

単離した化合物の細胞毒性試験をヒト口腔内類上皮細胞由来の KB 細胞を用いて行った。その結果を表 1 に示す。

D. 考察

これまでイノモトソウ属 (*Pteris*) に属する植物からはカウラン、プテロシン、プテロシド、フラボノイドが得られているが、キナ酸カフェー酸エステルが *Pteris* 得られたのは、2 例目である。植物分類学的にも興味があることである。今回の研究では ptaquiloside やその変換物は得られなかったが、これも同様に植物分類学的な興味を持たれる。

E. 結論

プテロシン類を多数含み、それらに細胞毒性が見られることより、食薬区分について慎重な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chemical and biologically active constituents from *Pteris multifida*

Harinantenaina Liva, Katsuyoshi Matunami and Hideaki Otsuka

Chemical and Pharmaceutical Bulletin に投稿準備中。

2. 学会発表等

Chemical constituents of *Pteris multifida* and their biological activity

Harinantenaina Liva, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka

日本薬学会第 128 年会 (横浜) 平成 20 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



写真 1



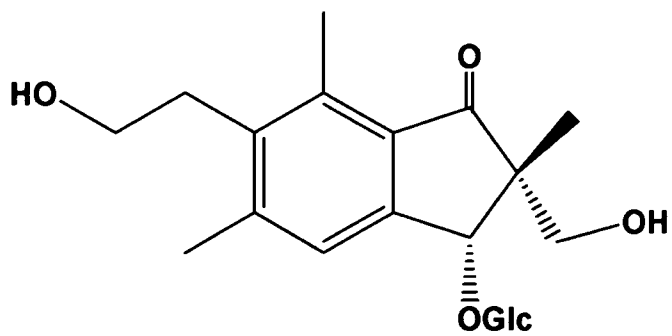
写真 2



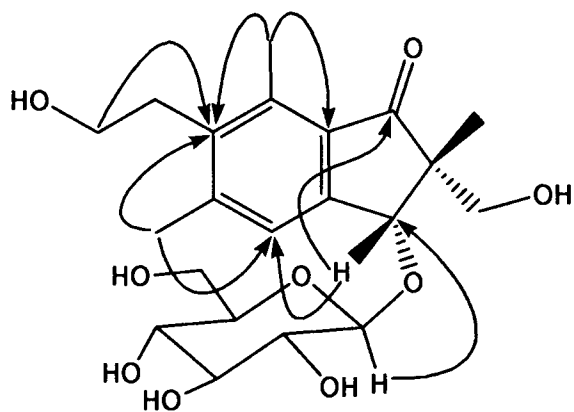
写真 3



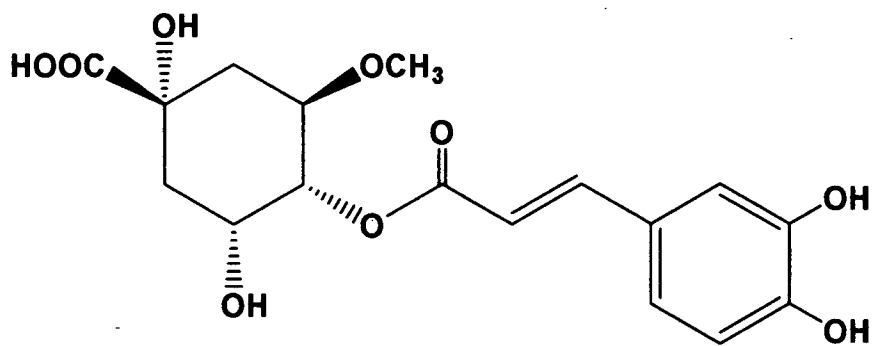
写真 4



化合物 1



化合物 1 の HMBC



化合物 2

分担研究課題 専ら医薬品の分析と規制範囲に関する研究

分担研究者 水上 元
名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

フタバアオイのアリストロキア酸、アサロン含有と
トウジンのアルカロイド含有の有無に関する研究

研究協力者 牧野利明
名古屋市立大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨 フタバアオイにおけるアリストロキア酸とアサロンの分析と、トウジンにおけるアルカロイド含有の有無を検討を行った。フタバアオイは4検体中1検体の地上部からaristolochic acid Iを検出し、それはウスバサイシン地上部よりも高含量であった。また、フタバアオイからは、アサロン類は検出しなかった。ドラージェンドルフ試液による試験から、トウジンはアルカロイドを含有する可能性が高いことを示唆した。以上のことから、フタバアオイとトウジンを「専ら医薬品」の規制から外すためには、さらに十分なデータが必要であると考えられた。

