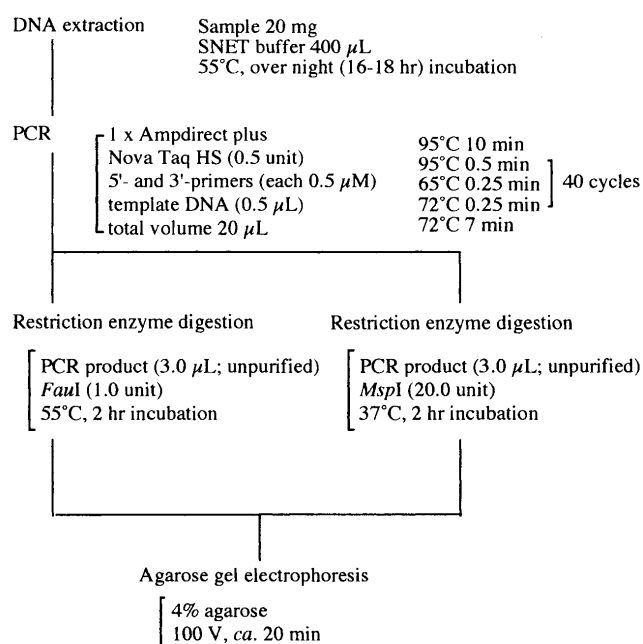
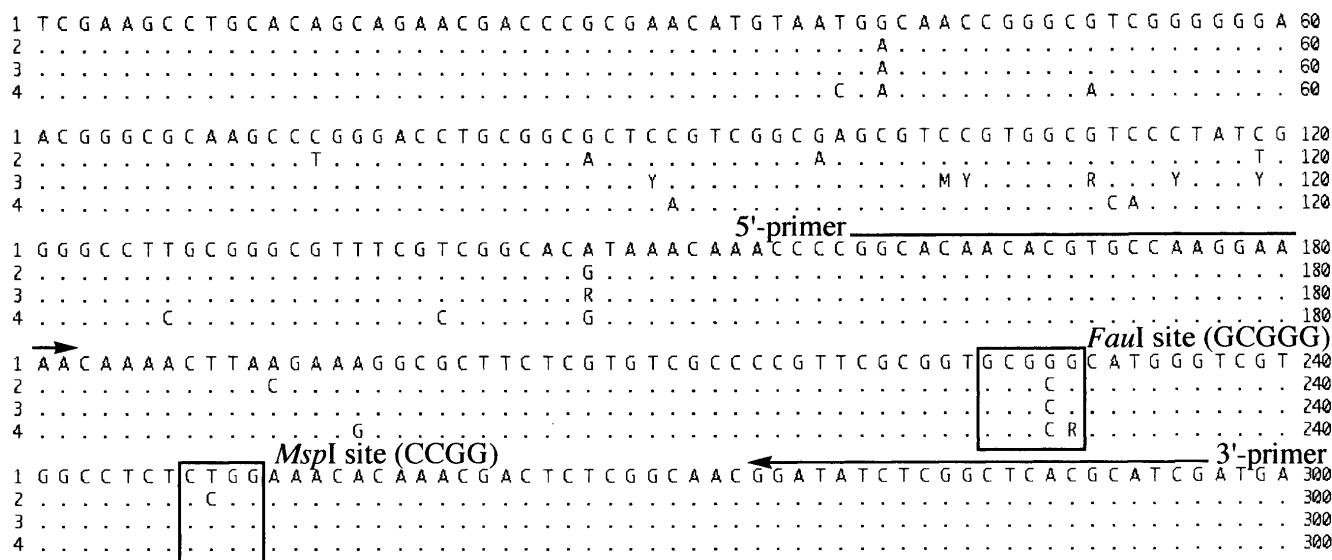


Fig. 1 Flow chart and experimental conditions of the purity test



**Fig. 2 ITS sequence alignment of medicinal Atractylodes plants**

1, *A. lancea* (Acc. no. AB219407; 2, *A. chinensis* (AB219408); 3, *A. japonica* (AB219405); 4, *A. macrocephala* (*A. ovata*) (AB219406)

A dot '.' Indicates the same nucleotide as that of *A. lancea*.

