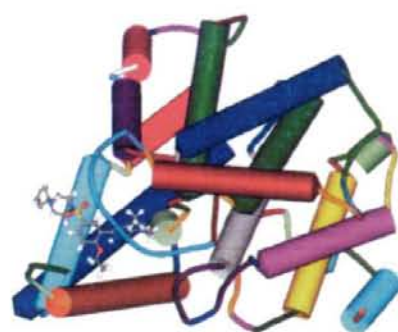
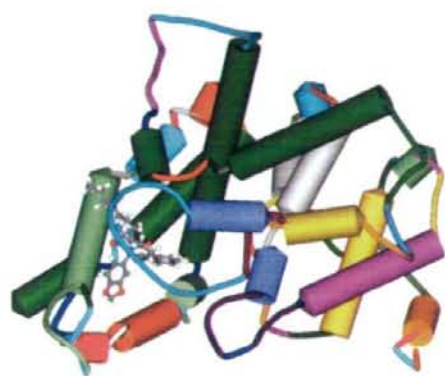


ホモチオデナフィル



シクロペンチルナフィル



N-オクチルノルタダフィル



チオアイルデナフィル

図4 PDE5 との結合モデル

分担研究課題 専ら医薬品の成分と規制範囲に関する研究

分担研究者 大塚 英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

イノモトソウの成分研究に続いて本邦に産する近縁種、オオバノイノモトソウの成分検索を行った。その結果ジテルペン類を単離し、その構造を核磁気共鳴スペクトル等を用いて 2 β ,15 β -dihydroxy-ent-kaur-16-ene 2-O- β -D-glucopyranoside と決定した。さらに、*Pteris* 属に共通に含有される発がん物質プタキロシドの確認およびフラボンをを用いた *Pteris* 属の化学的分類を行った。

研究協力者

広島大学 講師 松浪勝義

広島大学 助教 末吉恵津子

広島大学 助教 Liva harinentenaina

A. 研究目的

鳳尾草（ホウビソウ）（写真1）の基原植物はイノモトソウ科のイノモトソウ（*Pteris multifida*）（写真1）で葉先が鳳凰の尾の形に似ているのがその名の由来である。鳳尾草は医薬品としての使用実態に乏しく、含有成分等からも食薬区分の見直し対象となりえると判断されている。台湾では鳳尾草の入った茶を苦茶と称して、疲労回復、便秘、睡眠不足、美肌、ほてりを冷ますなどとして利用されている。イノモトソウ科植物には食用となる、ワラビも含まれている。ワラビには発癌性成分として ptaquiloside を含有しており、必ず灰汁抜きをして食することになっている。このような観点から、鳳尾草の成分研究を行ったこの関連から今回は近縁植物にオオバノイノモトソウ（*Pteris cretica*）（写真2）の成分研究を遂行する。オオバノイノモトソウはイノモトソウとよく似てはいるが、葉が大きく軸に翼がないのが特徴である。イ

ノモトソウと同様に繁殖葉と栄養葉をもっている。



写真 1



写真 2

B. 研究方法

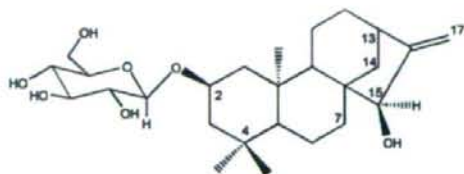
広島市安佐南区にて採集した。粉碎した地上部（459 g）をメタノールで抽出し、抽

出液を濃縮乾固して残渣 34 g を得た。本残渣を水に懸濁して、EtOAc で分配して EtOAc 可溶画分を得た (7.6 g)。本 EtOAc 可溶画分を順相シリカゲル、逆相中圧シリカゲル、逆相 HPLC で分画、精製を行った。得られた化合物は各種スペクトル分析を行い文献値と比較することにより決定した。