A. 研究目的

フタバアオイ *Asarum caulescens* は、ウマノスズクサ科に属する植物であり、中国ではその根を双葉細辛という名の生薬として利用している。またトウジン（党参）はキキョウ科ヒカゲノツルニンジン *Codonopsis pilosula* の根を基原とする生薬であり、中国では専ら人参（*Panax ginseng* の根）の安価な代用品として使用されているが、一定の薬効を持つことから我が国においても人参の代わりに党参を使用した医薬品である生薬製剤が発売されている。我が国で医薬品と食品の境界を示している「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」では、どちらの植物も「専ら医薬品」として規定されており、食品として市販することは認められていない。しかし、それらに関して医薬品として使用しなければならない根拠となる副作用や毒性に関する情報は十分ではない。

そこで本研究では、フタバアオイについては

同じウマノスズクサ科の植物に含まれている腎毒性をもつ化合物、アリストロキア酸と、発ガン性・遺伝毒性を持つアサロン含有の有無を、トウジンについてはアルカロイド含有の有無を検討した。

B. 研究方法

材料

アリストロキア酸分析に使用したサンプルを表1に示す。フタバアオイは、名古屋市立大学大学院薬学研究科附属薬用植物園で採取したもののほか、東京大学大学院理学系研究科附属植物園より分与されたもの、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究所より分与されたものを使用した。アリストロキア酸を測定するための陽性コントロールとして、大阪府立公衆衛生研究所より分与された馬兜鈴、関木通、広防已を使用した。また、アサロンの陽性コントロールには、名古屋市立大学大学院薬学研究

科附属薬用植物園で2007年10月に採取したショウブの葉を使用した。

試験に用いたトウジンは、市場品（栃本天海堂、Lot No. 027107001、大阪；松浦薬業、Lot No. 776034、名古屋；堀江生薬、Lot No. #35551305、大和郡山）の3種類をそれぞれ購入して使用した。

アリストロキア酸およびアサロン分析方法

山崎の方法を参考にして行った¹⁾。図1に示すサンプルおよび関木通、広防已、ショウブの葉は、よく乾燥させた後、ミルで粉末とし、20.0 mgに1% NH₃を含むメタノール1.6 mLを加え、超音波処理（30分）することで抽出した。遠心分離（12,000 rpm、5分）後、上清を別のナス型フラスコに取り、沈殿に1% NH₃を含むメタノール1.6 mLを加える操作を3回繰り返した。上清を合わせ、減圧下で濃縮乾固し、1% NH₃を含むメタノール 0.5 mLに溶解させた。

Sep-Pak[®]Plus Waters Accel[™] Plus QMA Cartridges (Waters, Millford, MASS) 1% NH₃を含むメタノール 5 mLで洗浄し、上記溶液0.5 mLをすべてアプライした。その後、1% NH₃を含むメタノール 5 mLで洗浄し、次いで、メタノール 5 mLで洗浄した。その際の洗浄液は、後述するアサロンの分析に使用した。最後にSep-Pakに吸着した成分を、アセトニトリル：蒸留水：リン酸（75：25：2）4 mLで溶出し、その10 μLをアリストロキア酸分析用のサンプルとした。洗浄液は、減圧下で濃縮乾固し、5 mLのアセトニトリル：蒸留水（55：45）に溶解し、その10 μLをアサロン分析用のサンプルとした。

別に、標準品として aristolochic acid (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, aristolochic acid I and IIを1：1で含む) を1% NH₃を含むメタノ

