

アレキサンドリアセンナ *C. acutifolia* (2009-10-C1, 2009-10-C2), チンネベリセンナ *C. angustifolia* (2009-10-D1, 2009-10-D2).

富山大学薬学部附属薬用植物園栽培品。2009年10月に採集し腊葉としたものを使用。

## 2. 使用機器と試薬

### 2.1 機器

外部形態の観察にはルーペおよびキーエンスデジタルマイクロスコープズームレンズ(VH-Z25)を用い、10~175倍(=15インチモニター上での倍率)にて観察、内部形態および粉末の観察には、オリンパス光学顕微鏡BH-2を用い、常光および偏光下で観察した。切片の作成には凍結マイクローム(ヤマト光機工業)を使用した。キーエンスデジタルマイクロスコープ(KEYENCE VH-8000C)を用い、測定および写真の撮影を行なった。

### 2.2 試薬

封入剤としてグリセリン水(グリセリンと精製水を1:1で混合したもの)を使用した。

## 3. 方法

### 3.1 材料の調製

種子島より入手した株は株の中央部、先端部および基部を含む数箇所から、茎、葉軸を採取し、風乾して試料とした。必要に応じて切断した試料を、そのまま、または暫時水に浸した後、最外層を徒手により剥離して切片を作成した。組織片を水に浸す時間は、5~10分程度を目安とし、組織の吸水が不十分で、薄い切片が作成できない場合、または鏡検に際し、気泡が多数存在し観察の妨害となる場合には、適宜延長した。さらに茎、葉軸の粉末を作成し、重量百分率で50%、20%、5%、4%の葉軸を含有するよう茎の粉末と葉軸の粉末を混合し、試験粉末として、葉軸組織の鑑定の可否を検討した。試料が少量であったため、各粉末の篩過は行なわず80号篩通過相当の粒度の粉末を作成し、使用した。また、昨年度作成した一時プレパラートを参考として使用した。

富山大学より提供を受けた乾燥品は、茎、葉軸の表皮を剥離した切片および、80号篩通過相当の粒度の粉末を作成し鏡検を行なった。葉軸の表皮細胞の観察には、主として稜から葉軸の側面に相当する部位の表皮を剥離して、観察に供した。

### 3.2 プレパラートの作成および鏡検

#### 3.2.1 剥離表皮および切片

徒手により剥離した表皮は、スライドガラス上にとり、

封入剤としてグリセリン水を1~2滴滴下した後、気泡が封入されないようカバーガラスで覆い、40倍、100倍、400倍で鏡検し、計測を行なった。表皮の剥離切片は気孔の副細胞、ならびに毛の周囲の表皮細胞を除く、ほぼ連続した10個の表皮細胞について、測定した長軸方向の径を比較検討に用いた。さらに同一視野および同一切片中に出現した気孔について、長軸方向の径(孔辺細胞の長径)を測定し、表皮細胞との比較に用いた。400倍で鏡検した際の視野あたり、または撮影した写真(対物レンズ40倍×FKレンズ2.5倍)1枚中に出現する気孔の数を、気孔の分布の目安とした。

#### 3.2.2 粉末

時計皿にグリセリン水を数滴滴下し、ここに少量の試料をとりガラス棒でかき混ぜた後、2~3分以上放置して気泡を除いた。この少量をガラス棒の先でスライドガラスにとり、封入剤としてグリセリン水を1滴加えた後、組織片が重ならずほぼ均等に広がるようカバーガラスで覆い、100倍および400倍で鏡検した。

表皮組織を中心に観察を重ね、気孔を伴う表皮の破片は、気孔と表皮細胞の大きさの関係について目視により確認すると共に、副細胞および毛の周囲の細胞を除く表皮細胞について、長軸方向の径を測定した。気孔を伴わない表皮細胞の破片は長径の測定を行ない、参考とした。

#### 3.2.3 顕微鏡写真の撮影

特徴的な要素について顕微鏡写真を撮影し、組織の比較を行なった。

## C. 研究結果および考察

### 1. 外部形態

種子島より入手し、世田谷区にて栽培を続けていた株には腺毛と思われる球状の毛が認められ、採取直後としばらく時間が経過したものでは、分布の状態が異なっていることを報告した。センナにこのような毛が存在することについては、過去に報告がなく、詳細は明らかではなかった。センナの葉には分泌物も見られるため、本年度は、この毛と思われる組織について乾燥後の形態の変化を経時的に観察し、詳細を確認した。乾燥した茎および葉軸の表面の状態をFig.1に示す。

採取直後、および展開後間もない葉に見られた毛と思われる組織は、風乾後確認できる数が減少し、内容物の状態の変化により萎むのではないかと考えられたが、詳細な観察の結果、数は減少し

ているが、一部のものは形状を維持し、充分日数の経過した検体においても、観察が可能であった。昨年度は、粉末中でこの組織を確認することができず、特徴として示すことはできなかったが、出現する可能性のある要素であると考えられ、粉末中で出現を認めた際には、センナの特徴としてあげることが可能と考えられる。

充分乾燥した検体における球状毛は、アレキサンドリアセンナ (*Cassia acutifolia*)、チンネベリセンナ (*C. angustifolia*) に同様に認められた。