C. 研究結果

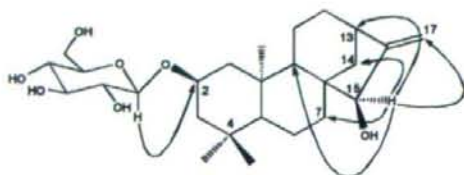
化合物 2 ~ 8 は既知化合物であり、それぞれ luteolin 7-O- β -D-glucopyranoside (2)、2 β ,6 β ,16 α -trihydroxy-*ent*-kaurane 2-O- β -D-allopyranoside (3)、pterosin C (4)、pterosin S (5)、creticoside A (6)、2 β ,16 α -dihydroxy-*ent*-kaurane 2-O- β -D-allopyranoside (7) および apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside (8) と同定した。

化合物 1 は一次元、二次元核磁気共鳴スペクトルを検討の結果、新規ジテルペンの *ent*-kaurene 誘導体 (化合物 1) と結論した。



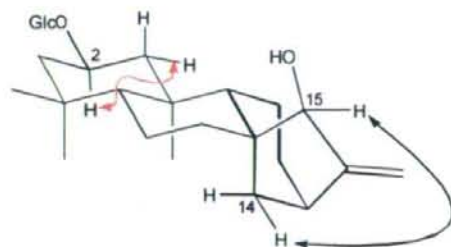
化合物 1

この構造は以下に示す HMBC スペクトルの結果でも支持された。



化合物 1 の HMBC 相関

また、15 位の水酸基の配向は NOESY スペクトルを検討し結論された。



化合物 1 の NOESY 相関

化合物 1 の酵素分解おこない 1a を得て、1 と 1a 間に所謂、グルコシレーション則を適用してみたが、経験則には従わず絶対構造を判別することはできなかった。そこで、1a を PCC 酸化して、生成するケトン体 1b の CD スペクトルを測定し、Cotton 効果の符号より、本ジテルペンは *ent* 系に属することを確認した。

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、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、フラボノイドを用いて植物分類学的考察を加えてみた。その結果、*Pteris* 属は大きく二つに分類される可能性を示している。表 1 に見られるように、フラボンを多く含有する群と含まない群に大別できる。*Pteroside* は一様に含まれているの注意が必要である。

Table 1. Phytochemical investigation of six species of *Pteris*

Species	2, 8	Pterosins	Kauranoids
<i>P. multifida</i> Poir. ^a	+	+	+
<i>P. multifida</i> Poir. ^b	+	+	ND
<i>P. cretica</i> Linn. ^a	+	+	+
<i>P. cretica</i> Linn. ^c	+	+	+
<i>P. tremula</i> R. Br. ^a	-	+	+
<i>P. dactylina</i> Hook ^a	-	+	+
<i>P. angustipinna</i> Tagawa ^a	-	+	+
<i>P. grevilleana</i> Wall. ^a	-	+	-

^aPreviously reported investigation [1]; ^bOur previous investigation [2]; ^cPresent investigation

[1] Murakami, T., Maehashi, H., Tanaka, N., Satake, T., Kuraishi, H., Kamozaawa, Y., Saiki, Y., Chen, C.-M., Yakugaku Zasshi, **105**, 640 (1985).

[2] Harinantnaina, L., Matsunami, K., Otsuka, H., J. Nat. Med., **62**, 452 (2008)

E. 結論

基本的には *Pteris* 属は細胞毒性が見られる
ブテロシン類を多数含むことが確認され、
その利用には注意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harinantenaina L., Matsunami K.
Otsuka H., Chemical constituents of
Pteris cretica Linn. (Pteridaceae).
Biological Systematics and Ecology,
in press

2. 学会発表等

- 1) Liva Harinantenaina、松浪勝義、大塚英昭、Chemical and Biologically Active Constituents from *Pteris cretica* 日本生薬学会第 55 回年会 (2008.9, 長崎)

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

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
～アリストロキア酸含有「フタバアオイ」の遺伝子鑑別試料～