ール中にそれぞれ0.0970～24.2 μg/mLの濃度で含む溶液、α-asarone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) およびβ-asarone (Sigma-Aldrich) を1% NH₃を含むメタノール中にそれぞれ0.0976～4.88 μg/mLの濃度で含む溶液を、それぞれ5 mLずつ使用し、同様の操作を行い、検量線の作成用とした。

以上のサンプルを、適宜希釈してHPLCにインジェクトした。HPLCは、Shimadzu LC-10Aシステム（ポンプ、LC-10ATvp；フォトダイオードアレイ検出器、SPD-M10Avp、島津製作所、京都）を使用し、以下の条件で分析した：カラム、Inertsil ODS-3、4.6 x 250 mm、GLサイエンス、東京；移動層、アセトニトリル：0.05 M NaH₂PO₄ in 0.2 % H₃PO₄（45：55）for aristolochic acid I and II、アセトニトリル：水（55：45）for α and β-asarone；カラム温度、40℃；検出、UV 252 nm (aristolochic acid I)、225 nm (aristolochic acid II)、254-nm (α and β-asarone)。この条件における各指標成分の溶出時間は、aristolochic acid I (22.3 min)、aristolochic acid II (17.7 min)、α-asarone (13.7 min)、β-asarone (12.5 min)であり、それぞれλ_{max}により同定した。それぞれの化合物において、良好 ($r^2 > 0.998$) な線形の検量線を得た。各サンプルの分析はduplicateで行い、成分含量は (μg/g 植物体乾燥粉末) で表記した。

トウジンに含まれるアルカロイドの分析方法

各ロットのトウジンをミルで粉碎し、1 gを1M 酢酸10 mL中で30分間超音波処理により抽出し、ろ紙でろ過してサンプルを得た。新しいろ紙にろ液を20 μLスポットし、ドラージェンドルフ液 (Sigma Dragendorf spray reagent) を噴霧した。

C. 結果

表2に各サンプル中のアリストロキア酸含量について示す。また、典型的なクロマトグラムとして、陽性コントロールとして使用した関木通のクロマトグラムを図1Aに示す。陽性コントロールとして使用した馬兜鈴、関木通、広防已からは、それぞれaristolochic acid IまたはIIを、ウスバサイシンの地上部からもaristolochic acid Iを検出したが、その根からは検出しなかった。

フタバアオイは、今回は4検体の分析を行い、そのうち1検体のみで地上部からaristolochic acid Iを検出した。そのクロマトグラムを図1Bに示す。溶出時間17.9分のピークは、aristolochic acid IIの溶出時間(17.3分)とは異なり、また、 λ maxも異なっていた(aristolochic acid IIは252 nm、本ピークは240 nm)ことから、別の化合物であると推定された。

参考として分析した他の*Assarum*種植物では、オナガサイシンの茎と根、種の同定は出来ないがガビ山で採取された固体の根から、それぞれaristolochic acid Iを検出した。Aristolochic acid IIを検出したサンプルは、今回の分析では陽性コントロールとして使用したサンプル以外にはなかった。

アサロンについては、陽性コントロールとして使用したショウブから検出し、オナガサイシンの根と茎、種が不明な*Assarum*種植物の根から、それぞれ α -、 β -asaroneを検出したが、フタバアオイからは検出されなかった(表3)。

トウジン水抽出液からのアルカロイドの検出結果について、図2に示す。栃本天海堂、堀江生薬から購入したトウジン抽出液では、アルカロイドに特徴的な赤褐色のスポットを検出した。

D. 考察

本研究では、ウマノスズクサ科*Assarum*属植物に含まれるaristolochic acid I および II、 α - および β -asaroneを分析した。陽性コントロールとして使用した馬兜鈴、関木通、広防已からは、それぞれaristolochic acid IまたはIIを検出し、その値は山崎の報告¹⁾とほぼ近い値を示した。また第14改正日本薬局方第一追補参考情報の記載のとおり、ウスバサイシンの地上部からもaristolochic acid Iを検出し、根からは検出しなかった。また、ショウブの葉からは、高含量の α -および β -asaroneを検出した。以上のことから、本実験における分析は良好に行われているものと考えられた。