## 2. 内部形態

### 2.1 由来の異なる株における表皮細胞の形状の同等性

#### 2.1.1 茎 (Fig.2-3)

富山大学薬学部附属薬用植物園より入手した検体の表皮細胞の形態的な特徴を Fig.2-3 に示す。Fig.2 はアレキサンドリアセンナの茎および葉軸の比較、Fig.3 は同様にチンネベリセンナの比較である。

アレキサンドリアセンナの腊葉標本より、側枝のほぼ中央部の表皮を剥離して観察を行なった。気孔が分布する部位には、主としてほぼ方形～等径性多角形の表皮細胞を認めた。気孔は長軸方向に規則的に配列するが、その分布はまばらであった。気孔の周囲には、主として 5～6、おおむね 4 以上のやや小型の細胞からなる副細胞が認められた。副細胞は近接した表皮とほぼ同様の形状を示したが、円形に配列し、特徴的であった。毛および毛の基部付近の細胞は、長軸方向に長いものや放射状に配列するものがあり、周囲の表皮細胞とは形態を異にしていた。チンネベリセンナにおいても同様の特徴を認めた。

表皮細胞の長軸方向の径の平均はアレキサンドリアセンナで、 $28.0\ \mu\text{m}$ 、チンネベリセンナでは  $20.8\ \mu\text{m}$  であった。気孔(孔辺細胞)の径は、それぞれ  $35.5$ 、 $26.1\ \mu\text{m}$  を示し、アレキサンドリアセンナでは昨年度鏡検に使用した栽培品よりやや大きな数値を示したが、いずれの種も表皮細胞に比べ気孔のほうが大きかった。この結果は、既に報告した茎の特徴と良く一致していた。各部位における表皮細胞と気孔の長軸方向の径を Table 1. に示す。さらに、測定した表皮細胞の長軸方向の径の値の分布状態についても、アレキサンドリアセンナの茎では、90%以上の表皮細胞が、 $35\ \mu\text{m}$  に

至らず、チンネベリセンナにおいてはほぼ全ての表皮細胞が  $30\ \mu\text{m}$  にいたらず、これを超えるものは全体の 2%に満たないことが判明した。この結果も既に明らかにした、茎の表皮細胞の大きさの傾向と良く一致していた。表皮細胞の径の累積百分率を Table 2. に示す。

#### 2.1.2 葉軸 (Fig.2-3)

稜から葉軸の側面に相当する部位にかけての表皮細胞を剥離して観察したところ、長軸方向に長い長方形～長六角形の表皮細胞よりなり、背軸面に近いほど、長径の大きい細胞が多く認められた。気孔はほぼ長軸方向に配列、主として 5～6 個の円形に配列した副細胞に囲まれていた。毛の基部付近の表皮細胞は放射方向に配列し、他に比べ長く特徴的であった。気孔は 1 枚の写真中にはおおむね 1～2 個認められ、栽培品に比べ少なかった。表皮細胞の平均径は、アレキサンドリアセンナ  $43.1\ \mu\text{m}$ 、チンネベリセンナ共に  $35.3\ \mu\text{m}$  を示し、栽培品に比べ大型であった。気孔も栽培品に比べやや大型で、それぞれの平均径は  $35.8\ \mu\text{m}$ 、 $32.6\ \mu\text{m}$  を示した。また測定に用いた表皮細胞の約 80%以上のものは、 $30\ \mu\text{m}$  よりも大型であった。この結果は、既に報告した葉軸の特徴と良く一致していた。

#### 2.1.3 小括

以上の結果は、系統及び栽培環境の異なる株においても、茎および葉軸を鑑別するための形態的特徴に異変はないとする結論を強く示唆するものである。

### 2.2 茎、葉軸を混合した試験粉末における表皮細胞の出現状況

植物体によらず、細胞の形状が鑑別の特徴として扱えることが明らかとなったため、昨年度入手したアレキサンドリアセンナを用いて茎および葉軸の粉末を作成し、種々の割合で混合した試験粉末について、鑑別の可否および精度を検討した結果、50%混合したものでは、表皮片の出現頻度は比較的多く、検出した表皮破片のおよそ半数のものが葉軸由来の表皮であることを判別できた。葉軸の混合割合を 4～5%とした場合にも、気孔より大型の長楕円形の表皮細胞からなる表皮片は特徴的であり、判別することが可能であった。

以上の結果より、粉末となったセンナの葉軸の鑑別方法は有用な方法であると考えられる。これを活用し、今後は近縁種からの鑑別、さらには、多種

類の植物が配合されている実際の市場品での鑑別を行うこと試みたいと考える。

## E. 引用文献

- 1) Kojima T., Kishi M., Sekita S. and Satake M., J. Food. Hyg. Soc. Japan, **41**, 303-306(2000).
- 2) Yokota Y., Terasaki S. and Tsuno T., Annual Report of Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research, **32**, 45-51 (2005).
- 3) Morikawa M., Kosaka T. and Nakamura K. Annual Report of Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, **18**, 66-69 (2006).
- 4) Ishii T., Saijo M., Hasegawa T., Takahashi K., and Nagata T., Abstracts of papers, 45th “Zenkoku Eisei Kagaku Gijutsu Kyogikai” Saga, Nov. 2008, pp.203-204.
- 5) Suzuki S., Arakane M., Yoshizawa M., Kitagawa S., Shiota H., Sato Y., Kishimoto S., Mori K. and Hagino S., Abstracts of papers, 45th “Zenkoku

Eisei Kagaku Gijutsu Kyogikai” Saga, Nov. 2008, pp.205-206.

