

が考えられる。また、同様に基材の影響を極力除外できる抽出法の検討や、指標成分の代わりに検出されたピークの分子量を特定し、それらの構造を推定する必要があると思われる。

#### E. 結論

昨年度に引き続き、欧州で購入したハマメリスヨウ製剤の市場品7種に、指標成分である没食子酸及びハマメリタンニンが含有されていることを確認するため、LC/TOF-MS を用いて分析した。薬草茶2種、薬草粉末カプセル剤、抽出液からは両指標成分を確認できた。丸剤、坐剤、ローションからは両指標成分とも検出できなかった。

#### F. 参考文献

Mayer, W., Kunz, W., Loebich, F., *Annalen*, **688**, 232-238 (1965).

Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., *J. Chromatograph.*, **281**, 263-271 (1983).

Schultz, H., Albrosheit, G., *J. Chromatograph.*, **442**,

353-361 (1988).

G. 健康危険情報  
特になし。

#### H. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

田口貴章、市瀬浩志、花尻瑠理、合田幸広 「ハマメリスヨウのタンニン関連成分の分析」日本生薬学会第52回年会 (2005年9月、金沢) (ポスター発表)

I. 知的所有権の取得状況  
特になし

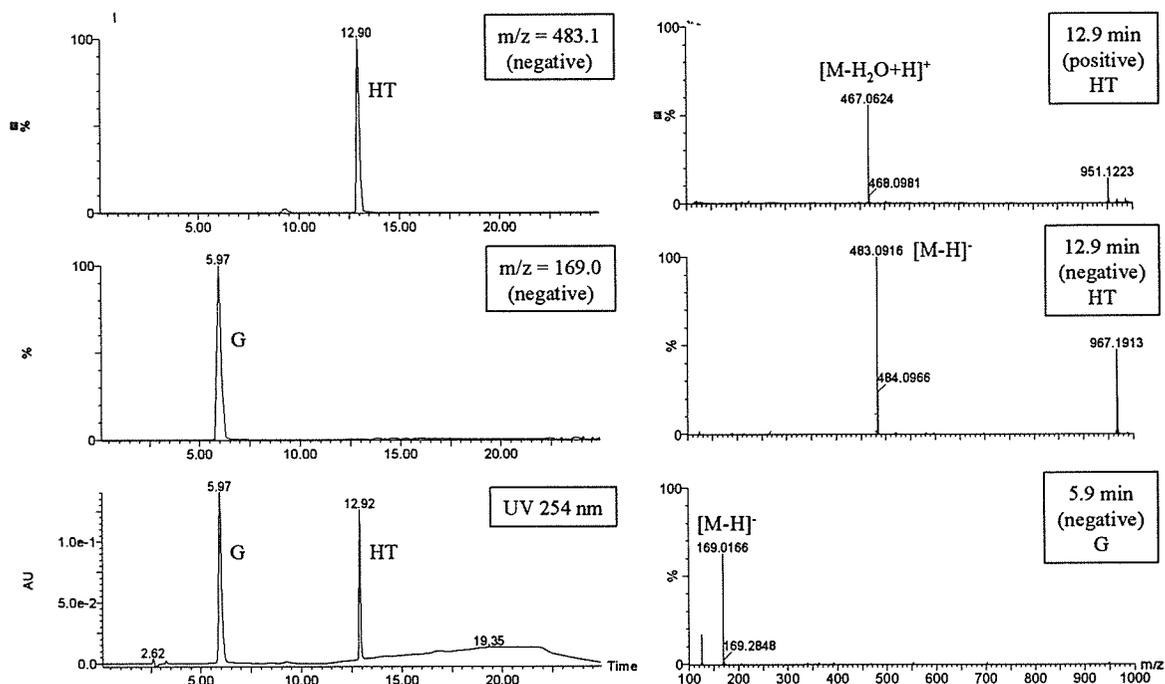


図1 指標成分（没食子酸、ハマメリタンニン）の分析結果

左列上から  $m/z = 483.1$  (negative ion) の selected ion chromatogram (SIC)、 $m/z = 169.0$  (negative ion) の SIC、紫外 254 nm 吸光の chromatogram。G は没食子酸、HT はハマメリタンニン。右列は全て MS スペクトル。上からハマメリタンニン (positive)、ハマメリタンニン (negative)、没食子酸 (negative)。

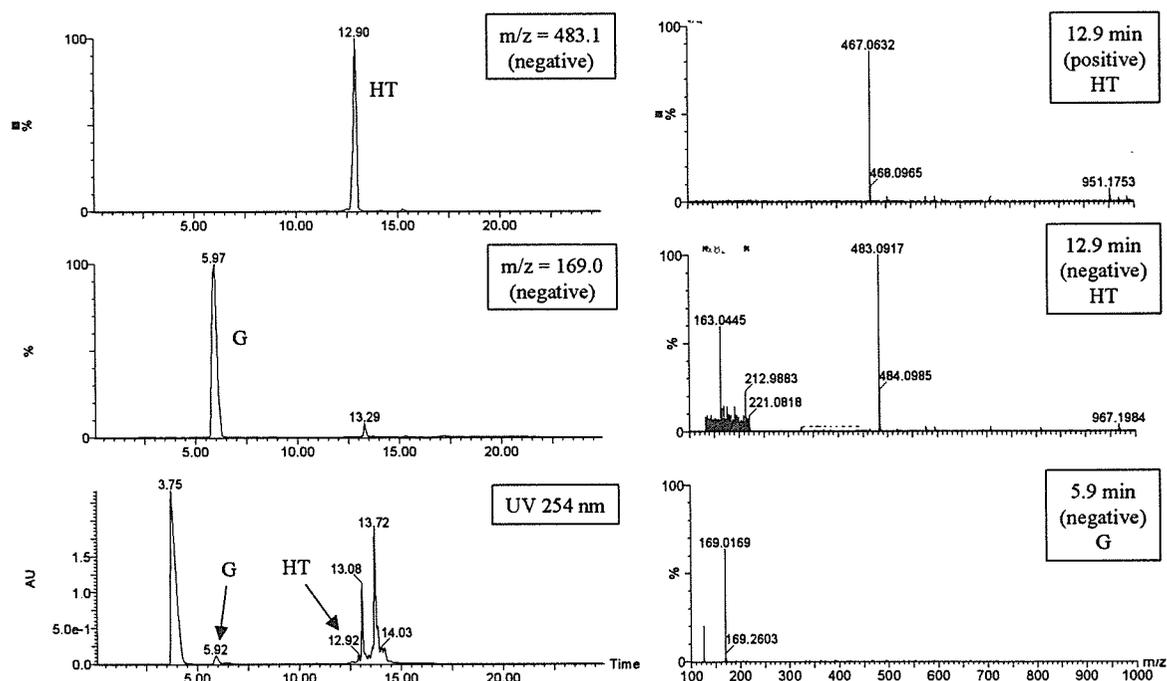


図2 市場品#7（薬草茶）の分析結果（配列は図1と同じ。）

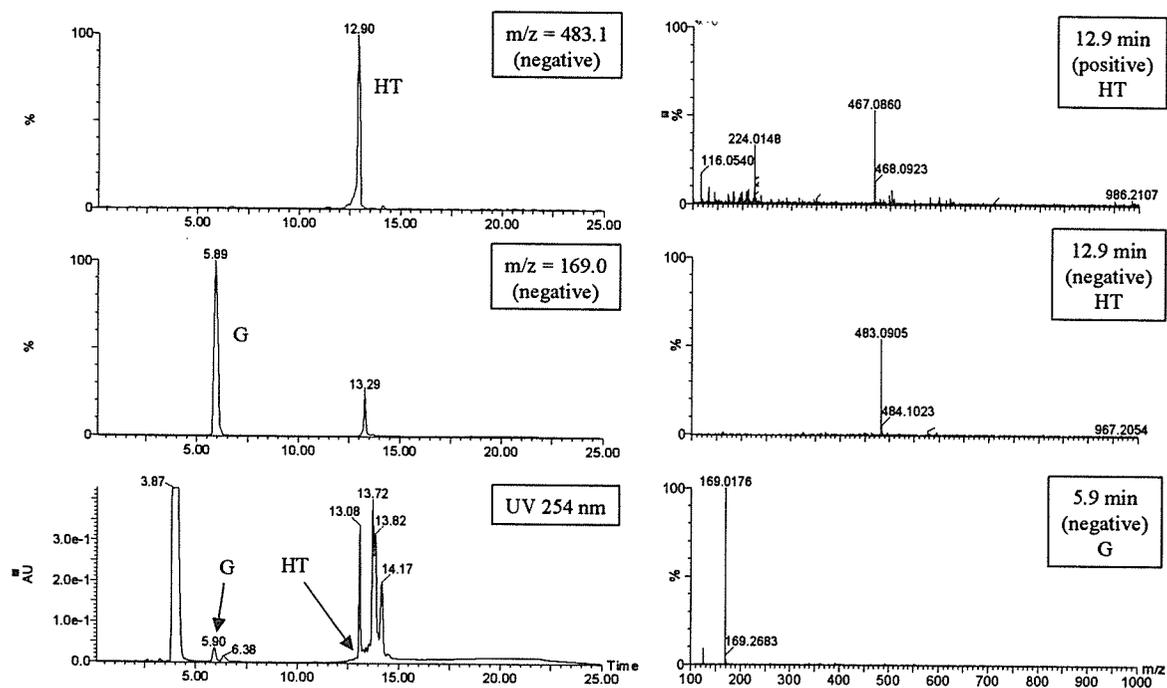


図3 市場品#8 (薬草茶) の分析結果 (配列は図1と同じ。)