Arrows indicate locations and directions of the primers

## 2. 試薬

DNA の抽出には, SNET buffer (20 mM Tris/HCl pH8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K) を用いた. この抽出試薬については, 試験参加機関の一つが調製した同一ロットのものを各機関に配布し, 使用した. DNA ポリメラーゼには, Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck) を, PCR 試薬には, Ampdirect plus (Shimadzu) を用いた. 制限酵素, *FauI* 及び *MspI* は, いずれも New England BioLabs 社のものを用いた. 電気泳動は, E-gel (Invitrogen) を用いた. 水は, Milli-Q Synthesis A10 (Millipore) で精製した超純水を 121°C, 20 分の条件でオートクレーブ滅菌したものをを用いた. なお, 上記試薬類の内, 電気泳動以降は, 送付検体の確認を行った機関が使用したものを記載した.

## 3. 機器

恒温槽, ドライ サーモ バス MG-200 (東京理化器械); 遠心機, KUBOTA1920 (Kubota); ボルテックスミキサー, TTM-1 (Shibata); サーマルサイクラー, DNA Engine PTC-200 (MJ Research, 現 Bio-Rad); 電気泳動装置, E-gel (Invitrogen); トランスイルミネーター, DT-20MCP (Atto); ゲルイメージ解析装置, AE-6911 (Atto). なお, 上記機器類は, 送付検体の確認を行った機関が使用したものを記載した.

## 4. 試料の調製

基原植物を確認した各個体を 1-1.5 cm 角ほどの大きさに切断し, 各機関に 25 検体を未知試料として送付した. 25 検体の内訳は, *A. lancea*, 4 検体; *A. chinensis*, 6 検体; *A. japonica*, 8 検体; *A. ovata*, 7 検体とした. 試験の性質上, 試料は, 各検体番号について全機関同一個体を使用することが望ましいが, 通常流通する試料の大きさでは, それを可能にする量が得られなかったため, *A. lancea* の 3 検体及び *A. japonica* の全検体で, 各検体番号につき, 2 個体を使用した.

## 5. DNA 溶液の調製

各検体の外皮を削り, 除去した後, 残った内部組織をナイフで細かく (厚さ 0.2 mm, 長さ 2 mm 程度) 削り, 採取した. このもの, 20 mg に SNET buffer 400  $\mu\text{L}$  を加え, 攪拌した後, 55°C で, 終夜 (16-18 時間), インキュベーションし, 終了後, 95°C, 5 分間加温し, Proteinase K を失活させた. 遠心 (15000 x g, 2 分) 上清を採取し, DNA 試料溶液とした.

## 6. プライマー

5'primer, 5'-GGC ACA ACA CGT GCC AAG GAA AA-3'; 3'primer, 5'-CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C-3'. 全てのプライマーは, テキサスジェノミクスジャパン (株) 製のゲルろ過精製グレードのものをを用いた.

## 7. PCR 条件

1 x Ampdirect plus, 0.5  $\mu$ M 5' 及び 3' プライマー, 0.5 unit Nova Taq Hot Start DNA ポリメラーゼを含む液に, 各検体より調製した DNA 試料溶液 0.5  $\mu$ L を水中で加え, 全量を 20  $\mu$ L とし, 反応を行った. 温度条件は, 以下の通りである: 95°C, 10 分; 95°C 30 秒, 65°C, 15 秒, 72°C, 15 秒, 40 サイクル; 72°C, 7 分.

## 8. 制限酵素処理及び DNA fragment の確認

### 8-1. *FauI*

酵素に添付の緩衝液及び 1.0 unit の *FauI* からなる液に, PCR 産物 (未精製) 3.0  $\mu$ L を水中で加え, 全量を 15  $\mu$ L とし, 55°C, 2 時間, インキュベーションを行った. 終了後, 72°C, 10 分間加温し, 酵素を失活させた.