- 6) Takanashi M., Sakai E., Tanaka T., Maruyama Y., Arao M., Morinaga H., Abstracts of papers Vol.2, 128<sup>th</sup> Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Yokohama, Mar. 2008, p.4.

## F. 研究発表

### 1. 誌上发表

- 1) 鏡検による粉末センナ茎と粉末センナ葉軸の鑑別, 徳本廣子, 下村裕子, 飯田 修, 袴塚高志, 合田幸広, 生薬学雑誌, accepted.

### 2. 学会発表等

- 1) 徳本廣子, 下村裕子, 飯田 修, 合田幸広, 鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別, 日本生薬学会第56年会(2009年10月, 京都)

Table 1. Diameters ( $\mu\text{m}$ ) of longitudinal axis of epidermal cells and the adjacent stomatal cells (guard cells) of stems and leaf rachises of Alexandrian senna and Tinnevelly senna

	Alexandrian senna		Tinnevelly senna	
	Stems	Leaf rachises	Stems	Leaf rachises
Epidermal cells	18.5-28.0-37.8*1	19.9-43.1-71.1	12.2-20.8-28.7	17.8-35.3-50.1
	20.9-26.7-35.7*2	12.4-21.0-29.9	10.9-15.8-24.8	9.3-13.4-20.6
Stomatal cells (guard cell)	28.3-35.5-38.9*1	26.8-35.8-42.4	20.8-26.1-29.3	28.3-32.6-36.0
	E<S*3	E>S	E<S*3	E>S

\*1 Diameters of longitudinal (long) axis direction. Each set of values represents the minimum-average-maximum.

\*2 Diameters of lateral (short) axis direction. Each set of values represents the minimum-average-maximum.

\*3 Comparison of the average diameters in longitudinal axis of epidermal cells(E) and stomatal cells(S).

Table2. Accumulative percentages of longitudinal axis diameters of the epidermal cells in the stomata distributional region in stem and leaf rachis of Alexandrian senna and Tinnevelly senna

Diameters ( $\mu\text{m}$ )*1	Alexandrian senna		Tinnevelly senna	
	Stems	Leaf rachises	Stems	Leaf rachises
0~5				
~10			2.5%	
~15			16.3%	
~20	16.7%	1.5%	57.5%	2.4%
~25	43.3%	4.5%	85.0%	8.3%
~30	66.7%	9.0%	98.8%	22.6%
~35	90.0%	19.4%	100.0%	48.8%
~40	100.0%	40.3%		69.0%
~45		58.2%		91.7%
~50		77.6%		96.4%
~55		88.1%		98.8%
~60		91.1%		100.0%
~65		95.5%		
~70		98.5%		
~75		100.0%		
~80				
~				

\*1 Longitudinal axis direction of epidermal cells.