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 昨年度の研究においてアリストロキア酸を検出したフタバアオイ試料のrRNA遺伝子のITS領域に基づくDNA鑑別をPCR-RFLP法を用いて実施した。その結果、本サンプルはフタバアオイではなく、カンアオイである可能性が高いことが明らかになった。含有成分の有無による規制を検討する上で、まず供試材料の確実な同定を行うことが必須である。

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。

そこで昨年度の研究において、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検討した。その結果、フタバアオイ4検体中の1検体からアリストロキア酸を検出した。しかしながら、形態等を検討した結果、本検体のフタバアオイとしての同定に疑問が持たれ、フタバアオイ中のアリストロキア酸の有無については明確な結論を得ることができなかった。

Asarum 属及びその関連植物のリボゾーム遺伝子領域の塩基配列に基づく分子系統学的解析については詳細な研究がある。^{1,2)} そこで、昨年度の研究で供試した検体のリボゾーム遺伝子のITS領域の塩基配列をPCR-RFLP法を用いることによって解析して種同定を行い、昨年度の結果を検証することを目的として研究を実施した。

B. 研究方法

材料

遺伝子解析には、昨年度にフタバアオイとして使用した4検体に加えて、オナガサイシン、および*Asarum* sp.として使用された2検体を対象とした(表1)。このうち、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フタバアオイとして分与された検体の地上部およびオナガサイシンとされた検体の根と茎、*Asarum* sp.とされた検体にアリストロキア酸が検出されている。

DNAの調製

サンプルからのDNAの調製は、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて行った。得られたDNA溶液は、さらにPCR Product Purification Kit (Roche) を用いて精製した。溶液中のDNA濃度は、260nmの吸光度を測定して算出した。

PCRによるITS領域の増幅

ITS1領域は、18S-rDNAの3'-側末端にアニールする共通プライマーとITS1の3'-側にアニールするように設計したプライマーを用いて、ITS2領域はITS2領域の5'-側に設計したプライマーおよび28S rDNAの5'-側末端にアニールする共通プライマーを用いて増幅した(図1)。用いたPCRプライマーの塩基配列は以下の通りで

ある。

ITS1領域 (増幅産物の大きさ 約340bp)

ITS-5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

Acr-1R: 5'-TGCAAGAGCCAAGATATCCGTT-3'

ITS2領域 (増幅産物の大きさ 約300bp)

Acr-2F: 5'-TTTAGGTTGAGGGCAGACCT-3'

ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

PCR増幅産物の制限酵素による切断と分析

PCR反応終了後に、反応液5μLを取ってアガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物の生成を確認した。さらに、反応液の5μLを用いて制限酵素消化を行った。いずれの制限酵素に関しても反応に用いる酵素量は10unit、反応液量は20μLとした。37℃で1時間反応後に色素液2mLを加え、4%アガロースゲル電気泳動を行って反応物を分離した。反応産物は、臭化エチジウム染色によって検出した。

C. 結果

DNAデータベースから取得したフタバアオイ (*Asarum caulescens*)、カンアオイ (*Heterotropa nipponica*)、ウスバサイシン (*Asiasarum sieboldii*)、ケイリンサイシン (*Asarum heterotropides* var. *mandshuricum*)、オナガサイシン (*Asarum caudigerum*) のリボゾーム遺伝子の塩基配列に基づいてITS1およびITS2領域の制限酵素地図を作成した(図2、図3)。その結果、各植物由来のITS領域をPCR増幅し、その増幅産物を各種の制限酵素で切断したときのバンドパターン(表2)からこれらの種鑑別が可能であることが明らかになった。

まず、各検体から全DNAを調製して、PCRによりITS1、ITS2領域の増幅を試みた。種々の植

物標本から簡便にPCR-dradeのDNAを調製できる試薬として当研究室で繁用しているAmpdirect Plus (Shimadzu) を用いたところ、PCR産物の増幅は全く認められなかった。そこで、種々の方法を試みた結果、DNeasy Plant Mini Kitを用い、さらに得られたDNA溶液をさらにガラスビーズ法を用いて精製したDNAを鋳型とした場合にはじめてPCR増幅産物を得ることができた。