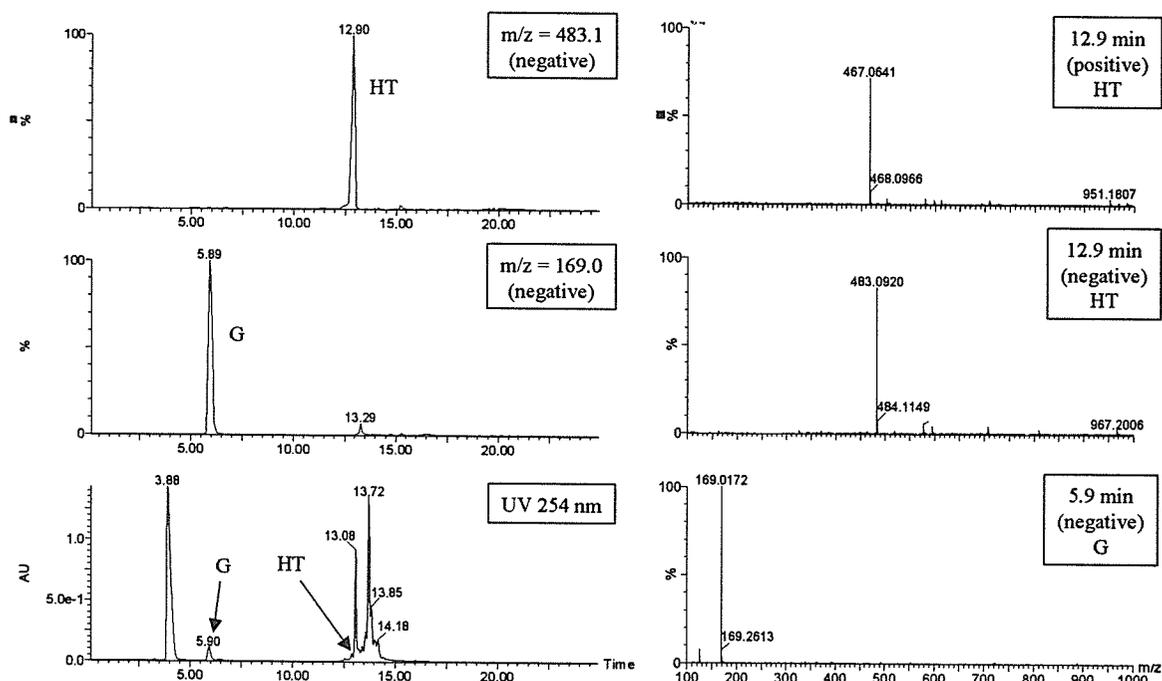


図4 市場品#11 (薬草粉末カプセル剤) の分析結果 (配列は図1と同じ。)

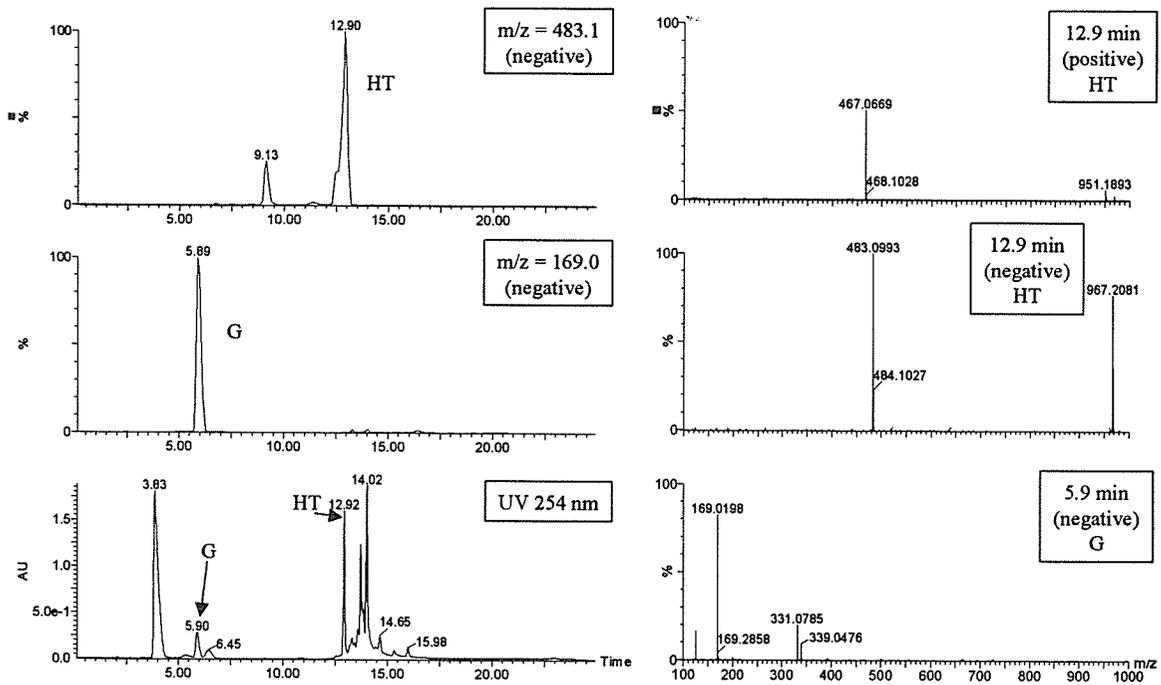


図5 市場品#12 (抽出液) の分析結果 (配列は図1と同じ)

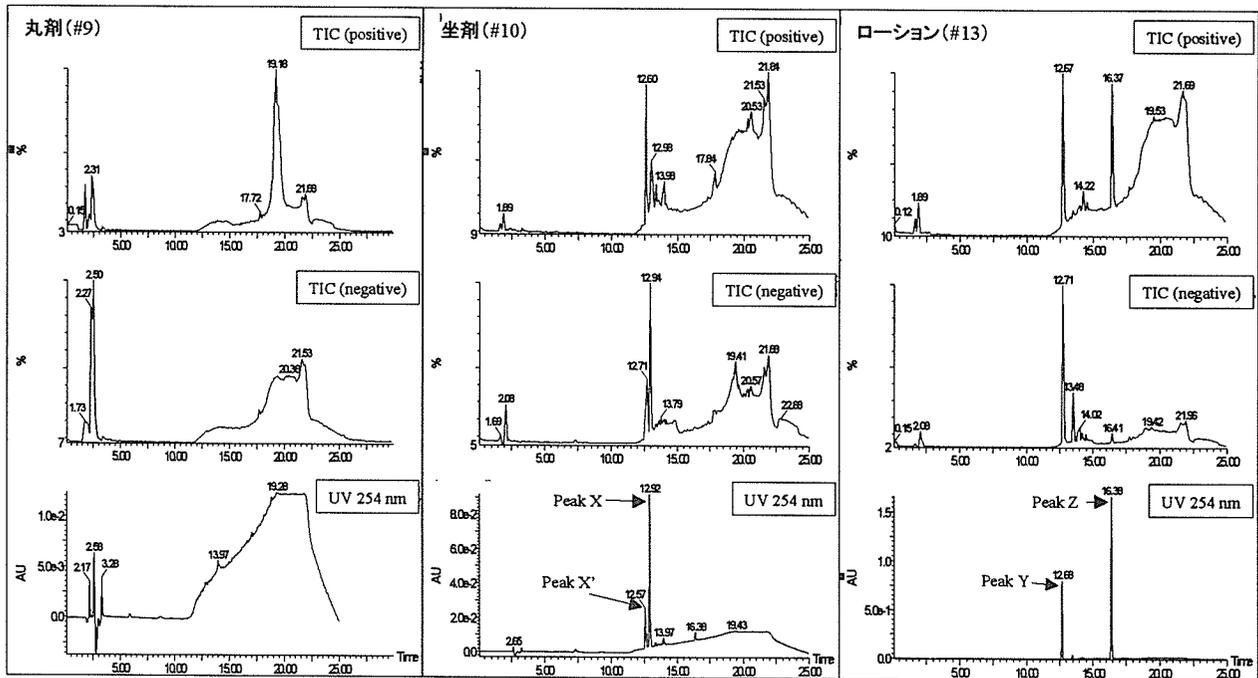


図6 市場品#9 (丸剤) #10 (坐剤) #13 (ローション) の分析結果

各カラムとも、上段は positive ion の total ion chromatography (TIC)、中段は negative ion の TIC、下段は UV 254 nm 吸光のクロマトグラム。