フタバアオイは、4検体のうち1検体のみで地上部からaristolochic acid Iを検出し、その含量はウスバサイシンの地上部よりも高いものであった。Aristolochic acid Iを検出したフタバアオイの個体は、昭和大学から医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究所へ導入されたものであるが、分析の結果が出た後に詳細な基原の確認を行ったところ、フタバアオイではなく、カンアオイである可能性もある個体であった。従って、フタバアオイでのaristolochic acid I含有の有無については、今後、種の同定を正しく行ったうえでの判断が求められた。また、フタバアオイを「専ら医薬品」のカテゴリから外す際には、このように近縁植物にアリストロキア酸含有の可能性のあることから、該当する素材については植物基原の同定と、アリストロキア酸を含まないことの確認が必要であると考えられた。

また、アサロンについては、他の*Assarum*種植物で検出したものもあったが、フタバアオイでは認められなかったことから、フタバアオイには一般的にアサロンを含有しないものと予想された。

トウジンについては、ドラーゲンドルフ試液との反応の結果、アルカロイドの含有が予想された。過去の研究報告では、Wongらがトウジンとニンジンの成分比較を行いトウジンにわずかにアルカロイドを含むことを報告し、Liuらがトウジンに含まれるの全アルカロイドが神経成長因子による神経成長をさらに亢進させることを報告している。以上のことから、トウジンには何らかのアルカロイド成分を含有することが十分に示唆され、今後の成分解析が期待される。

E. 結論

フタバアオイには個体によっては腎毒性を持つアリストロキア酸を含有するものが存在することが示唆された。またトウジンについてはアルカロイドを含有する可能性が強く示唆された。以上のことから、現段階では、それらを「専ら医薬品」の規制から外すためにはさらなる検討が必要であると考えられた。

F. 謝辞

フタバアオイのサンプルをご分与いただきました、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究所 菱田敦之様、東京大学大学院理学系研究科附属植物園育成部 出野貴仁様、馬兜鈴、関木通、広防已の生薬標品をご分与いただき、またアリストロキア酸分析法をご指導下さいました大阪府立公衆衛生研究所食品医薬品部薬事指導課 山崎勝弘様に感謝いたします。

G. 参考文献

1) 山崎勝弘、固相抽出とHPLC-PDA検出器を

用いた生薬および漢方製剤中に混入が疑われるアリストロキア酸の簡便・迅速分析、第36回生薬分析シンポジウム講演要旨集、53-65、2007.

- 2) Wong, M.P., Chiang, T.C. & Chang, H.M. Chemical Studies on Dangshen, the Root of *Codonopsis pilosula*. *Planta Med.* 49, 60, 1983.
- 3) Liu, J., Bao, Y., Song, J. & An, L. *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf total alkaloids potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* 24, 913-917, 2003.

H. 研究発表

1. 論文発表

Toshiaki Makino, Atsuyuki Hishida, Yukihiro Goda, Hajime Mizukami. Comparison of major flavonoid contents in *S. baicalensis*, *S. lateriflora* and their commercial products. *J. Nat. Med.* (in press)

2. 学会発表等

牧野利明、水上元、菱田敦之、合田幸広. 生薬「オウゴン」とその同属植物「スカルキヤップ」に関する食薬区分—化学成分レベルでの検討. 食品化学学会第13回総会・学術大会、2007, 5, 31- 6, 1、東京

J. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 使用したサンプル一覧

サンプル名	産地	入手先
A フタバアオイ <i>Asarum caulescens</i>	毛無山産	東京大学大学院理学系研究科附属植物園
B フタバアオイ <i>Asarum caulescens</i>	天成産	東京大学大学院理学系研究科附属植物園
C フタバアオイ <i>Asarum caulescens</i>		医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究所
D フタバアオイ <i>Asarum caulescens</i>		名古屋市立大学大学院薬学研究科附属薬用植物園
E オナガサイシン <i>Asarum leptophyllum</i>	沖縄県カヅウ岳産	東京大学大学院理学系研究科附属植物園
F ウスバサイシン <i>Asiasarum sieboldii</i>	中国遼寧省新賓	栃本天海堂
G ウスバサイシン <i>Asiasarum sieboldii</i>	北朝鮮産	栃本天海堂
H <i>Asarum</i> sp.	ガビ産	東京大学大学院理学系研究科附属植物園
I <i>Asarum</i> sp.		東京大学大学院理学系研究科附属植物園
J 馬兜鈴 <i>Aristolochia debilis</i> の果実	中国産	大阪府立公衆衛生研究所より分与
K 関木通 <i>Aristolochia manshuriensis</i> の茎	中国産	大阪府立公衆衛生研究所より分与
L 広防已 <i>Aristolochia fangchi</i> の茎	中国産	大阪府立公衆衛生研究所より分与
M ショウブ <i>Acorus calamus</i> var. <i>angustatus</i>		名古屋市立大学大学院薬学研究科附属薬用植物園