### 8-2. *MspI*

酵素に添付の緩衝液及び 20.0 unit の *MspI* からなる液に, PCR 産物 (未精製) 3.0  $\mu$ L を水中で加え, 全量を 15  $\mu$ L とし, 37°C, 2 時間, インキュベーションを行った. 終了後, 72°C, 10 分間加温し, 酵素を失活させた.

### 8-3. Fragment pattern の確認

制限酵素処理断片の解析は, アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度: 4%) により行った. 試料とともに泳動するプロモフェノールブルー色素が原点から 2 cm 程度進んだところで, 電気泳動を終了し, UV (312 nm) 照射下のエチジウムプロマイドの蛍光により DNA 断片を確認した.

## 9. 判定

改定試験法案では, ビャクジュツ 25 個体に番号を付し, 各個体, 個別に PCR-RFLP 法により基原種鑑別を行い, 若い番号から順に, 鑑別可能な 20 個体を選び, その中に不適合試料が幾つ存在するかで, 純度試験の可否判定を行う. 従って, PCR-RFLP 法による各個体の鑑別基準と純度試験の判定基準の二種の基準を定めた. しかし, 今回の試験では, 実験方法の妥当性の確認を目的にしたため, 多くの不適合試料を未知検体に加えており, 純度試験としての判定は, 当然, 不合格になる. このため, 判定は, 各検体の可否についてのみ行った. 各個体の判定基準は, 下記の通りとした.

1. PCR 反応におけるブランク反応液に, プライマーダイマー (約 40 bp) を除くバンドを検出しない. もし, バンドが検出される場合は, PCR 溶液の調製の際に, 外因性の DNA が混入したと判断し, PCR からやり直す.

2. どちらの制限酵素反応液においても, 約 140 bp のバンド及びプライマーダイマー (約 40 bp) の他に, バンドを認めない場合, ビャクジュツ (*A. japonica* または *A. ovata*) と判断する.

3. 制限酵素 *FauI* 反応液において, 約 80 及び 60 bp のバンドを認める時, *A. lancea* と判断する.

4. 制限酵素 *MspI* 反応液において, 約 90 及び 50 bp のバンドを認める時, *A. chinensis* と判断する.

5. 制限酵素反応液において, プライマーダイマー (約 40 bp) の他に, いずれのバンドも認めない場合, PCR 産物が得られていないと判断し, その個体の基原種は, 判定不能とする.