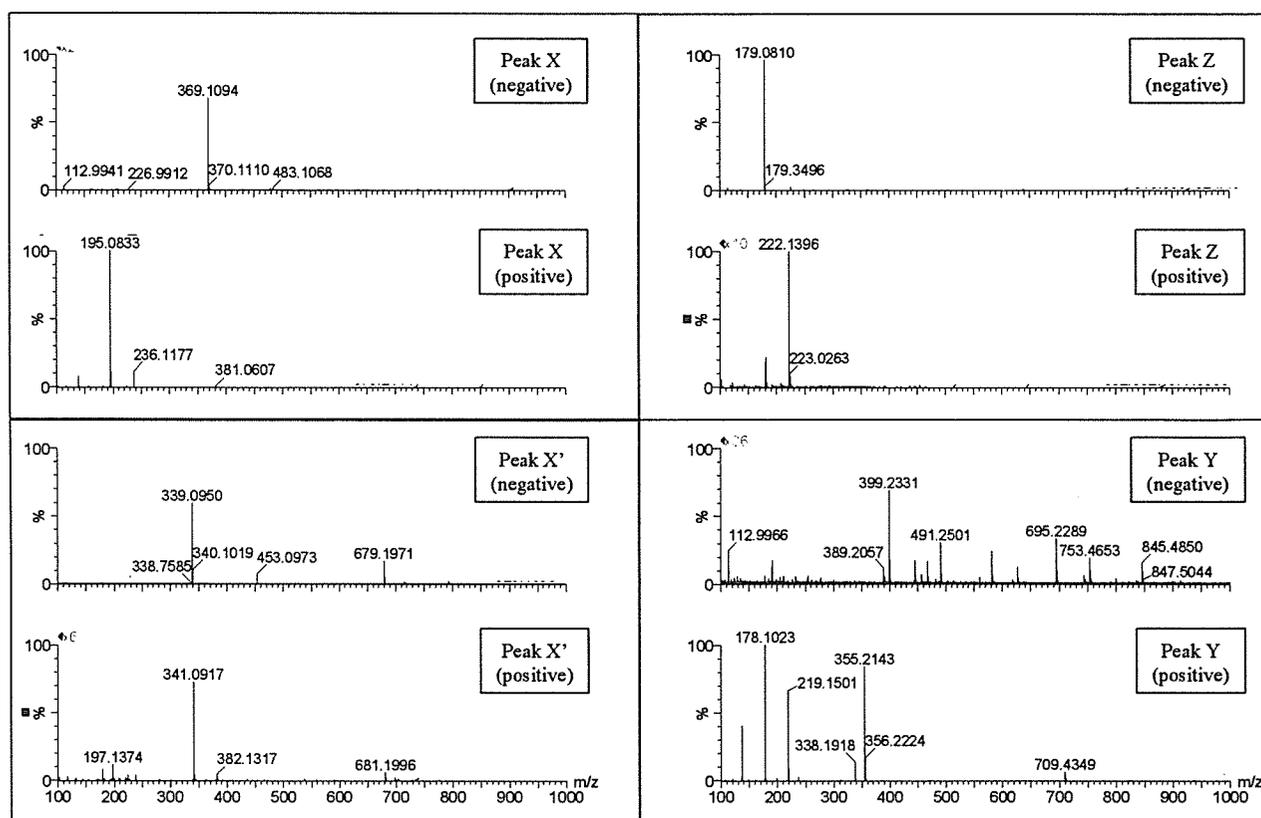


図7 市場品#10, #13 から検出された peak X, X', Y, Z の MS スペクトル

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題：諸外国における未承認医薬品及びハーブ等に関する研究

分担研究者：花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

－ガウクルア (*Pueraria mirifica*) の活性成分の分析法について－

研究要旨 強力なエストロゲン活性を有する植物ガウクルア (*Pueraria mirifica*) について、活性成分の分析法の開発を行うと共に、本法を実際に市場に流通している製品分析に応用し、ガウクルア含有を標榜する製品中の活性成分の含有量を検討した。ガウクルア標準試料及び各製品について、酢酸エチルを用いて超音波下抽出した後、上清を膜ろ過して、Atlantis dC18 カラム (Waters 社製) を使用し、10 mM ぎ酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) 及びアセトニトリルのグラジエント条件下で HPLC 及び LC-MS 分析を行った。分析の結果、ガウクルア標準試料中から代表的なイソフラボン類とともに、エストロゲン活性を有する特異成分 miroestrol, deoxymiroestrol, kwakhurin 及び isomiroestrol が検出された。本法を実際の製品分析に応用した結果、17 製品中 8 製品から上記 4 成分が検出されたが、製品によってはこれら活性成分の含量が多く、これらの製品の大量摂取は、安全性の面で注意が必要であるものと考えられた。

A. 目的

ガウクルアは、タイ北部の森林地帯に自生する kwao keur (*Pueraria candollei* var. *mirifica* (Basionym: *P. mirifica*, Leguminosae)) と呼ばれる豆科植物の塊根を乾燥したもので、タイでは古くから若返りの薬として使われている。この植物の塊根から単離された miroestrol は、極めて強いエストロゲン様作用を有し、代表的な植物エストロゲン (phytoestrogen) である genistein や coumestrol の約 100~1000 倍、合成エストロゲンのスチルベストロール類に匹敵するといわれる<sup>1)</sup>。2000 年になって、千葉大学の研究者が、タイで採取した *P. mirifica* の塊根の抽出液についてエストロゲン様活性を指標として分離精製したところ、miroestrol (収量 0.002%) とともに、miroestrol の 14 位の水酸基を欠いた構造を有する deoxymiroestrol が得られた<sup>2)</sup>。Deoxymiroestrol のエストロゲン様活性は、*in vitro* の実験結果によると、対照として用いた 17β-エストラジオールの 1/150 程度であったが、

miroestrol の 10~100 倍であり、極めて強い活性を有する化合物であることが明らかとなった<sup>2)</sup>。一方、deoxymiroestrol の 14 位の水酸基は酸化を受けやすいことから、miroestrol は植物中にもともと存在していた化合物ではなく、抽出・分離の過程で deoxymiroestrol が空気酸化を受けて生成した人工産物であると考えられた。実際、deoxymiroestrol の溶液を放置しておく、miroestrol に加えて 7 位が酸化された isomiroestrol (エストロゲン作用を有しない) が生成することが示されている<sup>2)</sup>。また、これらの化合物以外にも、ガウクルアに特徴的な成分として、エストロゲン作用を有し、比較的含有量が多いイソフラボンの一種 kwakhurin も報告されている<sup>2)</sup>。近年では、美肌効果や豊胸作用を謳い、ガウクルア含有健康食品が数多く販売されている。また、ガウクルアは puerarin, daidzin, daidzein, genistein, coumestrol 等の代表的なイソフラボン、クメスタン類も豊富に含むことが知られており、それを売り文句にしたサプリメント

トとしても数多くの製品が販売されている。しかし、上述したとおり、本植物の主活性成分である miroestrol 及び deoxymiroestrol は強力なエストロゲン活性を有するため、安全性の観点から注意が必要であると考えられる。

本研究では、ガウクルアに特徴的な成分 deoxymiroestrol, miroestrol, isomiroestrol 及び kwakhurin、また、ガウクルアにおいて含有が報告されている代表的なイソフラボン類 puerarin, daidzin, daidzein, genistein 及び coumestrol に着目して、HPLC によるプロファイル分析法を検討すると共に、LC-MS による deoxymiroestrol, miroestrol 及び kwakhurin の定量分析法を検討した。さらに、本法を実際の製品分析に応用し、所謂健康食品中の含量を明らかにしたので報告する。

## B. 方法

### 1) 試料

*P. mirifica* 塊根標準試料（粉末）並びに miroestrol, isomiroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin の標準化合物 (*P. mirifica* 塊根より単離精製したものは千葉大学大学院薬学研究院石川勉教授よりご供与いただいた（図 1）。また、coumestrol (Fluka), daidzein (Fujicco), genistein (CALBIOCHEM), daidzin (Fujicco), puerarin (SIGMA) は、それぞれ試薬として購入したものを使用した（図 1）。ガウクルア 17 製品（粉末 3、カプセル 10、錠剤 4 製品）は、インターネットを通じて購入したものを使用した（表 1）。