得られたPCR産物はそのまま各種制限酵素による消化反応に用いた。

結果の一部を図4と図5に示した。図4は、ITS1領域を制限酵素Dde Iによって切断した結果を示している。すべての試料で増幅産物は約220bpと120bpの2つの断片に切断されており、これらの試料にウスバサイシンは存在していないことを示している。図5は、ITS2領域を制限酵素Eco T22Iで切断した結果を示している。フタバアオイとされた試料A～DのうちA、B、Dでは約210bpと130bpという、フタバアオイの塩基配列から予想される断片を生じた。一方、試料Cでは、約280bpと60bpのサイズを示す2つの断片を生じた。この切断パターンは、カンアオイのITS領域の塩基配列から予想されるものと一致した。一方、試料E～Gでは増幅産物の切断は認められなかった。Dde Iによる切断結果とあわせて考えると、これらの試料はケイリンサイシンまたはオナガサイシンに相当する可能性が考えられる。

D. 考察

昨年度の研究において、フタバアオイ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。この結果は、フタバアオイでのaristolochic acid I含有の有無については、種の同定を正しく行ったうえで判断することが必要であり、また、フタバアオイを「専ら医薬品」のカテゴリーから外す際には、このように近縁植物にアリストロキア酸含有の可能性があることから、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。

本年度の研究においては、*Asarum*属植物及びその近縁植物はリボゾーム遺伝子のITS領域の塩基配列情報の集積が進んでいることに着目して、簡便なPCR-RFLPによる昨年度のサンプルのDNA鑑別を試みた。

供試した試料からのDNAの調製はやや困難で、最も簡単なAmpdirect Plusを用いて調製したサンプルではPCR産物が全く得られず、CTAB法を基礎としている他のキットを用いて調製したDNAをさらにSilica matrixへの吸着を利用して精製してはじめて、PCR産物を得ることができた。

図2と図3および表1に示すように、ITS1およびITS2の2つの領域について7種類の酵素を用いて検討することにより、5種の植物についてはほぼ鑑別することが可能であると考えられる。これまでの結果から、aristolochic acid Iを地上部に多量に含有していたサンプルCはフタバアオイではないことが確認された。現時点では、形態学的な再検討によって推定されたカンアオイの切断パターンと一致しているが、なお詳細な検討が必要である。また、塩基配列を解

読することによって、確実な種同定を行うことも必要である。

E. 結論

昨年度の研究においてフタバアオイとされながら多量のアリストロキア酸を含有していたサンプルは、フタバアオイではないことがPCR-RFLPを用いたDNA鑑別によって確認できた。

この結果は、「専ら医薬品」の範囲について検討するという本研究の目的を遂行する上で、使用する材料の同定を確実に行わないと誤った結論を導き可能性があることを示している。

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 菱田敦之博士、東京大学大学院理学系研究科附属植物園育成部 出野貴仁博士に感謝いたします。

G. 参考文献

- 1) Yamaji, H., Fukuda, T., Yokoyama, J., Pak, J.H., Zhou, C.Z., Yang, C.S., Kondo, K., Morota, T., Takeda, S., Sasaki, H., Maki, M.,

Reticulate evolution and phylogography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Mol. Phylogenetics Evolution*, **44**, 863-884 (2007).

- 2) Kelly, L.M., Phylogenetic relationship in *Asarum* (Aristolochiaceae) based on morphology and ITS sequences. *Am. J. Botany*, **85**, 1454-1467 (1998).
- 3) White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In; Innes, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (eds.) *PCR protocols, a guide to methods and amplifications*, 315-322, Academic Press, San Diego, CA (1990).