サンプル A-I については、葉、茎、根のそれぞれについて分析を行った。

表2 アリストロキア酸含量

	aristolochic acid I (µg/g)			aristolochic acid II (µg/g)		
	根	茎	葉	根	茎	葉
A	フタバアオイ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B	フタバアオイ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C	フタバアオイ	n.d.	28.1	n.d.	n.d.	n.d.
D	フタバアオイ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E	オナガサイシン	22.0	1.5	n.d.	n.d.	n.d.
F	ウスバサイシン	n.d.	1.5	n.d.	n.d.	n.d.
G	ウスバサイシン	n.d.	0.9	n.d.	n.d.	n.d.
H	<i>Asarum sp.</i>	16.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I	<i>Asarum sp.</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
J	馬兜鈴	n.d.	n.d. (果実)	n.d.	3.4 (果実)	n.d.
K	関木通	125 x 10			150	
L	広防已	124			n.d.	

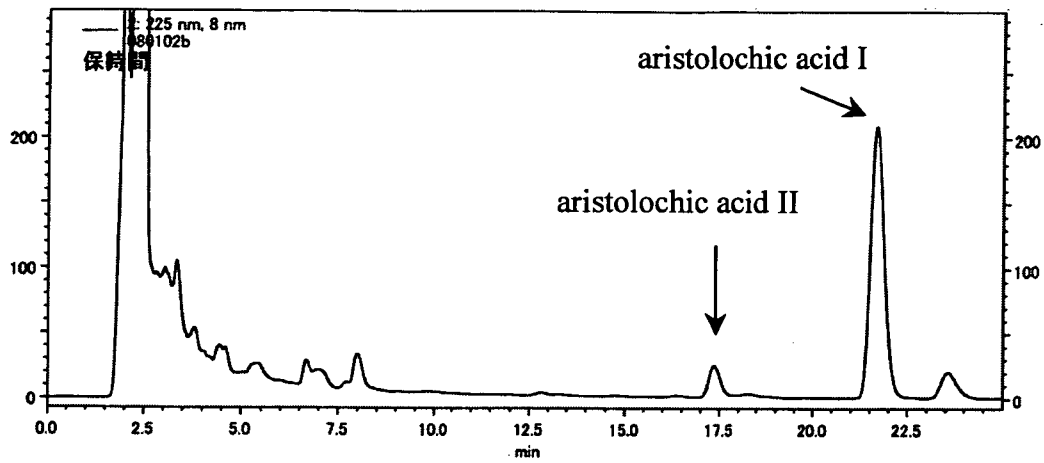
n.d. not detected. Detection limit, 0.1 µg/g (aristolochic acid I), 0.05 µg/g (aristolochic acid II)

表3 アサロン含量

	α-asarone (μg/g)				β-asarone (μg/g)			
	根	茎	葉		根	茎	葉	
A	フタバアオイ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B	フタバアオイ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C	フタバアオイ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D	フタバアオイ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E	オナガサイシン	379	34.1	n.d.	486	73.0	n.d.	n.d.
F	ウスバサイシン	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G	ウスバサイシン	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H	<i>Asarum sp.</i>	481 x 10	n.d.	n.d.	314	n.d.	n.d.	n.d.
I	<i>Asarum sp.</i>	173	n.d.	n.d.	476	n.d.	n.d.	n.d.
M	シヨウブ							849 x 10
								33.8