### 2) プロファイル分析

*P. mirifica* 塊根標準試料もしくはガウクルア製品 100 mg をとり、酢酸エチル 1 mL と内部標準物質（エチルパラベン）溶液（5 µg/mL）20 µL を加え、超音波下 1 時間抽出し、抽出後 1500 rpm、5 min 遠心分離し上清を取った。その際、カプセル試料は内容物を、錠剤試料は乳鉢により粉碎したものを試料とした。残渣に 1 mL の酢酸エチルを加えよく混和して 1500 rpm、5 min 遠心分離し、

得られた上清を先の上清に加え、窒素気流下で蒸発乾固した（水浴 24°C）。乾固物に 25%アセトニトリル/10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液（pH 3）溶液 3 mL を加え、超音波にかけながら溶解した。13 K, 3 min で遠心分離して膜ろ過（amicon, Ultrafree-MC, 0.45 µm）を行い、プロファイル分析用試料とした。

### 3) 定量分析

上記と同様に調整した試料粉末 100 mg をとり、酢酸エチル 1 mL と内部標準物質（エチルパラベン）溶液（5 µg/mL）20 µL を加え、超音波下 1 時間抽出し、抽出後 1500 rpm、5 min 遠心分離し上清を取った。残渣に 1 mL の酢酸エチルを加えよく混和して 1500 rpm、5 min 遠心分離し、得られた上清を先の上清に加えた。一方、再び残渣に 1 mL のメタノールを加えよく混和し、超音波下 1 時間抽出した。抽出後 1500 rpm、5 min 遠心分離して上清を取り、酢酸エチル抽出液に加えた。また、残渣に 1 mL のメタノールを加えよく混和して 1500 rpm、5 min 遠心分離し、得られた上清を先の上清に加え、窒素気流下で蒸発乾固した（水浴 24°C）。乾固物に 25%アセトニトリル/10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液（pH 3）溶液 3 mL を加え、超音波にかけながら溶解した。13 K, 3 min で遠心分離して膜ろ過（amicon, Ultrafree-MC, 0.45 µm）を行い、定量用試料とした。定量値は、miroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin について、質量分析により、それぞれの疑似分子イオン（[M+H]<sup>+</sup>）m/z 357, m/z 341, 367 のピーク面積を測定し、内部標準物質エチルパラベンの m/z 165（[M+H]<sup>+</sup>）とのピーク面積比から算出した。

### LC-MS 条件

装置: LC/MSD-1100 series (Agilent)

カラム: Atlantis dC18

(2.0 x 150 mm, 5 mm; Waters)

カラム温度: 40°C

移動相: 10 mM Ammonium formate buffer

(pH 3.0) / CH3CN

90/10 (0 min) - 60/40 (50 min) - 30/70 (60-75 min)

流速: 0.2 mL/min, 注入量: 10  $\mu$ L

検出: フォトダイオードアレイ検出器

(プロファイル分析用測定波長 254 nm)

質量分析計 (定量分析用):

イオン化 ESI、ネガティブモード

Capillary voltage: 3.5 kV,

Fragmentation voltage: 80 V,

Drying gas:  $N_2$  (13 L/min, 350°C)

#### 4) 分析法バリデーション

検量線は、miroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin について、予備試験においてこれら化合物がまったく検出されなかった製品 3 の試料 100 mg に各化合物の標準溶液を 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0  $\mu$ g/g となるように加え、前述した方法で分析操作を行い、内部標準物質に対する薬物のピーク面積比から作成した。精度 (相対標準偏差) 及び回収率は 1.0, 20, 50  $\mu$ g/g の 3 濃度となるように試料を調製し、分析法の全操作を各濃度 3 回ずつ繰り返し測定した結果から評価した。

### C. 結果及び考察

#### 1) プロファイル分析

各標準化合物の LC-MS 分析条件を検討したところ、実験方法に記載してある条件で最も良好に分離し、各化合物の疑似分子イオン  $[M-H]^-$  が強く観測された。各化合物の LC 保持時間は、1. puerarin 14.7 min (0.38), 2. daidzin 19.3 min (0.50), 3. isomiroestrol 20.0 min (0.52), 4. miroestrol 26.1 min (0.68), 5. deoxymiroestrol 33.3 min (0.86), 6. daidzein 35.4 min (0.92), 7. IS (ethylparabene) 38.5 min (1.00), 8. genistein 44.7 min (1.16), 9. coumestrol 46.0 min (1.19), 10. kwakhurin 47.8 min (1.24) であった (カッコ内数字は、IS の保持時間を 1 とした時の相対保持時間を示す)。一方、*P. mirifica* 塊根標準試料についてプロフ

ファイル分析用に抽出を行い本条件下で LC-MS 分析を行った結果、分析対象化合物すべてが検出され、UV 254 nm におけるクロマトグラム上及び各化合物の疑似分子イオンのマスクロマトグラム上では他の常在成分による妨害はほとんど認められなかった。ガウクルアに特異的な 4 成分の中で、kwakhurin は特に含有量が多く、また、クロマトグラム上他成分による影響が少ないことから、この kwakhurin を指標成分とすることで、基原植物 *P. milifica* の識別が可能であると考えられた。図 2 に標準試料の抽出液の LC-MS 分析結果 (UV 254 nm におけるクロマトグラム、各ピークの UV スペクトル並びに各化合物の疑似分子イオン  $[M-H]^-$  のマスクロマトグラム) を示す。

さらに、ガウクルア 17 製品について、同様に抽出し分析を行った。その結果、17 製品中 8 製品 (製品 2, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 18) からはガウクルアに特異的な成分 miroestrol, isomiroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin が検出されたが、残りの 7 製品からは、他の分析対象化合物は検出されたものの、これら 4 化合物は全く検出されなかった。図 3 に特異的 4 成分が検出されなかった製品 13 及び検出された製品 16 の抽出液の LC-MS 分析結果を示す。また、図 4 に、今回分析対象とした 9 化合物について、各製品の抽出液中含量比を、各化合物と内部標準物質との疑似分子イオンのピーク面積比で表した。なお、特異的成分の含有が認められなかった製品でも、*P. milifica* 100% を標榜していたり、*P. milifica* の含有量を明示したりしていることから、これら製品の表示の信憑性が疑われた。

#### 2) 各種抽出溶媒における抽出効率

上記プロファイル分析のための抽出条件 (酢酸エチルにおいて 1 時間超音波下抽出) は、LC-MS 分析において、余分な夾雑物を排除し、クロマトグラム上 (UV 254 nm)、主要な分析対象化合物ピークへの妨害を極力抑えた方法であるが、必ずしも各化合物が効率よく抽出されているわけではない。そこで、特異的成分 deoxymiroestrol,

isomiroestrol, miroestrol, kwakhurin の *P. mirifica* 塊根標準試料からの抽出効率を検討するために、図 5 に示した 6 種類の抽出条件を検討した。その結果、試料を超音波下 3 時間酢酸エチルで抽出した後、さらに 3 時間メタノールで抽出を行う方法が最も抽出操作が簡便で、抽出効率が高かった。

### 3) 定量分析

プロファイル分析及び DNA 鑑定の結果、*P. milifica* の含有が確認された 8 製品中の deoxymiroestrol, miroestrol, kwakhurin について、上記条件により抽出を行い、LC-MS により定量分析を行った。定量値は、夾雑物による妨害を避けるために、質量分析において、それぞれの化合物と内部標準物質の疑似分子イオン ( $[M+H]^+$ ) のピーク面積比から算出した。表 2 に本分析条件による miroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin の検量線、分析精度及び回収率を示す。分析の結果、製品中 3 化合物の合計濃度 ( $\mu\text{g/g}$ ) が *P. mirifica* 塊根標準試料と同レベルの濃度が 3 製品 (製品 12, 14, 16) で認められた (表 3)。また、製品に表示されている「1 日推奨摂取量」に含まれる各化合物量を算出したところ、3 化合物合計で 600  $\mu\text{g}$  を越えている製品もあった (製品 12)。

なお、別途、「健康危害が報告されたいわゆる健康食品中の基原植物の同定について」において報告したように、平成 17 年には、ガウクルア含有製品において、過剰な女性ホルモン様作用が引き起こしたと考えられる副作用が報告されている。この製品中の deoxymiroestrol, miroestrol, kwakhurin 含量は、1 日推奨摂取量中の 3 化合物合計量に換算すると 30  $\mu\text{g}$  程度であった。副作用が報告された製品と今回分析を行った製品を比較すると、活性成分がより多く含まれているのが 4 製品 (製品 2, 7, 12, 14) で認められ、これら製品の安全性が懸念された。また、最近になって、大豆イソフラボンの安全な 1 日上限摂取目安量が 75mg/kg であると食品安全委員会から

示された。本研究で定量した化合物は、目的の項で示したように、大豆イソフラボンより活性が高いものと考えられており、今後、正確な活性の上限摂取目安量が示されることを望む。