H. 研究発表

なし

J. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 実験に使用したサンプル一覧

サンプル名	入手先	アリストロキア酸含有部位
A フタバアオイ	東京大学大学院理学系研究科附属植物園	n.d.
B フタバアオイ	東京大学大学院理学系研究科附属植物園	n.d.
C フタバアオイ	医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究所	地上部
D フタバアオイ	名古屋市立大学大学院薬学研究科附属薬用植物園	n.d.
E オナガサイシン	東京大学大学院理学系研究科附属植物園	根・茎
H <i>Asarum</i> sp.	東京大学大学院理学系研究科附属植物園	根
I <i>Asarum</i> sp.	東京大学大学院理学系研究科附属植物園	根
n.d., 非検出		

表2 ITS1およびITS2領域を各種制限酵素で切断したときに生じる断片の大きさ(bp)

	ITS1					ITS2	
	<i>Dde</i> I	<i>Eco</i> T22I	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> II	<i>Xho</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Sal</i> I
フタバアオイ	220 + 120	210 + 130	340	340	340	300	300
カンアオイ	220 + 120	280+60	340	260 + 80	240 + 100	150 + 150	300
ウスバサイシン	340	340	340	260 + 80	340	150 + 150	230 + 70
ケイリンサイシン	220 + 120	340	340	260 + 80	340	150 + 150	230 + 70
オオナガサイシン	220 + 120	340	170 + 170	340	340	300	230 + 70

