

16. 遺伝子情報に基づいた健康食品に含有される

Cassia 属植物の鑑別法

○神山 恵理奈 (岐阜県保健環境研究所)

【研究目的】

いわゆる健康食品から医薬品成分が検出される事例が報告されており、原材料表示と製品内容物の整合性を確認することにより、適正な製品の流通を図ることが求められている。ハネセンナは、痩身効果を目的とする健康食品に用いられる植物であるが、近縁種である生薬センナの果実等は食品への使用は禁止されている。本研究では、ハネセンナと生薬センナのDNAの塩基配列の違いを解析し、それに基づいた鑑別法を検討した。

【研究の必要性】

健康食品は、健康志向の高まりから広く利用されているが、その効果を高めるために違法に医薬品成分やその類似成分を配合した製品（無承認無許可医薬品）が流通し、健康被害を及ぼす事例が後を絶たない。我々は、このような不適正事例を排除し、健康食品を利用する県民の安全性を確保するために、県内に流通する健康食品の成分検査を実施している。下剤、便秘薬等の医薬品に用いられる生薬であるセンナ (*Cassia angustifolia* または *Cassia acutifolia*) は、瀉下作用を有するセンノシドを含有しており、その果実、小葉、葉柄、葉軸は「医薬品の範囲に関する基準」に基づく食薬区分により食品への使用が禁止されている¹⁾。一方、センナと近縁の植物であるハネセンナ（学名 *Cassia alata*、別名 キャンドルブッシュ、ゴールデンキャンドルとも呼ばれる）は、センナと同様にセンノシドを含有するが、医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断されないため、食品に使用することができる。このため、ハネセンナを原材料に含む痩身効果を目的としたダイエット茶等の健康食品が多数市販されている。しかし、製品に含有される化合物を検出する成分検査では、センノシドを検出することはできるが、植物原材料を判別することは不可能である。そのため、鏡検によるセンナの形態学的な鑑別方法²⁾やセンノシド以外の植物成分を指標とする識別法³⁾が検討されている。

近年、植物の近縁種間において、核ゲノム上のITS (internal transcribed spacer) 領域や葉緑体ゲノム上の *rbcL* 領域の塩基配列に違いがあることが明らかにされ、植物種の鑑別に利用可能であることが示されている⁴⁾。日本薬局方にも「遺伝子情報を利用する生薬の純度試験」としてITS領域の遺伝子配列に基づくビャクジュツ中のソウジュツの純度試験法が掲載されている⁵⁾。そこで本研究では、センナおよびハネセンナのDNAに基づいて種を鑑別する方法を検討した。

【研究計画】

- 1) センナおよびハネセンナの ITS 領域および *rbcL* 領域の塩基配列の決定、比較解析
- 2) PCR-RFLP (制限酵素断片長多型) 法による鑑別法の検討
- 3) 種特異的プライマーの設計
- 4) 製品における PCR 実証試験

【実施内容・結果と考察】

- 1) センナおよびハネセンナの ITS 領域および *rbcL* 領域の塩基配列の決定

凍結後細切したセンナおよびハネセンナの小葉約 50 mg を量りとり、DNeasy Plant Pro Kit (キアゲン) を用いてゲノムDNAを抽出・精製した。得られたDNAを鋳型として核ゲノム上のITS領域および葉緑体ゲノム上の*rbcL*領域をPCRにより増幅した。ITS領域増幅用プライマー (ITS5a forward : 5'-CCTTATCATTAGAGGAAGGAG-3' / ITS4 reverse : 5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3') および*rbcL*領域増幅用プライマー (*rbcLa-F* : 5'-ATGTCACCA CAAACAGAGACTAAAGC-3' / *rbcLa-R* : 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3') の配列は既報を参考とした^{6),7)}。増幅産物はNucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用いてアガロースゲルから抽出・精製した後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。決定したITS領域 692 bp の塩基配列を比較したところ、センナはハネセンナに対して 33 塩基の置換、2 塩基の挿入、1 塩基の欠損が確認された。一方、*rbcL*領域 513 bp におけるセンナとハネセンナ間の塩基配列の違いは、4 塩基の置換のみであった。すなわち、センナとハネセンナ間の塩基配列の同一性は、ITS領域では 94.7%、*rbcL*領域では 99.2% であった。この結果から、センナとハネセンナの鑑別には*rbcL*領域よりもITS領域を用いる方が適していると考えられた。

- 2) PCR-RFLP 法による鑑別

ITS 領域の塩基配列における制限酵素認識部位を確認したところ、センナには *ApaLI* 認識部位が、ハネセンナには *SphI* 認識部位があり、これらの制限酵素により PCR 産物を処理して電気泳動パターンを比較することで、センナとハネセンナを鑑別できる可能性が示唆された。そこで、ITS 領域増幅用プライマーによる PCR 産物約 750 bp を前述の 2 種の制限酵素でそれぞれ処理して、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を確認した。その結果、期待したとおりのサイズの DNA 断片が確認され、センナとハネセンナの間で電気泳動パター