### D. 結論

強力なエストロゲン作用を有するガウクルアに特異的な成分 deoxymiroestrol, miroestrol, kwakhurin 及び isomiroestrol、また、ガウクルアにおいて含有が報告されている代表的なイソフラボノイド化合物 puerarin, daidzin, daidzein, genistein 及び coumestrol に着目して、LC-MS によるプロファイル分析法を検討した。その結果、*P. mirifica* 塊根標準試料においては、分析対象化合物すべてが検出され、UV 254 nm におけるクロマトグラム上及び各化合物の疑似分子イオンのマスキングクロマトグラム上では他の常在成分による妨害はほとんど認められなかった。一方、本法を実際の製品分析に応用し、ガウクルア含有を標榜する製品の品質について検討した結果、17 製品中 8 製品から上記特異的 4 成分が検出された。残り 9 製品については、puerarin や daidzein 等の代表的なイソフラボン化合物は検出されたものの、4 成分は検出されず、基原植物の信憑性が疑われた。さらに、LC-MS により各製品中 deoxymiroestrol, miroestrol, kwakhurin について定量分析を行った結果、製品によっては 1 日推奨摂取量あたりの 3 化合物量の合計が 600  $\mu\text{g}$  を越えるものも存在し、これらの製品の大量摂取は、安全性の面で注意が必要であるものと考えられた。

### E. 参考文献

- 1) a) J. C. Cain, *Nature*, 1960, 188, 774-777, b) H. E. H. Jones *et al.*, *J. Endocrinol.*, 1960, 20, 229-235, c) H. E. H. Jones *et al.*, *J. Endocrinol.*, 1961, 22, 293-302, d) H. E. H. Jones *et al.*, *J. Endocrinol.*, 1961, 22, 303-312.

2) S. Chansakaow *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 2000, 63(2):173-175.

#### F. 健康危機情報

ガウクルア含有製品の中には、強いエストロゲン様作用を示す deoxymiroestrol, miroestrol 等の化合物が相当量含有されている製品もあり、大量摂取には注意が必要である。

#### G. 研究発表

1) RURI KIKURA-HANAJIRI, TAKURO MARUYAMA, MAIKO KAWAMURA, YUKIHIRO GODA, SATOKO SIMOKAWA, TAKUYA KUMAMOTO, TSUTOMU ISHIKAWA: Simultaneous Analysis of Miroestrol, Deoxymiroestrol, Kwakhurin and Typical Isoflavonoids in Raw Materials and Food Supplements Containing *Pueraria mirifica* by LC-ESI-MS. 119<sup>th</sup> AOAC Annual

Meeting & Exposition, Orlando, USA (2005, 9)

(上記海外学会参加・発表は、本研究費により行われたものである。)

2) 花尻 (木倉) 瑠理、丸山卓郎、河村麻衣子、合田幸広、下川聡子、熊本卓哉、石川勉: 植物由来健康食品中に含有される起源植物の品質管理のための分析法の開発—ガウクルア (*Pueraria mirifica*) 含有健康食品について—、日本薬学会第 126 年会 (仙台、2006, 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

表 1 ガウクルア含有製品の製品形態

製品番号	製品形態	含有成分等
No.1	カプセル250 mg x 60粒	プエラリア・ミリフィカ(ガウクルア)100 %
No.2	カプセル 60粒	プエラリア・ミリフィカ シヨ糖脂肪酸エステル 被包剤(ゼラチン)
No.3	カプセル30 g (90粒)	プエラリアミリフィカパウダー・海洋性フィッシュコラーゲンペプチド・パールパウダー
No.4	カプセル 400 mg x 15	プエラリア100 %
No.5	錠剤 120粒入り	プエラリアミリフィカ、ザクロエキス、大豆抽出物(イソフラボン含有)、ビタミンC、ビタミンE、ナイアシン
No.7	250 mg / 粒 x 270粒	プエラリア、ビタミンC、E、DNA、RNA。
No.8	16 g (320 mg x 50カプセル)	1カプセル中 中身約260mg プエラリアミリフィカ末約252mg
No.9	内容量:330 mg x 約60粒 錠剤	プエラリア・ミリフィカ粉末 シヨ糖脂肪酸エステル 増粘剤(セルロース)
No.10	粉末15 g	プエラリア粉末 100%
No.11	カプセル 1粒 400 mg	タイ産のピュアプエラリアを100%
No.12	70 g (240 粒程度) 錠剤	ガウクルア(プエラリア)
No.13	270 mg x 60 粒	プエラリア・ミリフィカを100%
No.14	100mg 100入り カプセル	ガウクルア(プエラリア)配合
No.15	200 mg 60個入り カプセル	ガウクルア100%濃縮カプセル
No.16	粉末 4 g	プエラリア 天然物100%
No.17	250 mg 60カプセル	プエラリアミリフィカ 被包材(ゼラチン、カラメル色素)
No.18	8 g	プエラリア・ミリフィカ 100%

表 2 Miroestrol, Deoxymiroestrol 及び Kwakhurin の LC-MS 分析における検量線、精度及び回収率

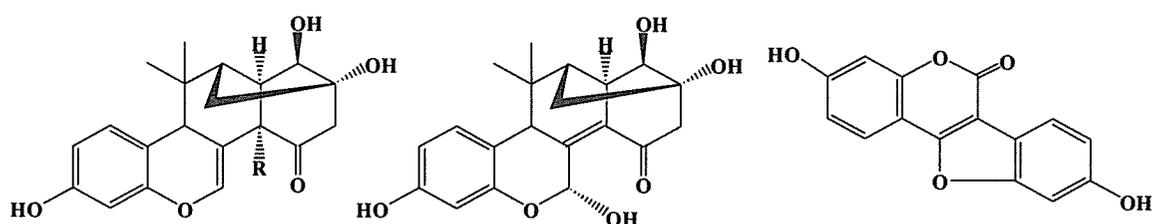
	Linear range (µg/g)	Calibration curve	Precision (%)			Recovery (%)		
			1	20	50 µg/g	1	20	50 µg/g
Miroestrol	0.1 - 50	y = 0.2071x + 0.0994 R <sup>2</sup> = 0.9971	16.8	4.6	1.6	80.3	99.9	90.4
Deoxymiroestrol	0.1 - 50	y = 0.1229x - 0.0304 R <sup>2</sup> = 0.9988	2.1	2.8	2.7	99.8	102.7	93.9
Kwakhurin	0.1 - 50	y = 0.7984x - 0.1741 R <sup>2</sup> = 0.9993	1.4	0.3	1.7	111.0	103.4	93.7

\* n = 3

表3 ガウクルア製品中 Miroestrol, Deoxymiroestrol 及び Kwakhurin 濃度及びメーカー推奨1日摂取量あたりの各化合物量

製品番号	製品中各化合物濃度 (ug/g)			1日推奨摂取量あたりのガウクルア含有量(表示量)	1日推奨摂取量あたりの化合物濃度 (ug)		
	Miroestrol	Deoxymiroestrol	Kwakhurin		Miroestrol	Deoxymiroestrol	Kwakhurin
No.2	59.5	8.6	71.7	2錠 500mg	29.7	4.3	35.9
No.7	13.4	6.6	45.8	9錠 2250mg	30.1	14.8	103.2
No.10	19.7	4.9	29.1	スプーン山盛1杯(約100mg)	2.0	0.5	2.9
No.12	231.5	49.0	348.6	4-5錠 800-1000mg	231.5	49.0	348.6
No.14	181.0	76.6	436.0	2-3錠 2-300mg	54.3	23.0	130.8
No.15	36.9	4.4	ND	1錠 200mg	7.4	0.9	-
No.16	337.3	208.4	629.0	耳かき1杯強(約10mg)	3.4	2.1	6.3
No.18	32.7	ND	49.5	スプーン1杯(約25mg)	0.8	-	1.2
標準植物根塊	133.2	331.8	630.5				

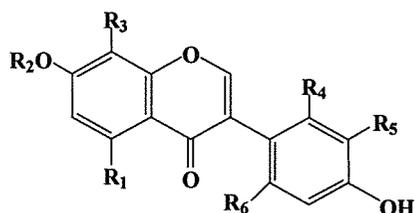
\*N.D.: Not detected



R= OH Miroestrol  
H Deoxymiroestrol

Isomiroestrol

Coumestrol



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	
H	H	H	H	H	H	Daidzein
OH	H	H	H	H	H	Genistein
H	H	H	3,3-dimethylallyl	OMe	OH	Kwakhurin
H	Glucose	H	H	H	H	Daidzin
H	H	Glucose	H	H	H	Puerarin