n.d. not detected. Detection limit, 15 μg/g

A



B

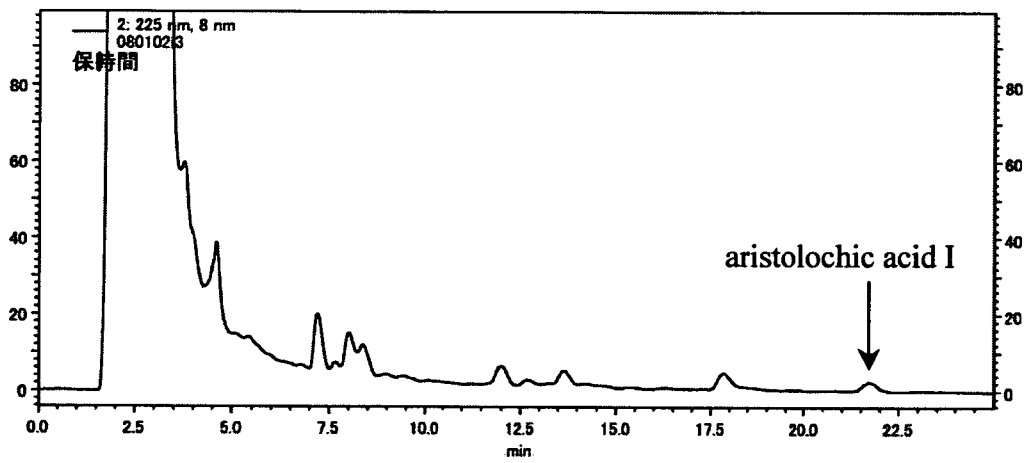
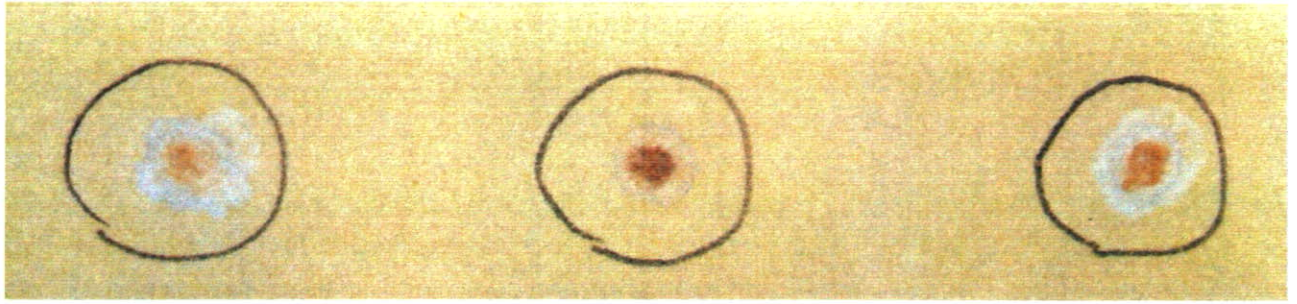


図 1 典型的なアリストロキア酸分析のクロマトグラム

- A 関木通サンプルの 225 nm でのクロマトグラム。AA-I (21.7 min)、AA-II (17.3 min)
 B フタバアオイ (C、筑波) の葉の 225 nm でのクロマトグラム。AA-I (21.7 min)。



栃本天海堂

松浦薬業

堀江生薬

図2 トウジン水抽出液のドラージェンドルフ試液による発色

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Sakai, S. 他	Characterization of major components in <i>Crataegus oxyacantha</i> L. leaves and analyses of the leaves and commercial hawthorn leave products	Jpn. J. Food Chem.	14 (2)	56-62	2007
Kim, I. H. 他	The constituents of the roots of <i>Ampelopsis japonica</i>	J. Nat. Med.	61 (1)	224-225	2007
Kumasaka, K. 他	Determination of (R)-xanthoantrafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement	Chem. Pharm. Bull.	56 (2)	227-230	2008
Makino, T. 他	Comparison of major flavonoid contents in <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>S. lateriflora</i> and their commercial products	J. Nat. Med.	62 (1)	in press	2008

総説等

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Goda, Y.	The safety of health foods and importance of their origin	Yakugaku Zasshi		submitted	2008