Fig. 1 センナの茎, 葉軸に見られた毛の状態

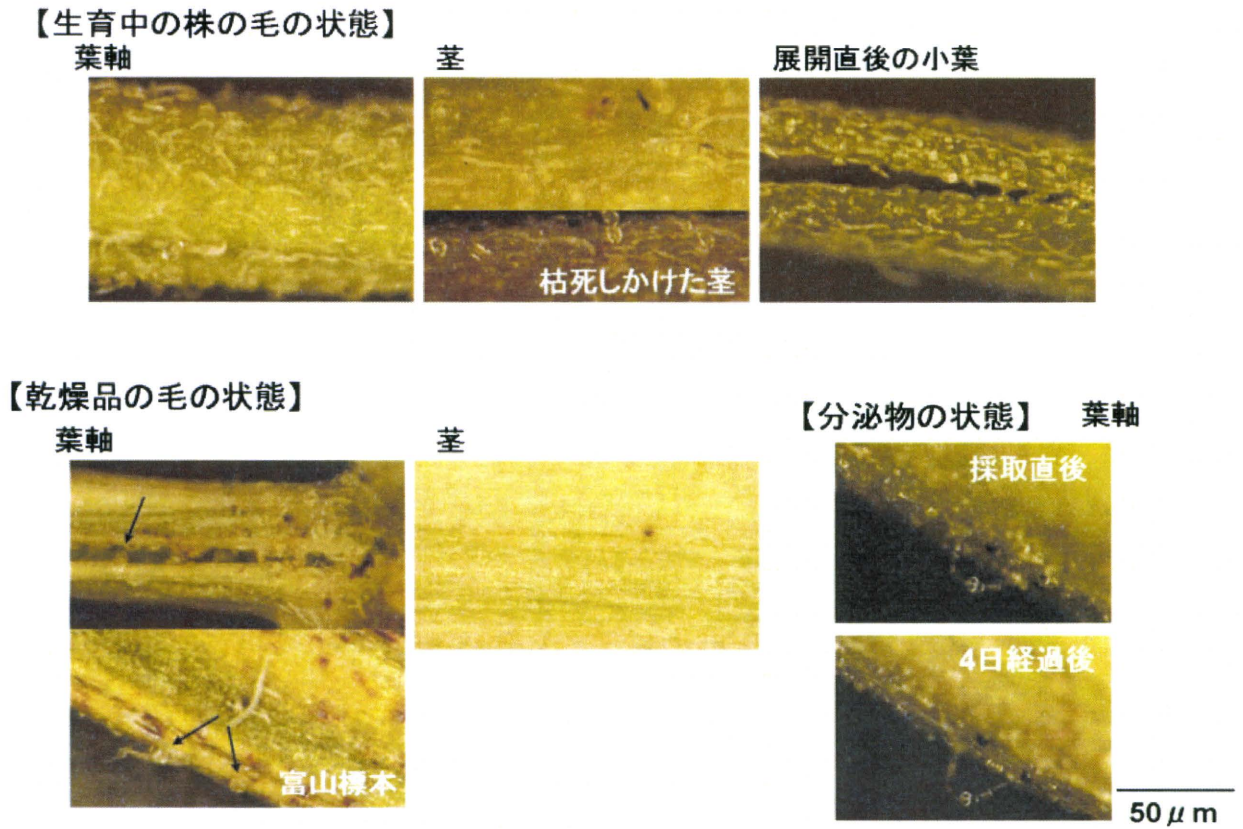


Fig. 2 アレキサンドリアセンナの茎および葉軸の表皮細胞

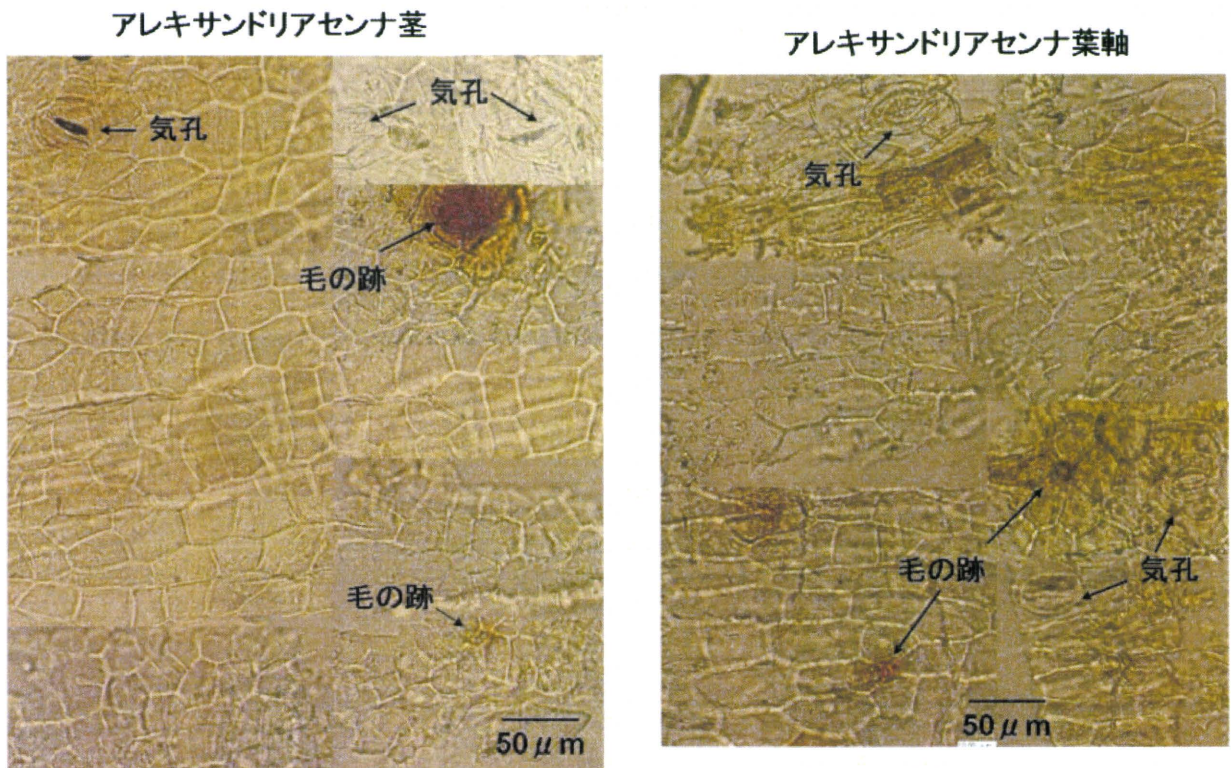
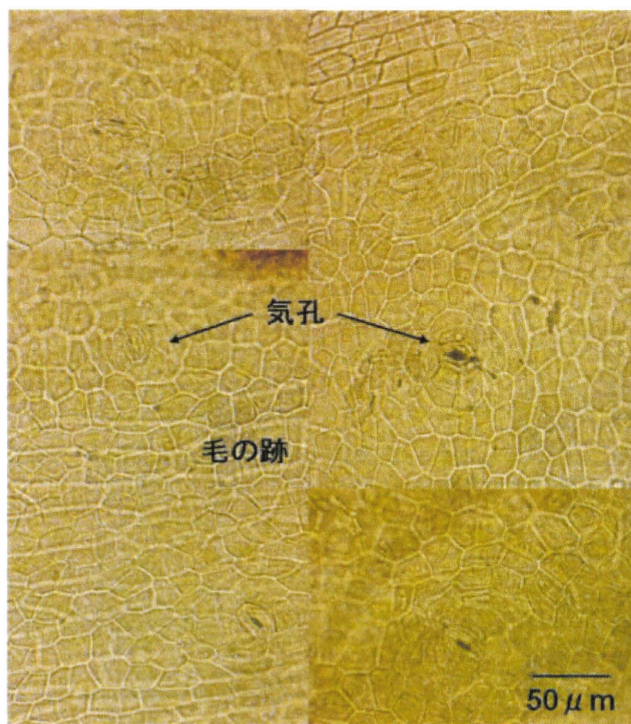
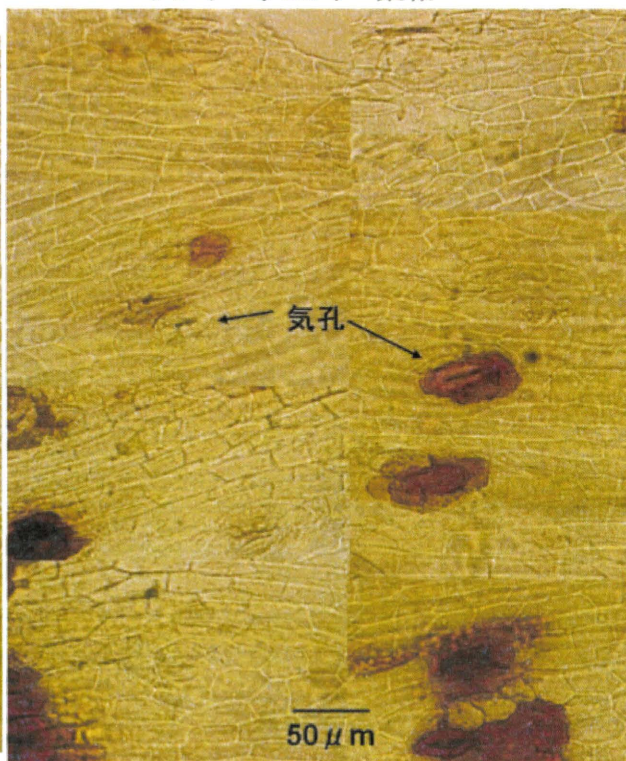


