動物生薬の指標成分の探索 (第6報)
DNA 分析による製剤中の鹿茸の確認法

橋本品夫,* 西村信幸, 西 博行, 国仙谷良男
田辺製薬株式会社分析研究所

Study on the “Signal” Constituents for the Evaluation of Animal
Crude Drugs. VI. The Identification Method of Cervi
Parvum Cornu in Medicines Using DNA Analysis

Akio HASHIMOTO,* Nobuyuki NISHIMURA, Hiroyuki NISHI,
and Yoshio KOKUSENYA

Analytical Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
16-89, Kashima 3-chome, Yodogawa-ku,
Osaka 532-0031, Japan

(Received July 31, 1998)

Cervi Parvum Cornu has been widely used as an agent in commercially available tonic medicines. The establishment of the method for the identification of each agent, especially crude drugs in formulations, is very important from the viewpoint of the quality control of drugs. In this paper, we reported the examination on the extraction method of DNA from the formulations, and also on the PCR method using four sets of primers, amplifying the DNA fragments of the regions of 12S rRNA and/or cytochrome *b* genes. The same size of DNA fragments as in the Cervi Parvum Cornu reference sample were found in all PCR products obtained from four commercial tonic medicines investigated. Therefore, it was confirmed that Cervi Parvum Cornu was contained in all the tonic medicines used. The PCR method was found to be a useful method for the identification of Cervi Parvum Cornu in tonic medicines and the DNA fragments amplified by the PCR method was clarified to be also helpful materials as index constituents for Cervi Parvum Cornu.

Key words—Cervi Parvum Cornu; 12S rRNA; cytochrome *b*; PCR; quality control; formulation

鹿茸は古来強壯薬として利用されており、現在でも多くの市販強壯保健薬に有効成分の1つとして配合されている。これら鹿茸配合製剤の品質評価及び品質確保のためには、製剤中の鹿茸の確認方法を確立することが重要である。現在までに鹿茸の成分としてはコラーゲン、リン酸カルシウム、タンパク質、アミノ酸、有機酸及び核酸塩基類などが報告されている。¹⁻⁵⁾しかし、これら動物に一般的な成分の含量は動物生薬により特徴的なパターンを示すものの、これら成分の分析により複数の生薬、あるいは生薬エキスを配合している製剤中の鹿茸を確認することは困難である。動物生薬の指標成分に関する一連の研究において、鹿茸のDNA分析を行い、PCRにより増幅されたDNA断片の比較により鹿茸と他の生薬との識別が可能であることを見出した。⁶⁾

今回は、複数の生薬やビタミン剤が配合されている市販強壮保健薬を対象として、DNA 分析による製剤中の鹿茸の確認について検討を行った。

実 験 の 部

1. 試料

鹿茸は日本粉末薬品(株)から入手した下記の2検体を使用した。馬鹿茸 (CE): 中国産-日本市場品1検体, 花鹿茸 (CN): 中国産-日本市場品1検体。なお、これら検体中の DNA の存在, PCR により増幅された DNA 断片の再現性及び DNA シーケンスについては既報のとおりであり、鹿茸の標準試料として使用出来るものである。⁶⁾ 鹿茸配合強壮保健薬4種類(丸剤2種類及び錠剤2種類)は、いずれも市販品を購入した。Table 1 に検討に用いた鹿茸配合製剤の生薬エキス類の処方量を示す。なお、これらの製剤では鹿茸は粉末の形態で含有されており、製剤 No. 3 及び 4 には生薬エキス以外の有効成分として、塩酸アルギニン、塩化カルニチン、ビタミン B₂ 酪酸エステル、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、ビタミン C など 12 種類のビタミン類及び 5 種類のカルシウム塩類のいずれか数種が配合されている。

2. 試薬及び装置

試薬及び装置は文献 6 に記載したものに加え、セントリコン 100 [グレースジャパン(株)アミコン事業部] を使用した。

3. 方法

3-1. 製剤からの DNA の抽出方法 鹿茸 10 mg に相当する量の製剤をとり、TE 溶液 (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0) 8 ml, 3 mol/l 酢酸ナトリウム 2 ml 及び 2-プロパノール 10 ml を加え、緩やかに振とうした後、3000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を除いた。さらに、残留物に TE 溶液 8 ml, 3 mol/l 酢酸ナトリウム 2 ml 及び 2-プロパノール 10 ml を加え、振とう及び遠心分離し、上澄液を除く操作を 2 回繰り返した。次に、残留物に TE 溶液 10 ml を