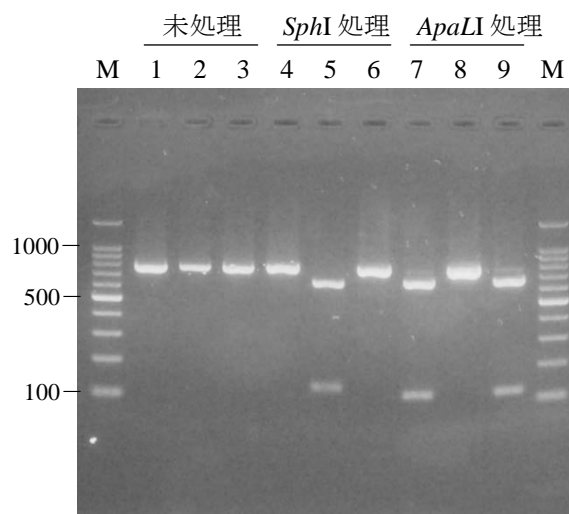


図1 PCR産物の制限酵素処理断片
lane 1, 4, 7 : センナ
lane 2, 5, 8 : ハネセンナ
lane 3, 6, 9 : 日本薬局方センナ
M : 100 bp DNA ladder

ンに違いが認められた (図 1)。市販の日本薬局方センナから抽出した DNA を鋳型として用いた PCR 産物においてもセンナと同一の電気泳動パターンが確認された。この結果から PCR-RFLP 法によりセンナとハネセンナを鑑別できることが示された。

3) 種特異的プライマーの設計

PCR-RFLP 法は、植物原材料が 1 種類の場合や単一の植物片から DNA を抽出できる場合には有効であるが、複数種の植物が混合されている場合には適さない。そこで、センナおよびハネセンナの種特異的プライマーの設計を試みた。決定したセンナおよびハネセンナの ITS 領域塩基配列に基づいてそれぞれに特異的なプライマーセットを設計し、PCR によりその特異性を確認した。その結果、表 1 に示すプライマーおよび以下の PCR 条件によりセンナおよびハネセンナの ITS 領域の一部を特異的に増幅することができた (図 2A, B)。PCR 条件は、94℃で 5 分間保持した後、94℃ 25 秒、58℃ 30 秒、72℃ 45 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅し、次に 72℃で 7 分間保持した。なお、ハネセンナ特異的プライマーによる PCR では、アニーリング温度を 63℃とした。

表 1 特異的プライマーの配列

増幅領域	プライマー名	配列 (5' →3')	増幅産物 (bp)
センナ ITS	Senna ITS F	TGCATTGCCTCGAGTCCCTA	402
	Senna ITS R	ACCTCATCGCCTCCGGTTG	
ハネセンナ ITS	Hanesenna ITS F	AGAGCCTGTGAGGGGCAATC	128
	Hanesenna ITS R	TCGCGTTGGGAGCACTTACT	

4) 製品における PCR 実証試験

設計したプライマーの実用性を確認するため、表 2 に示す市販のティーバッグタイプの健康食品 6 製品 (S1~S6) を用いて PCR 実証試験を行った。各製品のティーバッグ内容物から前述と同様の方法で DNA を抽出・精製した。まず、得られた DNA の鋳型としての適性を確認するため、ITS 領域増幅用プライマー用いて PCR を行った。その結果、抽出した DNA 溶液をそのまま PCR に用いた場合には、電気泳動において PCR 産物が確認できないものがあつた。DNA 溶液中に含まれる夾雑物による PCR 阻害が考えられたため、DNA 溶液を 10 倍希釈して PCR に用いたところ、いずれの製品においても増幅が確認された。次に、表 1 に示す特異的プライマーを用いてそれぞれ PCR を行った結果、原材料名にセンナが表示されていた S3 および S4 では、センナ特異的プライマーにより 402 bp 程度のバンドが確認された (図 2A)。また、原材料名にハネセンナが表示されていた S1~S4 の 4 製品ではハネセンナ特異的プライマーにより 128 bp 程度のバンドが確認された (図 2B)。原材料名にセンナ及びハネセンナの表示のない製品では PCR でも検出されず、いずれの製品も原材料表示と PCR 結果の整合性が取れていた。この結果から、本研究で設計したプライマーを用いた PCR 法により、製品中に含有されているセンナとハネセンナを鑑別できることが示された。