Fig. 3 チンネベリセンナの茎および葉軸の表皮細胞

チンネベリセンナ 茎



チンネベリセンナ 葉軸



分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析，有害性評価に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部部長 合田 幸広

市場に流通するキャツクロ製品の原料植物と成分について

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長 丸山 卓郎

研究要旨 食薬区分に関する正確な情報を入手するため，健康食品として流通するキャツクロ製品について，DNA 配列解析による原料植物の鑑別と LC-PDA-MS による含有アルカロイドの分析を行った。その結果，上記製品には，本来の原料である *Uncaria tomentosa* の他に，別の植物の混入が認められた。また，含有アルカロイドのパターンにも違いが見られた他，一日摂取目安量に換算したアルカロイド摂取量も，各製品により，大きく異なる事が明らかとなった。

#### A. 研究目的

近年，国民の高齢化，生活水準の向上，そしてそれに伴う疾病構造の変化に伴い，自身の健康について，自身で管理を行い，軽度の体調不良については自分で手当を行うという，セルフメディケーション（self-medication）の考え方が，国民の間に浸透しつつある。Self-medication の言葉が示す通り，この言葉は，アメリカ合衆国発であり，その思想の背景には，容易に医療機関を受診する事が難しい，アメリカの医療保険制度の脆弱さが見て取れる。一方，国民皆保険がほぼ達成されている我が国において，セルフメディケーションの思想が浸透した背景には，上述した国民の急激な高齢化と生活水準の向上により，糖尿病やメタボリックシンドロームを初めとする生活習慣病や，アレルギーを初めとする自己免疫疾患など，現代医学では難治性の慢性疾患の増加が挙げられる。また，近年，生活水準が二極化し，貧

困層が拡大した事も，セルフメディケーションの考え方が浸透した一つの要因と思われる。

現在のアメリカ合衆国が，医療保険制度が脆弱であるが故にセルフメディケーションの思想が醸成されたのと同様に，我が国においても，現在の国民健康保険制度成立以前には，各家庭により，セルフメディケーションが行われ，その主な担い手は，薬局で販売される一般薬並びに配置薬であった。一方，現在のセルフメディケーションの担い手としては，従来からの一般薬，配置薬に加え，健康食品が，広く国民に受け入れられ，需要を伸ばしている。

健康食品の中には，保健機能食品の様に，厚生労働省が個別に許可あるいは，規格基準を設けているものから，メーカーが独自に機能性を謳っているものまで，様々であり，昨今，特に需要を拡大しているのは后者である。このものは，行政上，一般の食品と取り扱いが変わらない事から，保健機能食品と区別し，「いわゆる

健康食品」と呼称されている。メーカーが独自に謳う機能性には、科学的根拠が明確なものから、曖昧なものまで、玉石混淆であり、中には、医薬品成分及びその類似化合物が混ぜ込まれているもの<sup>1)</sup>や、原料植物が誤っているもの<sup>2-4)</sup>が見出されている。