図1 ガウクルア含有化合物(分析対象化合物)の構造

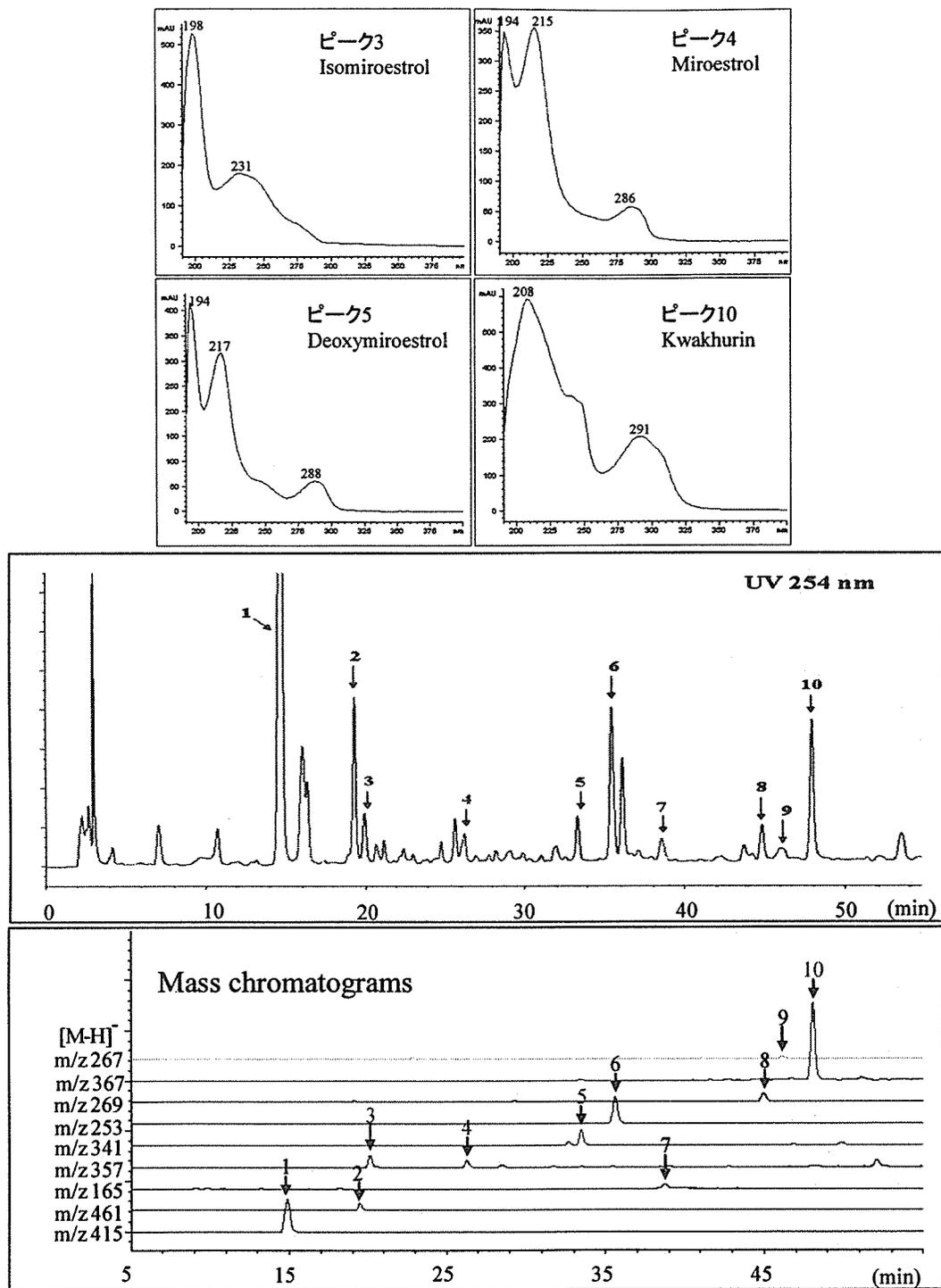


図2 ガウクルア標準植物抽出物の LC-MS クロマトグラム及び4化合物のダイオードアレイ検出器による UV スペクトル

1. Puerarin (14.7 min) , 2. Daidzin (19.3 min) , 3. Isomiroestrol (20.0 min) , 4. Miroestrol (26.1 min) ,  
 5. Deoxymiroestrol (33.3 min) , 6. Daidzein (35.4 min) , 7. IS (Ethylparabene) (38.5 min) ,  
 8. Genistein (44.7 min) , 9. Coumestrol (46.0 min) , 10. Kwakhurin (47.8 min)

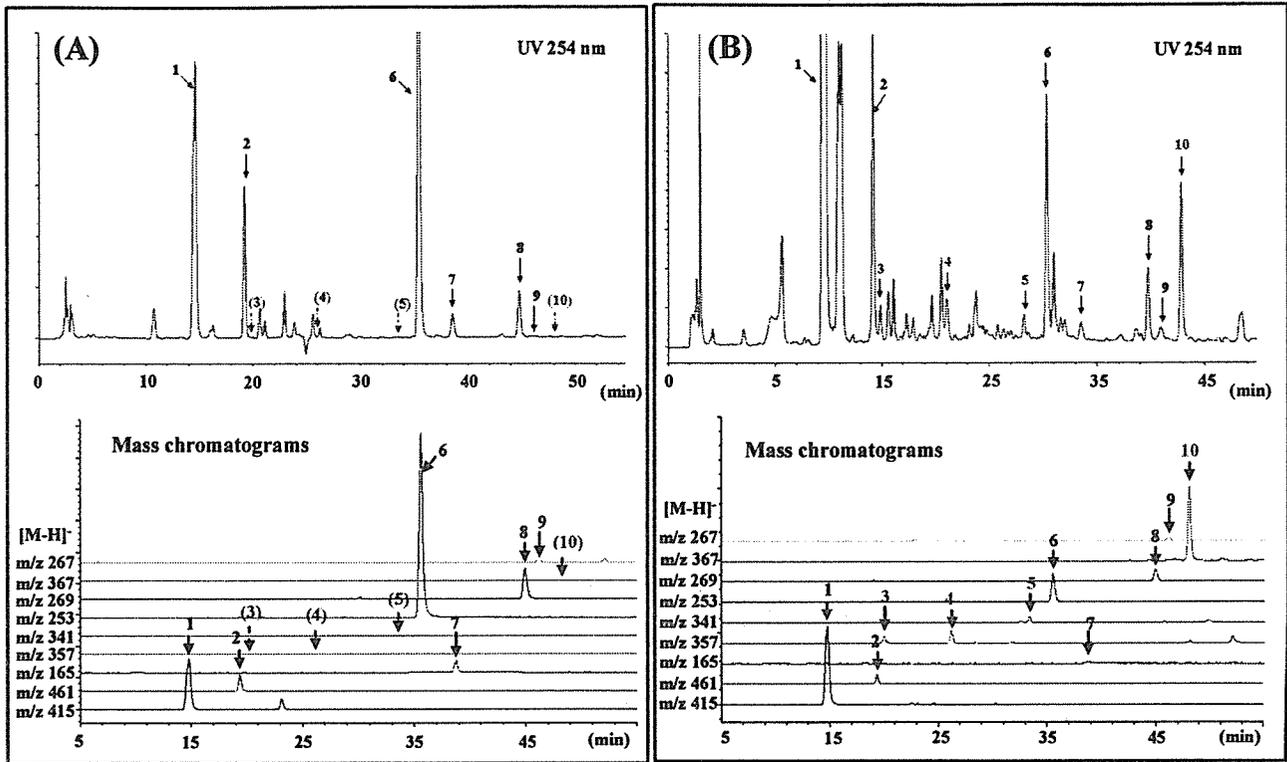
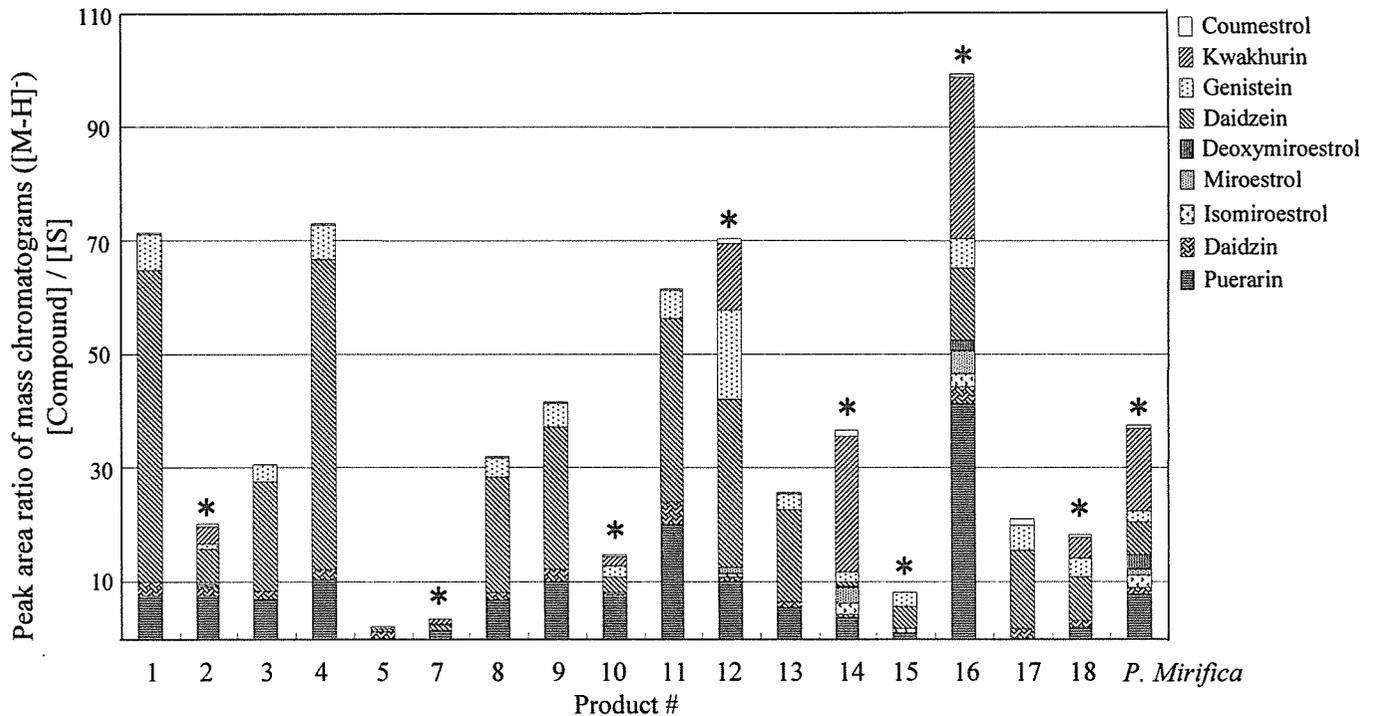