## 10. 試験の実施

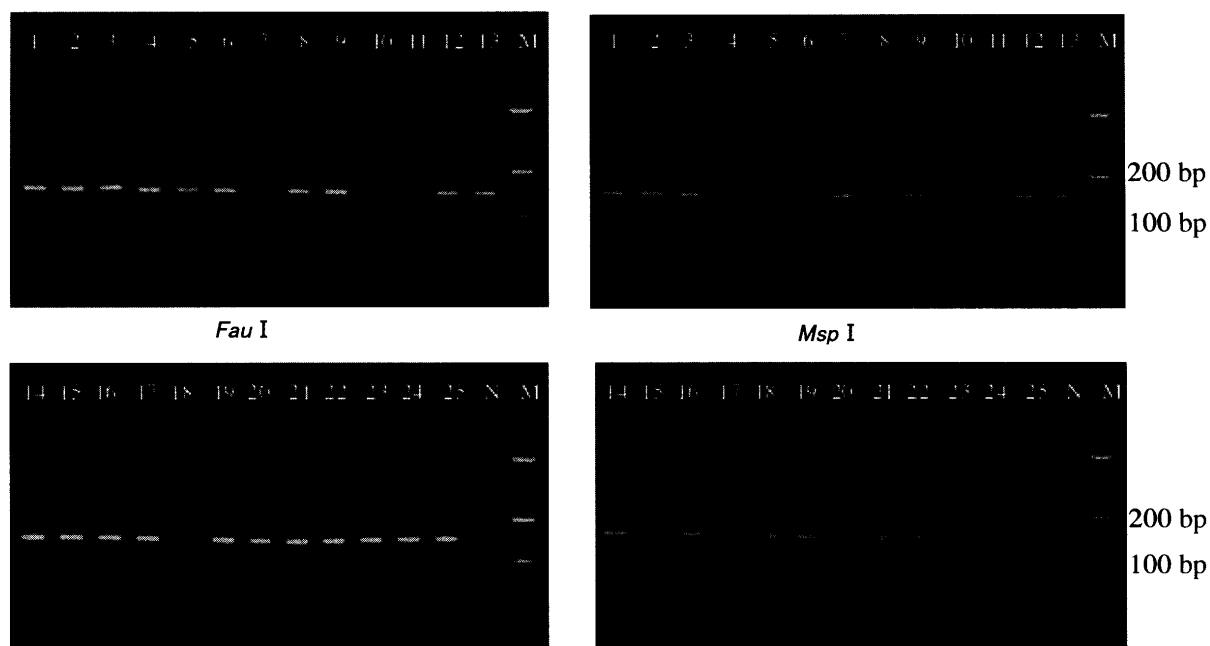
今回の妥当性確認試験に参加した機関は, 7 機関であった. この内, 2 機関は, 実験設備の都合上, 同一の施設を使用した. 未知試料 25 検体, 各プライマー, DNA 抽出試薬及び実施要項を各機関へ送付し, 試験期間は, 約 2 ヶ月とした. 結果は, 各機関が判定基準に従い判定し, 所定の様式により, 試験実施者の氏名, PCR 実験の経験年数, 使用機器, 各検体の可否及び電気泳動像を回答として得た.

## 結果

全試験実施機関において, 特にトラブルも無く, 期間内に試験を終了した. 結果は, 全機関において判定不能試料も無く, 全ての試料で正しい回答を導くことが出来た. 結果の一例を Fig. 3 に示した. Fig. 3 において, 制限酵素断片を生じた検体の一部において, 元の PCR 産物 (約 140 bp) のバンドも認められている (*FauI* 処理群における lane 18; *MspI* 処理群における lanes 8, 15, 20) が, これは, *A. lancea* と *A. chinensis* の雑種個体<sup>9)</sup> に起因するものか, もしくは, 制限酵素未消化の PCR 産物に由来するものと思われる.

試験実施者 7 名の PCR 実験の経験年数は, 0-10 (平均 5.7) 年で, 2 名が経験年数 0 年だった.

実験機器の種類では, サーマルサイクラーは, 4 社, 5 種類の装置が使用された. 制限酵素処理用のインキュベーターは, 全機関でサーマルサイクラーを転用していた他, 1 機関で, hybridization oven も転用していたため, インキュベーションに使用された機器の種類としては, 5 社, 6 種類だった. また, 電気泳動システムについては, 今回



**Fig. 3 Electropherograms of PCR-RFLP assay on the purity test**

Lanes 1 to 25 correspond to samples 1 to 25.

Lane N is negative control where no template control in PCR was digested.

Lane M is 20 bp DNA ladder.

の試験に使用するアガロース濃度が高く、取り扱いが難しいため、試験実施説明会において、プレキャスト型アガロースゲルの使用を推奨したこともあり、5 機関で、Invitrogen 社の E-gel を使用していた。他の 2 機関は、汎用型の mupid (Advance) を使用していた。トランスイルミネーターは、4 社、5 種類の装置が使用された。