このような背景から、本研究では、食薬区分に関する正確な情報を入手する目的で、現在、健康食品市場に非常に多くの製品が流通する cat' s claw を取り上げた。

Cat' s claw は、中南米原産のアカネ科植物、*Uncaria tomentosa* の茎皮を乾燥させたものである。アメリカ合衆国では、50 以上の健康食品メーカーが、cat' s claw 製品を販売しており、その効能は、化膿、関節炎、喘息、腫瘍、化学療法剤の副作用緩和、避妊、解熱、胃潰瘍、月経不順など、多岐に渡っている（日本国内で販売される cat' s claw 製品は、食品であるため、医薬品的効能効果の表示は、薬事法により禁止されている）<sup>5)</sup>。その主な含有成分は、oxindole alkaloid 類であり、5 環性の化合物として、pteropodine, isopteropodine, speciophylline, uncarine F, isomitraphylline などが、4 環性化合物として、rhynchophylline, isorhynchophylline, corynoxine などが知られている (Fig. 1)<sup>5)</sup>。また、その他の特徴的な成分として quinovic acid 配糖体類や triterpene 類が報告されている<sup>6)</sup>。しかしながら、*U. tomentosa* の含有アルカロイドには、2 つの chemotype が知られており、一方は、5 環性の oxindole 類を主とするもの (POI type)、他方は、4 環性の oxindole 類を主とするもの (TOI type) である (Fig. 1)。この 2 つの chemotype は、同一個体においても、採集時期により POI type、

TOI type のどちらも示す事が知られており、どのようなメカニズムで chemotype が決定されるかは、未だ不明である<sup>7)</sup>。実験薬理的観点からは、5 環性の oxindole alkaloid 類が、リンパ球増殖因子の生成を促進するのに対し、4 環性の oxindole alkaloid は、それを妨げる働きを有する事が知られている<sup>5)</sup> ことから、cat' s claw 製品の中には、5 環性の oxindole alkaloid のみを含有する事を謳った製品も見受けられる。

従って、cat' s claw 製品にとって、含有アルカロイドの分析は、品質管理の上で、欠かせないステップである。また、*U. tomentosa* の主産地であるペルーでは、同属植物である *U. guianensis* も分布し、両者は、しばしば混同される。従って、原料植物の鑑別もまた、cat' s claw 製品の品質管理上、重要な要素と考えられる。

そこで本研究では、国内の市場に流通する cat' s claw 製品を購入し、遺伝子解析による原料植物の同定を行うとともに、LC-PDA-MS 分析による含有アルカロイドの調査を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料

本研究に使用された cat' s claw 製品の詳細を Table 1 に示した。これらは全てインターネット上の販売店より購入された。

### 2. 実験方法

#### 2-1. DNA 配列解析

粉碎した試料、20 mg より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。このものを鋳型とし、*Uncaria* 属植物の核 rDNA ITS 領域あるいは、全植物の葉緑体 DNA



*trnL-F* 領域に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする rDNA ITS 領域あるいは *trnL-F* 領域を含む DNA 断片を増幅した。ただし、*trnL-F* 領域については、*trnL* intron 領域と *trnL-F* intergenic spacer (IGS) 領域に分けて増幅を行った。また、いずれの領域も nested PCR 法を用いて増幅した。PCR は、Ampdirect Plus (Shimadzu)-Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck) の系を用いて、以下の温度プログラムにより行われた：95°C 10 min; 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 40 cycle; 72°C 7 min. 得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit (Qiagen) により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。ダイレクトシーケンスにおける PCR 産物の蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems) により行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

## 2-2. 成分分析

### a) 試料調製

各試料を粉砕し、その 10 mg にメタノール 4 mL を加え、15 分間振とう抽出した。遠心後、上清を分取し、残渣に再びメタノールを 3 mL 加え、同様に処理した。さらに、メタノール 2 mL を加え、同様に処理した後、抽出液を合わせ、内標準物質として 10 µg/mL の betamethasone 1 mL を加え、10 mL でメスアップした。このものを試験溶液とし、1 µL を LC-PDA-MS へ導入した。

### b) LC-PDA-MS 分析

装置に LCMS-2020 (Shimadzu) を、カラムに Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm; Waters) を用いた。移動相は、30 mM ギ酸緩衝液 (pH 3.5) を A 液、アセトニトリル/メタノール混液 (1/1) を B 液とし、流速 0.2 mL/min で送液し、以下のグラジエントプログラムを用いた：7% B (0 min)-45% B (10 min)-100% B (13 min)-100% B (15 min)。カラムオーブンは、40 °C、PDA 検出器の測定波長は、190-800 nm とした。質量検出器は、イオン化に ESI のポジティブモードを用い、検出器電圧 0.95 kV、ネブライザーガス流量 1.5 L/min、脱溶媒ガス 15.0 L/min (いずれも N<sub>2</sub>)、DL 温度 250°C、ヒートブロック温度 200°C で使用した。測定は、*m/z* 369, 385, 393 の SIM モードで行い、各試料について 3 回繰り返し分析を行った。ピーク同定に用いた各アルカロイドの標品は、5 環性アルカロイドの 6 化合物は、Ca-18 から単離し、<sup>13</sup>C-NMR 及び MS により同定した。4 環性アルカロイドである rhynchophylline は、キシダ化学より購入した。