図3 (A)ガウクルア製品#13及び(B)#16の抽出物のLC-MSクロマトグラム  
(各ピークの化合物名は図2に同じ)



\* The products in which characteristic components of *P. mirifica*, deoxymiroestrol, miroestrol, isomiroestrol, kwakhurin were detected.

図4 ガウクルア製品中各成分のHPLCプロファイル分析結果

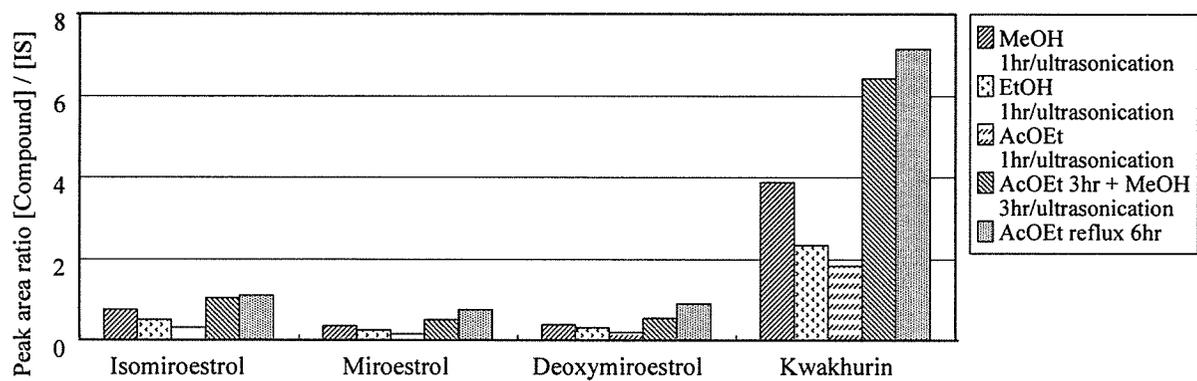


図5 異なる抽出溶媒における各成分の抽出効率

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題：諸外国における未承認医薬品及びハーブ等に関する研究

分担研究者：花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

－健康危害が報告されたいわゆる健康食品中の基原植物の同定について－

研究要旨 健康被害が報告されたガウクルア含有製品について、製品のプロファイル分析を行うとともに、DNA 分析を行い、基原植物 (*Pueraria candollei* var. *mirifica* (Basionym: *P. mirifica*, Leguminosae)) を同定した。また、活性成分 miroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin について定量分析を行い、他のガウクルア含有製品と含有量を比較検討した。

研究協力者 丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部研究員

含有調査を行うと共に、DNA 分析により基原植物の同定を試みたので報告する。

A. 目的

ガウクルアは、タイ北部の森林地帯に自生する豆科植物 (*Pueraria candollei* var. *mirifica* (Basionym: *P. mirifica*, Leguminosae)) の塊根を乾燥したもので、極めて強いエストロゲン様作用を示す miroestrol や deoxymiroestrol 等の化合物を含有する。また、本植物はタイでは若返りの薬と考えられており、古くから利用されている。日本においても、近年ガウクルア含有製品は、美肌効果や丰胸作用等を標榜し、インターネット等を介し、数多く販売されている。一方で、2005 年度には、佐賀県において、ガウクルア含有製品との因果関係が疑われる健康危害（乳房肥大、下肢の浮腫、月経様出血等）が報告されている。本製品は、佐賀県の分析によれば、女性ホルモン様医薬品成分であるエストラジオール、エストリオール、リン酸エストラムスチンナトリウム、酢酸メドロキシプロゲステロン、エストロン、安息香酸エストラジオールは検出されないことが判明している。本研究では、この健康危害が疑われたガウクルア含有製品について、活性成分 (miroestrol, deoxymiroestrol, kwakhurin) の

B. 方法

1) 試料

佐賀県健康福祉本部より送付された製品（錠剤）を乳棒、乳鉢により粉碎して測定試料とした。製品の性状は以下の通りである。

原材料：還元麦芽糖水飴、結晶セルロース、ブエラリア粉末、乳糖、マカパウダー、ビール酵母、グリセリン脂肪酸エステル、セレン酵母

内容量：250 mg x 4 粒入り x 180 包

1 日あたりの摂取目安：1 日 1 包（4 粒、1000 mg）

2) 成分分析

女性ホルモン様作用を示すことが報告されている *P. mirifica* に特有な活性成分 miroestrol, deoxymiroestrol, kwakhurin 及び isomiroestrol、また *P. mirifica* において含有が報告されている代表的なイソフラボノイド化合物 coumestrol, daidzein, genistein, daidzin, puerarin を分析対象化合物とし、前述の分担報告書「ガウクルア (*Pueraria mirifica*) の活性成分の分析法について」に記載した方法で、プロファイル分析を行った。また、miroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin については、LC-MS を用いて定量分析を行った。

## 2) DNA 分析

粉末状にした試料 125 mg をとり、DNA 抽出に供した。DNA 抽出、精製は、Qiagen 社の DNeasy Plant Mini Kit を用いて行い、genomic DNA 溶液、200  $\mu$ L を得た。紫外可視吸収スペクトルから算出した濃度は、52.0 ng/mL、純度の指標となる 260 nm 及び 280 nm の吸光度の比は、1.486 であった。得られた genomic DNA を鋳型とし、二段階の PCR を行うことにより、核 rDNA、ITS 領域 (730 bp) 及び葉緑体 DNA の rps16 intron 領域 (336 bp) をそれぞれ増幅した。その際、複数の原料植物が含まれている場合に備え、ITS 領域の増幅には、植物の rDNA に広く保存されている遺伝子配列を基に設計したプライマーを使用し、他方、rps16 intron 領域の増幅には、*Pueraria* 属植物及びその近縁種のみ保存性の高い遺伝子配列に設計したプライマーを用いた。本手法を用いることにより、ITS 領域の配列解析からは、*P. mirifica* 以外の植物の存在の有無が判断出来ると共に、その後のサブクローニングにより、他の植物種の推定が可能である。また、rps16 intron 領域の配列解析からは、複数の配列の混ざった PCR 産物の生成を避け、ダイレクトシーケンスによる基源植物の推定が容易に出来る。得られた PCR 産物は、フィルターろ過による精製後、ダイレクトシーケンスに供することにより、塩基配列解析を行った。