Table 1. The Composition of Tonic Medicines^{a)}

Content ^{b)}		Tonic Medicines ^{c)}			
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
Crude drug	Cervi Parvum Cornu	3 mg	1.0 mg	10 mg	10 mg
	Moschus	1 mg	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}
	Bufonis Venenum	3 mg	3.5 mg	— ^{d)}	— ^{d)}
	Bezoar Bovis	2 mg	2.5 mg	— ^{d)}	— ^{d)}
	Fel Ursi	1 mg	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}
	Ginseng Radix	3 mg	5.0 mg	— ^{d)}	— ^{d)}
	Margarita	2 mg	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}
	Aquilariae Lignum	4 mg	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}
Extract	Eucommiae Cortex	— ^{d)}	— ^{d)}	600 mg	— ^{d)}
	Ginseng Radix	— ^{d)}	— ^{d)}	600 mg	600 mg
	Fel Bovis	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}	665 mg
	Polygonum Multiflorum Radix	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}	300 mg
	Epimedium Herba	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}	500 mg
	Allii Sativi Bulbus	— ^{d)}	— ^{d)}	— ^{d)}	5000 mg
Unit		4 pills	4 pills	4 tablets	4 tablets

a) mg (corresponding weight as crude drug)/unit, b) From Namba's writing "Illustration of Wakan-Yaku¹⁾", except Fel Bovis and Allii Sativi Bulbus, c) No. 1: pills of company A, No. 2: pills of company B, No. 3: tablets of company C, No. 4: tablets of company D, d) not contained.

加え、緩やかに振とうした後、3000回転で10分間遠心分離し、上澄液を除いた。さらに、TE溶液10 ml ずつを用いて、上澄液を除く操作を2回繰り返した。残留物に0.5 mol/l EDTA (pH 8.0) 7 ml, 10% SDS 0.5 ml, 及び10 mg/mlのプロテイナーゼ K のTE溶液0.5 mlを加えた後、時々穏やかに振り混ぜながら、40℃で20時間

加温した。加温後は文献6に従って除タンパク及び限外ろ過濃縮を行い、TE溶液により全量を0.5 mlとし、DNA原液を調製した。ただし、限外ろ過濃縮はセントリコン100 (分子量100000以下をカットする)を用いて行った。

別に鹿茸0.05 gをとり、製剤と同様に操作して、原生薬からDNA原液を調製した。ただし、全量は2.5 mlとした。

3-2. PCR PCRで用いたプライマーの組み合わせをTable 2に示す。各プライマーの組み合わせで増幅が期待される鹿茸のDNA断片の大きさは次のとおりである。P-1: 164 塩基対長, P-2: 457 塩基対長, P-3: 177 塩基対長, P-4: 376 塩基対長。^{6,7)} なお、P-1によるDNA断片はP-2の一部であり、P-3によるDNA断片はP-4の一部となる。

鹿茸及び製剤 No. 1 及び 2 ではDNA原液を10倍希釈したものを、製剤 No. 3 及び 4 ではDNA原液をそのままPCR用のDNA溶液として、文献6に従ってPCRを行い、電気泳動用DNA溶液を調製した。

3-3. 電気泳動 電気泳動用DNA溶液につき、文献6図2bに記載した条件で電気泳動を行い、文献6に従ってゲルの染色及び観察を行った。

Table 2. The Sets of Primers

No.	Gene region	Primers
P-1	12S rRNA	L1373, H1478
P-2	12S rRNA	L1091, H1478
P-3	Cytochrome <i>b</i>	L14841, H14958
P-4	Cytochrome <i>b</i>	L14841, H15149

結 果 及 び 考 察

1. 生薬製剤からのDNA抽出

Fig. 1 に示す鹿茸原生薬からのDNAの抽出方法に従って、各種製剤からDNAを抽出し、

Fig. 1. DNA Extraction from Cervi Parvum Cornu

Fig. 2. DNA Extraction from Tonic Medicines

PCRを行った。⁶⁾ その結果、生薬のみが配合された製剤 No. 1 及び 2 から抽出された DNA 溶液は無色澄明であった。これらの DNA 溶液を用いた PCR の結果、増幅が期待される DNA 断片が良好に認められ、これらの製剤からは Fig. 1 の鹿茸からの抽出方法により良好に PCR 用の DNA 溶液が調製できることが分かった。

一方、生薬エキス、ビタミン類、製剤化原料などが配合された製剤 No. 3 及び 4 から抽出された DNA 溶液は薄い褐色を呈した。これらの溶液を直接 PCR に用いたところ DNA 断片が増幅されず、10 倍希釈液を PCR に用いた場合で DNA 断片がわずかに認められた。

以上より、製剤 No. 3 及び 4 の DNA 溶液には、生薬エキスなどに由来する PCR 阻害物質が含有されていると考えられたため、これらの除去について検討を行った。その結果、2-プロパノールと TE 溶液の混液及び TE 溶液を用いて製剤からの PCR 阻害物質の除去を行った後、DNA の抽出を行う方法を考案した。考案した製剤からの DNA 溶液の調製法を Fig. 2 に示す。