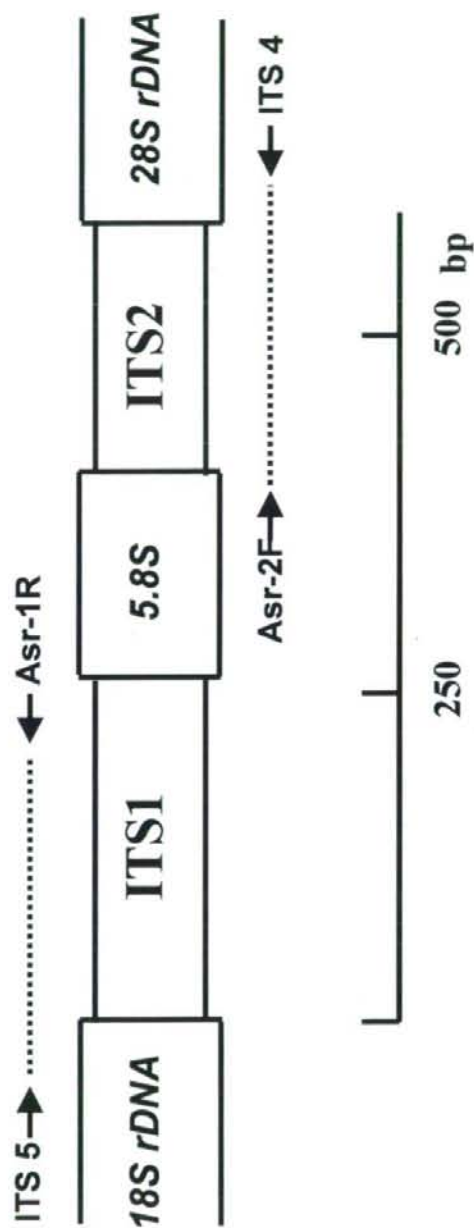


図1 核ゲノム上のrRNA遺伝子の構造

PCR増幅に用いたプライマーのアニール位置を矢印で示した。

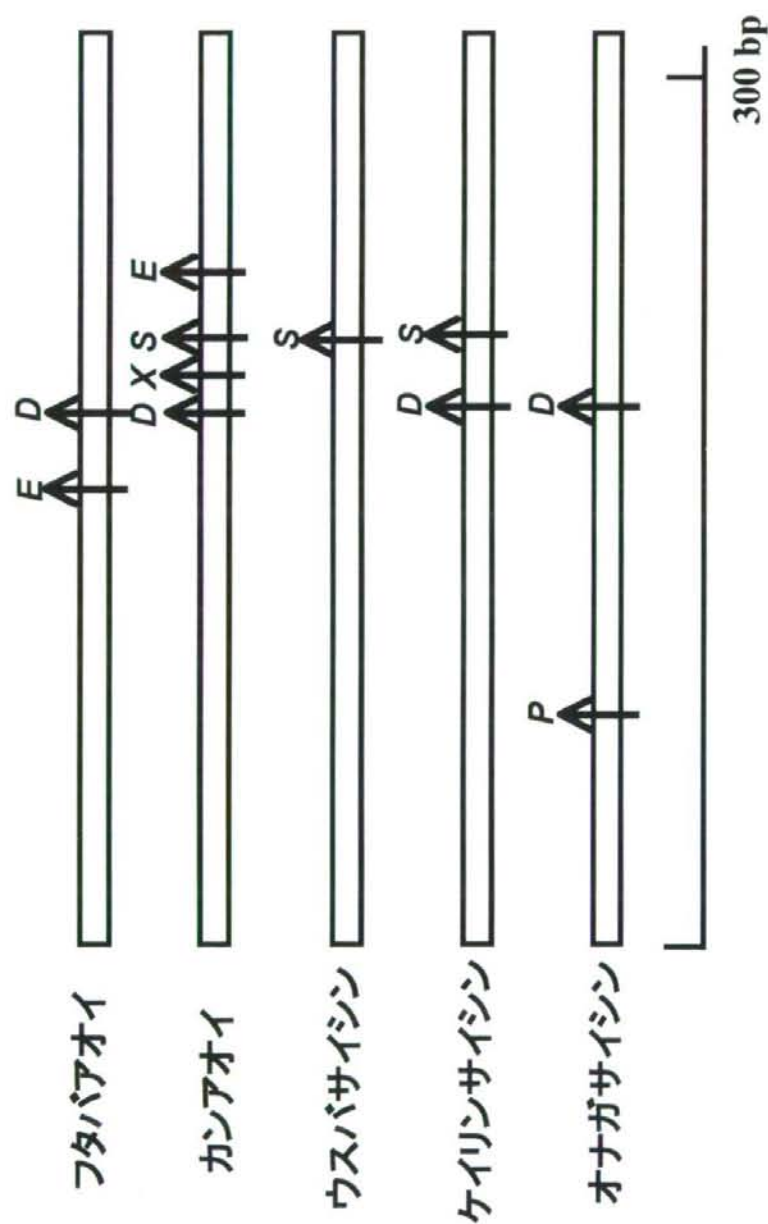


図2 ITS1領域の制限酵素地図

D, Dde I; E, Eco T22I; P, Pst I; S, Sac II; X, Xho I

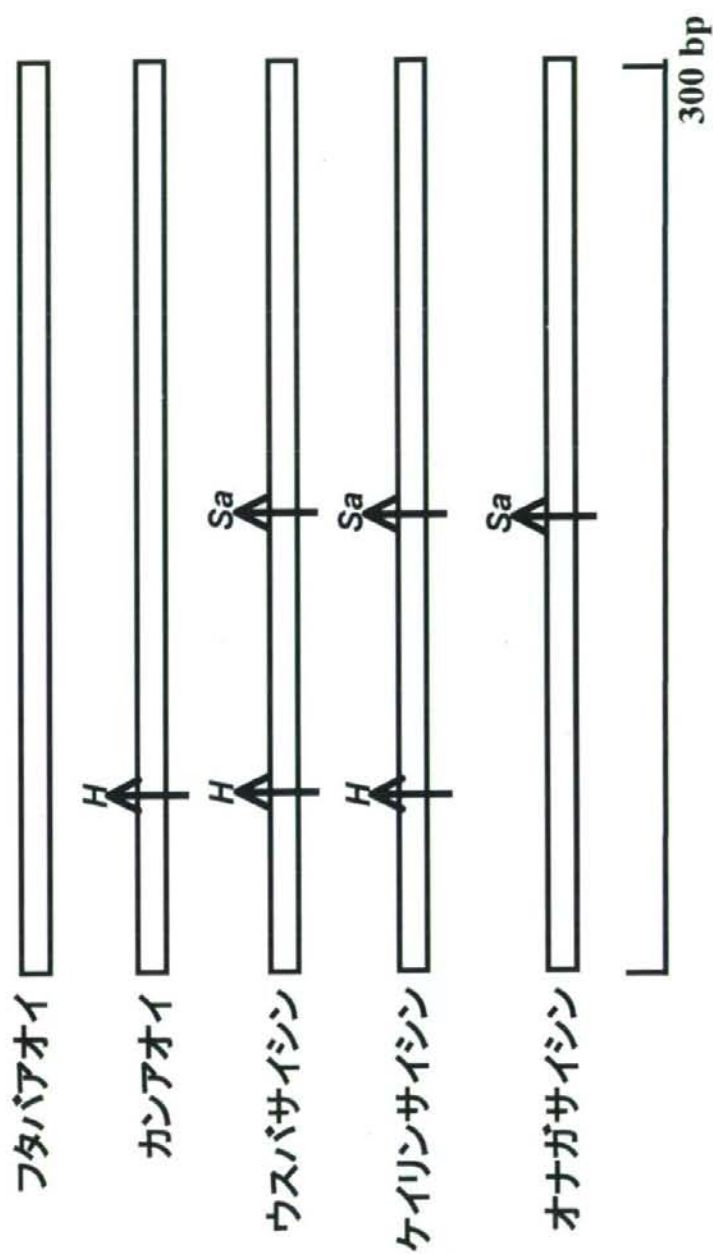


図3 ITS2領域の制限酵素地図

H, *Hha* I; Sa, *Sal* I

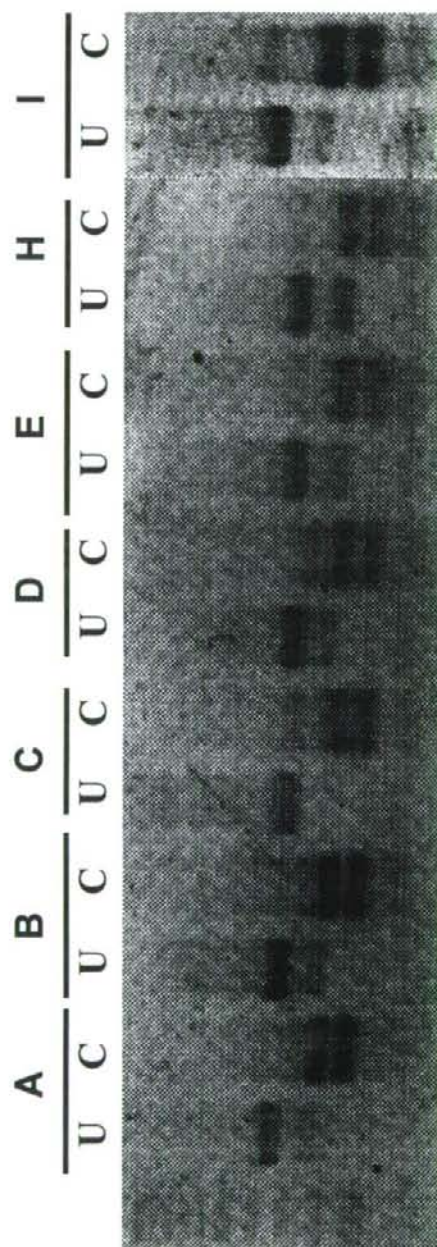


図4 各試料から増幅したITS1領域の*Dde* IIによる切断パターン

U, before digestion; C, after digestion

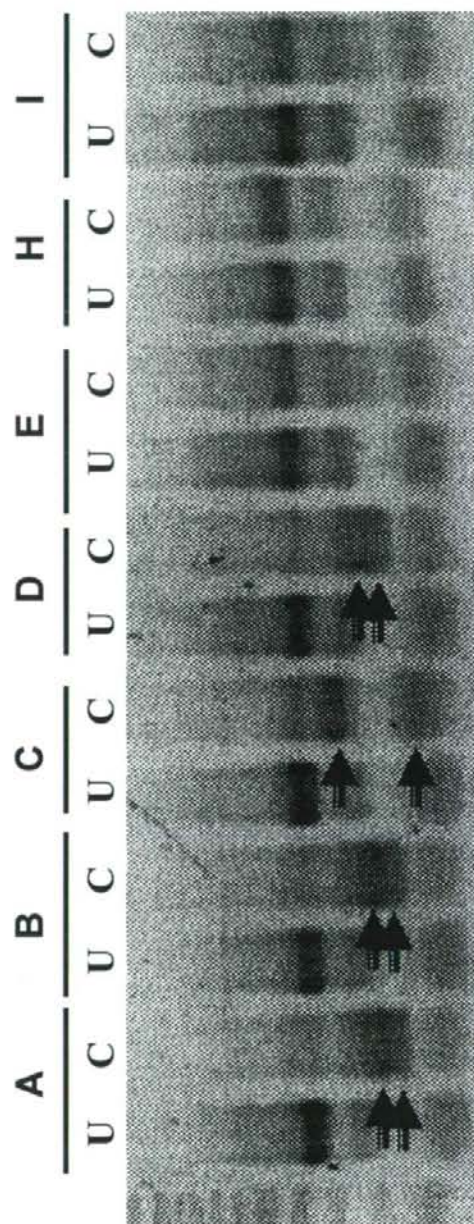


図5 各試料から増幅したITS2領域の*Eco* T22IIによる切断パターン

U, before digestion; C, after digestion

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
Uchiyama, N. 他	Determination of a New Type of Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Thioquinapiperifil, in a Dietary Supplement Promoted for Sexual Enhancement	Chem. Pharm. Bull.	56(9)	1331-1334	2008