特記事項として、試験実施者から寄せられた意見は、概ね、以下の通りだった。

1. DNA 抽出の際の遠心において、プロトコールの条件では、組織が沈殿しないものがあった。
2. DNA 試料溶液は、やや粘性があり、PCR の鋳型として 0.5  $\mu$ L をとるのは、やや難しく感じた。
3. 4% アガロースゲルを自作したが、取り扱いが難しく、プレキャストゲルの方が良いと感じた。
4. PCR の際の negative control も制限酵素処理に供するべき。
5. 現行の試験法に比べ、さらに操作が簡略化されており、不慣れな者でも可能であると思われた。
6. 個別別の試験であれば、遺伝子情報を使用しなくても、他の方法で、鑑別は可能である。むしろソウジュツのビャクジュツに対する純度試験法について混合（粉末）試料で、実施可能な方法を検討すべき。

その他に、1 機関より参考情報として Fermentas 社製の *FauI* (*SmaI*) を使用した際の結果が寄せられた。それによると、New England BioLabs 社製の *FauI* に比べ、Fermentas 社製のものでは消化効率が高く、制限酵素断片の確認がより容易であった（データ未掲載）。また、Fermentas 社のものでは温度条件が 37°C であるため、*MspI* の反応と同時に、同一の装置を用いることが出来る利点を有していた。ただし、価格は New England BioLabs 社のものが、Fermentas 社のものに比べ、安価である。

### 考察

今回の研究結果から、PCR-RFLP 法による茸類生薬の鑑定法は、試験実施者の技術力、使用実験装置によらず、全機関で、同一の結果を導くことが出来、高い精度と頑健性を有する優れた方法であることが確認出来た。このことから本試験法は、適合性、実用性、信頼性及び目的適合性の事項に対し、妥当性が確認されたと判断された。試験実施者から指摘のあった項目の内、1, 2, 4 については、実験条件を変更することで、容易に解決が可能であると思われる。また、6 については、今後の検討課題にすべきと考えている。

## 結論

今回、妥当性試験を行った PCR-RFLP 法による朮類生薬の鑑別法は、現行のものに比べ、操作が簡便かつ、頑健性の高い方法であることが示された。

## 謝辞

本研究は、厚生労働省政策創薬総合研究事業により行われたものであり、関係各位に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition (Ministry Notification No. 285 of Mar. 31, 2006), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 2) Goda Y., *Pharm. Regul. Sci.*, **37**, 801-813 (2006).
- 3) Shaw P. C., Wang J., But P. P.-H. ed., "Authentication of Chinese medicinal materials by DNA technology", World Scientific Publishing, Singapore. 2002.
- 4) The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition, Supplement 1 (Ministry Notification No. 316 of Sep. 28, 2007), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 5) Takeda O., Miki E., Morita M., Okada M., Lu Y., He H.S., He S.A., *Planta Med.*, **62**, 444-449 (1996).
- 6) Nakai Y., Yano K., Shiba M., Kondo K., Takeda O., Sakakibara I., Terabayashi S., Takeda S., Okada M., *J. Jpn. Bot.*, **81**, 63-74 (2006).
- 7) Terabayashi S., Miki E., Takeda O., Okada M., Lu Y., He H.S., He S.A., *J. Jpn. Bot.*, **72**, 238-248 (1997).
- 8) Takeda O., Miki E., Terabayashi S., Okada M., Lu Y., He H.S., He S.A., *Yakugaku Zasshi*, **115**, 543-552 (1995).
- 9) Shiba M., Kondo K., Miki E., Yamaji H., Morota T., Terabayashi S., Takeda S., Sasaki H., Miyamoto K., Aburada M., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 315-320 (2006).
- 10) Guo Y., Kondo K., Terabayashi S., Yamamoto Y., Shimada H., Fujita M., Kawasaki T., Maruyama T., Goda Y., Mizukami H., *J. Nat. Med.*, **60**, 149-156 (2006).
- 11) Notification for the analytical method of the foods produced by recombinant DNA techniques (provisional translation from Japanese original)(Shoku-Hatsu no. 110 of Mar. 27, 2001; revision, Shoku-An-Hatsu no. 0629002 of Jun. 29, 2006), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 12) Kondo K., Shiba M., Yotsuyanagi Y., Nishimura N., Maruyama T., Goda Y., *J. Jpn. Bot.*, **84**, 356-359 (2009).