表 2 実証試験に用いた製品の概要

製品 No.	名称	原材料名	
		センナの表示	ハネセンナの表示 ^{a)}
S1	ブレンド茶	なし	あり
S2	混合茶	なし	あり
S3	はぶ茶混合茶	あり	あり
S4	センナ太茎混合茶	あり	あり
S5	後発酵茶	なし	なし
S6	野草混合茶	なし	なし

a) ハネセンナの表示にはキャンドルブッシュ、カッシーア・アラタの表記を含む。

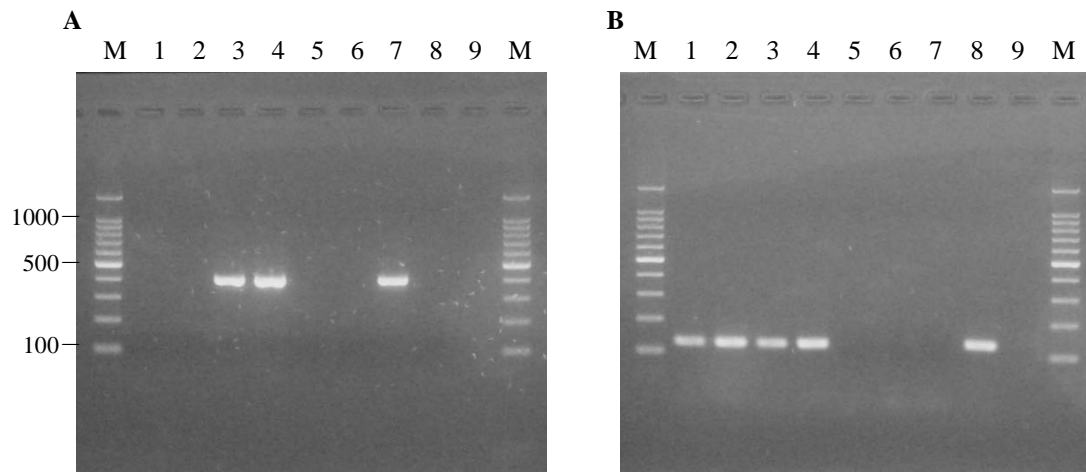


図2 製品および植物標本における PCR 増幅産物の検出

(A) センナ特異的プライマーによる PCR 増幅産物

(B) ハネセンナ特異的プライマーによる PCR 増幅産物

lane 1 : S1, lane 2 : S2, lane 3 : S3, lane 4 : S4, lane 5 : S5, lane 6 : S6, lane 7 : センナ,
lane 8 : ハネセンナ, lane 9 : negative control (滅菌水), M : 100 bp DNA Ladder

【今後の課題】

本研究では、センナおよびハネセンナの ITS 領域および *rbcL* 領域の塩基配列の違いを明らかにし、ITS 領域の違いに基づいた種の鑑別法を検討した。製品に含まれる植物種が単一の場合は、ユニバーサルプライマーを利用した PCR-RFLP 法により鑑別が可能であった。複数の植物が含まれる製品の場合は、種特異的プライマーによる PCR 法により、健康食品中のセンナあるいはハネセンナの ITS 領域を特異的に増幅することができた。本研究では、センナとハネセンナの鑑別に焦点を絞ったが、*Cassia* 属植物はこれら以外の種も存在し、海外の製品にはハネセンナ以外の *Cassia* 属植物が原材料として使われているものがある。本研究で設計したプライマーの特異性について、これらの近縁種も含めてさらに検討する必要があると考えられる。

また、健康食品は、非常に多くの種類の原材料が使われていたり、製造過程で加熱、乾燥、粉碎等さまざまな加工が行われていたりするため、抽出した DNA は、夾雑物を含んでいる場合や、物理的損傷を受けている場合がある。本研究でも抽出した DNA 溶液をそのまま PCR に用いた場合に目的の PCR 産物が得られないことがあった。DNA 溶液の希釈により改善されたことから、夾雑物による PCR 阻害が原因と考えられた。PCR にはこう

した偽陰性の可能性があることをふまえて、純度の高い DNA を得るための抽出・精製方法、ポジティブコントロールの設定等を検討する必要がある。

【謝辞】

本研究にあたり、センナおよびハネセンナの植物標本試料をご提供いただきました内藤記念くすり博物館附属薬用植物園の関係者の皆様に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) 平成 30 年 4 月 18 日付け厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知薬生発 0418 第 4 号「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」
- 2) 鈴木幸子, 荒金眞佐子, 吉澤政夫, 北川重美, 塩田寛子, 岸本清子, 森 謙一郎, 荻野周三: 健康食品に配合される *Cassia* 属植物の鑑別 東京健安研七年報, 60, 91-96, 2009.
- 3) Takahashi M, Sakurai K, Fujii H, Saito K: Discrimination of *Cassia* plants in health tea. 日食化誌, 19, 149-154, 2012.
- 4) Linder CR, Moore LA, Jackson RB: A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology*, 9, 1549-1559, 2000.
- 5) 平成 28 年 3 月 7 日付け厚生労働省告示第 64 号 第十七改正日本薬局方, 2434-2437.
- 6) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, 315-322, 1990.
- 7) Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, Swenson NG, Perez R, Sanjur O, Bermingham E: Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 18621-18626, 2009.

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品	
DNA 抽出・精製キット (DNeasy Plant Pro Kit 他)	43,065 円
PCR 用酵素、制限酵素 (TaKaRa Ex Taq Hot Start Version 他)	54,285 円
オリゴ DNA (プライマー22 本)	21,296 円
電気泳動用試薬 (アガロース、エチジウムブロマイド溶液他)	91,773 円
その他消耗器材 (チューブラック、ニトリル手袋他)	70,573 円
受託 DNA シーケンス	19,008 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円