Tokumoto, H. 他	Morphological Discrimination of <i>Curcuma longa</i> L. and <i>Curcuma aromatica</i> Salisb	Shoyakugaku Zasshi	62(2)	54-65	2008
Makino, T. 他	Comparison of the Major Flavonoid Contents of <i>S. baicalensis</i> , <i>S. lateriflora</i> and Their Commercial Products	J. Nat. Med.	62(3)	294-299	2008
Kumasaka, K. 他	Determination of (<i>R</i>)-Xanthoantrafil, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, in a Dietary Supplement Promoted for Sexual Enhancement	Chem. Pharm. Bull.	56(2)	227-230	2008
Hasegawa, T. 他	Structural Elucidation of a Tadalafil Analogue Found in a Dietary Supplement	J. Food Hyg. Soc. Jpn.	49(4)	311-315	2008
Harinantenaina, L. 他	Chemical and Biologically Active Constituents of <i>Pteris multifida</i>	J. Nat. Med.	62(4)	452-455	2008
Maruyama, T. 他	Botanical Origin of Indian Celery Seed (Fruit)	J. Nat. Med.	63(2)	in press	2009
Hasegawa, T. 他	Isolation and Structural Elucidation of Cyclopentynafil and <i>N</i> -Octylnortadalafil Found in a Dietary Supplement	Chem. Pharm. Bull.	57(2)	185-189	2009
Kawakami, S. 他	Chemical Constituents of Imported <i>Rosae</i> Fructus	J. Nat. Med.	63(1)	46-51	2009

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	128(6)	837-838	2008
Goda, Y. 他	Erectile Dysfunction Drug Ingredients and Related Compounds Found in Health Foods and Their Adverse Effects	Functional Food	2(2)	198-202	2008