## C. 研究結果

### 1. DNA 配列解析

塩基配列解析は、製品中に植物組織が含まれていると推定された 10 検体 (Ca-2, 3, 5, 13~15, 18~21) について行った。

#### 1-1. 葉緑体 DNA *trnL-F* 領域の配列解析

各試料から調製した DNA を鋳型に用いて、*trnL* intron 領域及び *trnL-F* IGS 領域を増幅し、塩基配列解析を行った結果、Ca-18 のみで、データベース上の *U. tomentosa* の配列 (Acc. no.: GQ852564) と高い相同性を示し、その他

の試料では、複数の配列の混合物が得られ、正確な塩基配列解析が不可能だった。混合物の配列からメジャーなピークを拾い、補正した配列を Blast search program により相同性検索した結果、サトウキビやトマトといった植物の塩基配列と高い相同性 (85%~99%) を示し、*U. tomentosa* の配列は見出されなかった (Table 2)。そこで 1 試料 (Ca-2) を選び、PCR 産物をサブクローニングし、混合配列を個々の配列に分け、塩基配列解析を行った結果、*U. tomentosa* と高い相同性を示す配列が確認された。

#### 1-2. 核 rDNA ITS 領域の配列解析

ITS 領域の配列解析においても、ユニバーサルプライマーを用いた PCR では、混合物の配列が得られ、塩基配列の解析は困難だった。そこで、*Uncaria* 属植物の ITS 配列に特異性の高いプライマーを設計し、再度、PCR を行ったところ、良好な塩基配列データが得られた。その内部配列は、解析を行った全 11 検体で同一の配列を示し、データベース上の *U. tomentosa* の配列 (Acc no.: GQ852159) と 599 bp 中一塩基を除き一致した。一方、データベース中の他の *Uncaria* 属植物 (*U. guianensis*, Acc.no: AJ414546; *U. sinensis*, Acc.no: FJ980386; *U. africana*, Acc.no: AJ414545; *U. rhynchophylla*, Acc.no: AJ346900) とは、96% の相同性であった。

#### 2. 成分分析

内容物が液状のため、取り扱いが困難だった Ca-12 を除く、21 検体について、LC-PDA-MS 分析を行った。5 環性アルカロイド ( $m/z$  369) として、speciophylline (1), mitraphylline (2),

uncarine F (3), pteropodine (4), isomitraphylline (5), isopteropodine (6) が、また、4 環性アルカロイド ( $m/z$  385) として rhynchophylline 及び isorhynchophylline と推定されるピークが全試料で認められた (Fig. 2)。しかしながら、含有アルカロイドのパターンは、1, 2, 4, 6 のピーク面積が大きいパターン、1, 4 のピーク面積が特に大きいパターン、全アルカロイドのピーク面積が全体的に小さいパターン、5 環性のアルカロイド (1~6) に比べ、rhynchophylline 類のピークが極端に少ないパターンの 4 つに大別することが出来た (Fig. 2)。

内標準物質のピーク面積に対する各アルカロイドのピーク面積の比を求め、全アルカロイドの和に対する各アルカロイドの割合を算出したところ、多くの検体で、rhynchophylline を初めとする 4 環性アルカロイドの割合が高かったが、2 つの試料 (Ca-18, -21) では、 $m/z$  385 に由来するピークが非常にわずかであった (Table 3)。

21 品目のうち、一日摂取目安量が提示されていた 16 品目 (Ca-1, 2, 5~11, 13~17, 19, 21) について、各アルカロイドのピーク面積比の和から一日摂取量を算出し、比較したところ、最も摂取量が多かった Ca-13 (植物原体の粉末) と最も少なかった Ca-8 (エキス由来の粉末) とでは、摂取量に約 280 倍の開きが認められた (Table 4)。

#### D. 考察

葉緑体 DNA *trnL*-F 領域の塩基配列解析の結果、本来の原材料である *U. tomentosa* とは異なる植物材料の存在が多くの検体で認められた。このような結果が得られた要因として、次

の2点が考えられる。*U. tomentosa* は、茎に存在する鉤状の爪を用い、他の植物に絡みながら成長する植物であることから、原料である *U. tomentosa* の採集時に別の植物が混入するケースが1点、他に、粉碎器等の使い回し等、加工段階において混入するケースが考えられる。いわゆる健康食品の中には、サツマイモ及びコムギの遺伝子が検出され、増量目的でデンプン等を加えたと考えられるケースも見出されている<sup>8)</sup>が、今回の研究結果からは、増量目的と判断される植物種は見出されなかった。

今回の研究で検出された *U. tomentosa* 以外の植物種の種類及び構成は、各試料により様々であった (Table 2)。このことは、混入植物種の組成解析が、キャットクロ製品のトレーサビリティ (原料追跡可能性) に利用出来ると考えられる。すなわち、キャットクロ製品を原因とした事件、事故が発生した場合、事故品とその他の同一商品との区別を、製品に混入した植物種のパターンから判断が可能である。