2. 生薬製剤中の鹿茸の確認

P-1 及び P-2 は、生物種により長さが異なることが知られている 12S rRNA 遺伝子領域の DNA 断片を増幅するプライマー対である。実際に、鹿茸、反鼻、海馬及び地竜から抽出した DNA 溶液について P-1 及び P-2 を用いて PCR を行った場合、両プライマー対により増幅された各生薬の DNA 断片の長さはいずれも異なった。すなわち、両プライマー対により増幅された DNA 断片の長さを比較することにより、これら動物生薬の識別が可能であることが分かった。⁶⁾ 一方、P-3 及び P-4 は、cytochrome (cyt.) *b* 遺伝子領域の DNA 断片を増幅するプライマー対であり、上記 4 種類の動物生薬で P-3 及び P-4 により DNA 断片が増幅されたのは鹿茸のみであった。⁶⁾

以上より、これら 4 組のプライマー対を用いて増幅された DNA 断片の比較を行うことにより、鹿茸、あるいは鹿茸を含む複数の動物生薬が配合された製剤中に鹿茸が含まれているかどうかの判定が可能と考えられる。

Fig. 3. PCR Products of Cervi Parvum Cornu and Tonic Medicines

a: PCR products by P-1, b: PCR products by P-2, c: PCR products by P-3, d: PCR products by P-4, M: 100 b.p. ladder marker, C: Control, 1: CE, 2: CN, 3: Medicine No. 1, 4: Medicine No. 2, 5: Medicine No. 3, 6: Medicine No. 4.

Fig. 3 に P-1—4 を用いて PCR を行った結果を示す. いずれの製剤にもこれらプライマーにより増幅された DNA 断片がそれぞれ 170, 460, 180 及び 380 塩基対付近に認められ, これらは鹿茸原生薬から得られた DNA 断片の長さと同じ長さであった. すなわち, すべての製剤において上記 4 種類のプライマー対を用いる PCR により鹿茸と同一塩基対長の DNA 断片が増幅されたことになり, 上記 4 製剤中に鹿茸が配合されていることが確認された.

なお, P-4 を用いる PCR では, 馬鹿茸と製剤 No. 2 に約 500 塩基対の DNA 断片が認められた. この DNA 断片は cyt. b 遺伝子領域以外の DNA 断片であり, その本質については不明であるが, 花鹿茸では認められないことから, 製剤 No. 2 の原料として馬鹿茸が用いられていることが示唆された.

結

論

市販の鹿茸配合強壮保健薬 4 種類を対象として, 生薬製剤からの DNA の抽出方法を検討した. 確立した手法により DNA を抽出し, 12S rRNA 及び cyt. b 遺伝子領域の DNA 断片を増幅するプライマー対を用いる PCR を行った結果, いずれの製剤からも鹿茸と同一塩基対長の DNA 断片が増幅され, 今回検討した 4 製剤すべてに鹿茸が配合されていることが確認できた. すなわち, 製剤及び鹿茸から抽出した DNA をテンプレートとして, 今回用いた 4 種類のプラ

イマー対を用いる PCR により増幅された DNA 断片を比較する方法は製剤中の鹿茸を確認するために有効であることが分かった。DNA は起源とする動物種により異なることが知られていることから、本法は鹿茸以外の動物組織を起源とする動物生薬に対しても有効であると考えられ、PCR により増幅された DNA 断片は動物生薬の指標成分として有効であることが分かった。

引 用 文 献

- 1) 難波恒雄 “原色和漢薬図鑑 (下),” 保育社, 大阪, 1980, pp. 279—283.
- 2) 山崎一矢, 橋本晶夫, 国仙谷良男, 宮本尚明, 松尾賢明, 佐藤忠司, *Natural Medicines*, **48**, 53—57 (1994).
- 3) Hashimoto A., Yamasaki K., Kokusenya Y., Miyamoto T., Sato T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1636—1641 (1994).
- 4) Hashimoto A., Yamasaki K., Kokusenya Y., Miyamoto T., Nakai H., Sato T., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2195—2199 (1995).
- 5) Hashimoto A., Nakamura T., Kokusenya Y., Nakai H., Sato T., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 487—491 (1997).
- 6) Hashimoto A., Nishimura N., Kokusenya Y., Nakai H., Sato T., *Natural Medicines*, **52**, 38—46 (1998).
- 7) Chikuni K., Mori Y., Tabata T., Saito M., Monma M., Kosugiyama M., *J. Mol. Evol.*, **41**, 859—866 (1995).