## C. 結果及び考察

### 1) プロファイル分析

試験試料の酢酸エチル抽出物について LC-MS 分析を行い、得られた各ピークの保持時間、UV スペクトルもしくはマススペクトルを、標準化合物及び *P. mirifica* 標準試料の抽出物のピークと比較した。その結果、*P. mirifica* に含有されることが報告されている 9 成分 (miroestrol, isomiroestrol, deoxymiroestrol, kwakhurin, coumestrol, daidzein, genistein, daidzin, puerarin) を確認した。このうち、4 成分は本植物に特有な成分 miroestrol, isomiroestrol,

deoxymiroestrol 及び kwakhurin であった。このことから、本試験試料は、*P. mirifica* を基原植物として含有していることが示唆された (図 1)。また、LC のプロファイル分析結果について、現在までに分析を行った他の *P. mirifica* 製品中に含有される上記 9 成分と (分担報告書「ガウクルア (*Pueraria mirifica*) の活性成分の分析法について」参照)、試験試料中各成分の含量比を比較した結果、特に問題となる相違は認められなかった。一方、活性成分 miroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin について、LC-MS により定量分析を行った結果、それぞれの含有量は、10.2, 7.2, 10.5  $\mu$ g/g であり、製品に表示してある 1 日推奨摂取量 (4 錠、1000 mg) に換算しても各 10.2, 7.2, 10.5  $\mu$ g であった。なお、前述の分担報告書における他の *P. mirifica* 含有 8 製品中に含まれるこれら活性成分と試験試料中各成分について含有量を比較検討した結果、他の製品と比べて特に高い含量は認められなかった。また、それぞれの 1 日推奨摂取量を考慮して、1 日あたりに摂取されることが予想される 3 化合物の量を比較しても、特に高い値は示さなかった。

### 2) DNA 分析結果

ITS 領域、rps16 intron 領域、双方において、良好な解析結果が得られた。ITS 領域の内部配列は、兵庫県和田山町特産物市場組合より恵与された *P. mirifica* の標品の配列と多形部位 5 箇所を除き、よく一致していた (図 2)。上記標品は単一個体を用いていることから、多形部位の存在は、種内変異の範囲内であると考えられる。また、rps16 intron 領域の配列も上記標品のものと完全に一致した (data not shown)。さらに、ITS 領域の塩基配列解析において、*P. mirifica* 以外の塩基配列は検出されなかった。このことから、検体中に *P. mirifica* 以外の植物原料 (エキス等の DNA を含有しない物を除く) は、ほとんど存在しないと考えられる。

## D. 結論

健康危害が報告されたガウクルア含有を標榜

する製品について、原料植物のDNA分析を行った結果、原料植物を *Pueraria candollei* var. *mirifica* (Basionym: *P. mirifica*, Leguminosae) と同定した。一方、成分分析を行った結果、*P. mirifica* の含有成分9化合物（本植物に特有の4化合物を含む）を確認した。また、強い女性ホルモン様作用が報告されている活性成分（miroestrol, deoxymiroestrol 及び kwakhurin）について定量分析を行い、製品容器に表示されている1日推奨製品摂取量に含有される各成分量を換算したところ、他製品と比較して特に高い含量は認められなかった。むしろ、今回健康危害が報告された製品よりも活性成分が多く含まれて

いる製品も存在することから、これらの製品の大量摂取は、安全性の面で注意が必要であるものと考えられた。

E. 健康危険情報

前報告書（ガウクルア（*Pueraria mirifica*）の活性成分の分析法について）で記述した。

F. 研究発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

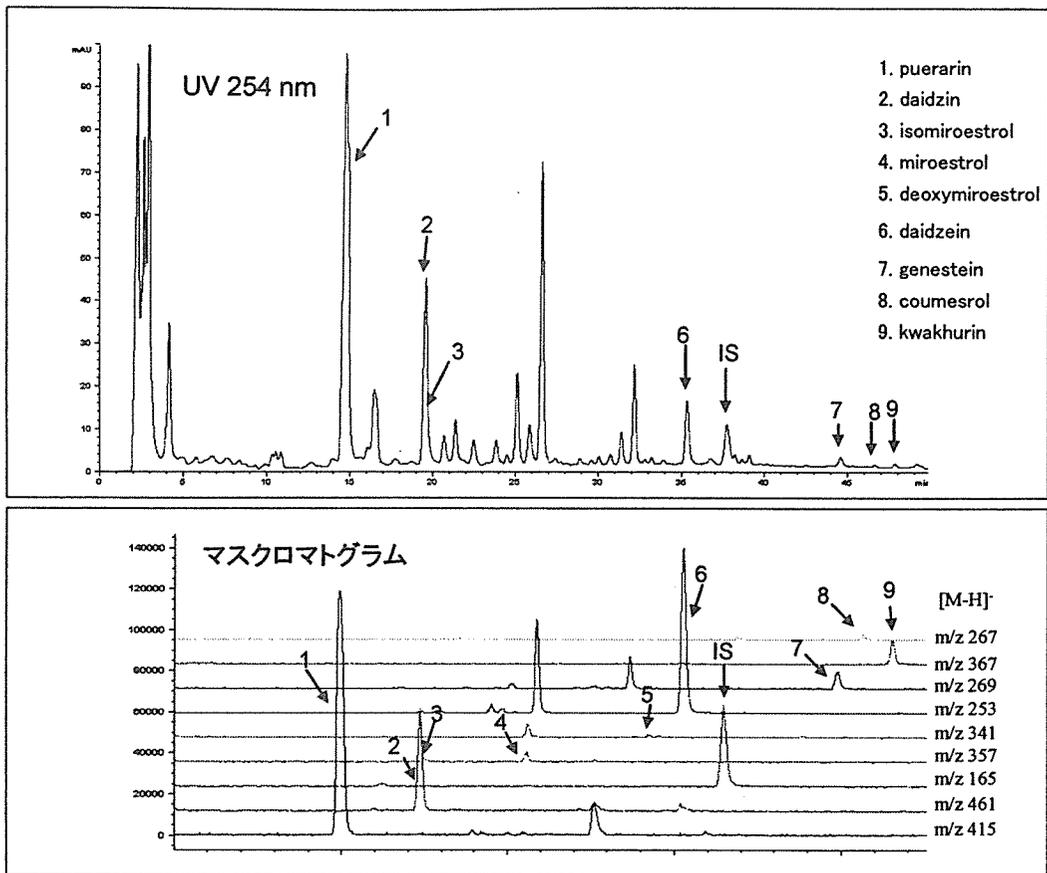


図1 ガウクルア含有製品のプロファイル分析におけるHPLCクロマトグラム及びマススペクトル

authentic sample	T T T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T G T C G A T G C C	40
wakanohana	. . . . .	40
authentic sample	T C A C A A T C A G A T T G A C C C G C G A A T T C G T T T T C C A T C T A C	80
wakanohana	. . . . .	80
authentic sample	C A G C A G G C A A G C A G G G G T C G G G C C G G G C T T C T T C M G T C C G	120
wakanohana	. . . . . <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> . . . . .	120
authentic sample	T C C T C C C C T T G C T T T G C C T G T T G C G T T G G G G C G G G G G G T	160
wakanohana	. . . . .	160
authentic sample	G G A C A C A A A G C A A G C A T C G T C Y T G C C T G G C C T C C T C T C C T	200
wakanohana	. . . . . <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> . . . . .	200
authentic sample	C C T T C C C A A C A A A C A C A A C C C C G G C G C T T C G T G C G C C A A	240
wakanohana	. . . . .	240
authentic sample	G G A A C T C C A A T C T G T Y A A G T G C G A C T C C C A A C G G C C C G G A	280
wakanohana	. . . . . <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> . . . . .	280
authentic sample	G A C G G T G C C C C G C G G G C G T T G T C A C G A C G C A C A T T A T T A T	320
wakanohana	. . . . .	320
authentic sample	A C A A A A T G A C T C T C G G C A A C G G A T A T C T C G G C T C T T G C A T	360
wakanohana	. . . . .	360
authentic sample	C G A T G A A G A A C G T A G C G A A A T G C G A T A C T T G G T G T G A A T T	400
wakanohana	. . . . .	400
authentic sample	G C A G A A T C C C G T G A A C C A T C G A G T C T T T G A A C G C A A G T T G	440
wakanohana	. . . . .	440
authentic sample	C G C C C G A A G C C A T T A G G T G G A G G G C A C G C C T G C C T G G G T G	480
wakanohana	. . . . .	480
authentic sample	T C A C A C A T C G T T A C C C C A C G C A A A C A A A T G T C T C A C A C G	520
wakanohana	. . . . .	520
authentic sample	A C A G A C G T T C T G C G T A G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C	560
wakanohana	. . . . .	560
authentic sample	G A G C A C C G T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G T G G C	600
wakanohana	. . . . .	600
authentic sample	C G A G T G C G C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A	640
wakanohana	. . . . . <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R</span> . . . . .	640
authentic sample	G A C C A A T C A C G C G C C G C G A C T C G G T C G G C T C C G G A C T C C T	680
wakanohana	. . . . .	680
authentic sample	C C A C G A C C C T A T A G T G C C T C Y T C T T C G G G G A G A C G C T C T C	720
wakanohana	. . . . . <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> . . . . .	720
authentic sample	A A C G A G A C C T	730
wakanohana	. . . . .	730

図2 *Pueraria mirifica* 標品及び検体由来 DNA の ITS 領域の塩基配列  
点“.”は、標品と同一の塩基。枠囲みの塩基は、標品と異なる塩基。  
M は、A/C、Y は、C/T、R は、A/G を示す。