核 rDNA ITS 領域の塩基配列解析においては、複数の配列の混合物の生成を防ぐため、*Uncaria* 属植物の ITS 配列に特異性の高いプライマーを用いて PCR を行うことにより、単一の配列を得た。その内部配列は、データベース上の *U. tomentosa* の配列と非常に高い配列を示した。今回の研究では、*U. tomentosa* の標準植物試料を用いた解析を行っていないため、*U. tomentosa* の ITS 配列における種内変異の頻度に関する情報が得られていない。このため、今回の解析結果から、市場に流通するキャットクロ製品の原料植物が、*U. tomentosa* であると断定する事は出来ない。しかしながら、今回、キャットクロ製品より得られた ITS 配列は、*U. tomentosa* のものを筆頭に、他の

*Uncaria* 属植物とも高い相同性を示していることから、*U. tomentosa* か、ごく近縁種の配列であると推定される。

LC-PDA-MS 分析では、全アルカロイドに占める4環性のアルカロイドの割合の高い検体が主流であったが、5環性アルカロイドをメインとする検体も分析した21検体中2検体で確認された。今回の研究では、各化合物のイオン化率の違いを確認していないため、必ずしも実際の量比を正確に反映したものではないが、この結果から、緒論に述べた、4環性 oxindole 類を主なアルカロイドとする T0I type の *U. tomentosa* がキャットクロ製品の原料として主に利用されている可能性が考えられた。

DNA 解析の結果から、キャットクロ製品の原料植物は、少なくとも ITS 領域においては、遺伝子的に均一であることが示されたが、含有アルカロイドについては、T0I type, P0I type の双方のタイプが見出された。このことから、二つの chemotype を分ける要因は、遺伝的に背景の違いによるものではなく、生育環境等、他の要因であると考えられた。この結果は、文献<sup>7)</sup>の報告と一致していた。

## E. 結論

市場に流通するキャットクロ製品の原料植物と含有アルカロイドの分析を行った結果、上記製品には、*U. tomentosa* の他に、別の植物の混入が認められた。また、含有アルカロイドのパターンにも違いが見られた他、一日摂取目安量に換算したアルカロイド摂取量も、各製品により、大きく異なる事が明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

無し

## 2. 論文発表

無し

## G. 知的財産権の出願, 登録状況

無し

## H. 健康危機情報

無し

## 参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ, 医薬品成分 (シルデナフィル及び類似成分) が検出されたいわゆる健康食品について (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>)
- 2) Sakai, S., Otake, R., Toida, T., Goda, Y., : Identification of the origin of chondroitin sulfate in "health foods", *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 299-303 (2007).
- 3) Maruyama, T., Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kim, I. K., Kamakura, H., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Tada, A., Yamazaki, T., Goda, Y., Authentication and chemical study of *Isodonis Herba* and *Isodonis* extracts. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1626-1630 (2007).
- 4) Maruyama, T., Kamakura H., Miyai M., Komatsu, K., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Goda, Y., Authentication of the traditional medicinal plant *Eleutherococcus senticosus* by DNA and chemical analyses. *Planta Med.*, **74**, 787-789 (2008).
- 5) Keplinger K., Laus G., Wurm M., Dierich M. P., Teppner H., *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. -Ethnomedical use and new pharmacological, toxicological and botanical results, *J. Ethnopharmacol.*, **64**, 23-34 (1999).
- 6) Montoro P., Carbone V., Quiroz J. D. Z., Simone F. D., Pizza C., Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS, *Phytochem. Anal.*, **15**, 55-64 (2004).
- 7) Laus G., Keplinger D., Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **662**, 243-249 (1994).
- 8) 合田幸広, 丸山卓郎, 厚生労働科学研究費補助金 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, 「専ら医薬品」として使用される成分本質 (原材料) の有効性及び安全性等の評価に関する研究, 平成 16 年度総括・分担研究報告書, p48-53, 「専ら医薬品」の有効性, 安全性等の評価に関する調査及び実証的研究並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討 (2005).

Table 1 Details of the commercial cat's claw products used in this study.

Sample	製品名	製品形態
Ca-1	100% 純粋 キャッツクロー	抽出エキス粉末
-2	SOLARAY キャッツクロー 60 カプセル	カプセル
-3	キャッツクロー茶	ティーバッグ
-4	ラブキャッツクロウ ティーバッグ茶	ティーバッグ
-5	キャッツクロースーパー DX 100 カプセル	カプセル
-6	サンセリテ キャッツクロー 90 粒	錠剤
-7	リアルサプリアルミ袋キャッツクロー 1080 粒	錠剤
-8	パワフルキャッツクロー	カプセル
-9	キャッツクローG グルコサミン入	錠剤
-10	キャッツクロースーパーマイルド	錠剤
-11	メイソンナチュラル グルコサミン+キャッツクロー 150 粒	錠剤
-12	ラブキャッツクロウ 粒タイプ	錠剤
-13	キャッツクロー/キャッツクロウ/ペルー産/ 100% 粉末 100 g	粉末
-14	キャッツ・クロー100 粒 (カプセル)	カプセル
-15	キャッツクロー粉末 50 g	粉末
-16	30 倍濃縮キャッツクローエキス 77 (150 粒入り)	錠剤
-17	キャッツクロー (無添加の高濃度エキス:1 粒565 mg)	カプセル
-18	キャッツクロー (ウンカリア・トメントーサ) 内方樹皮 100%	樹皮
-19	ナスカの恵 キャッツクロウ茶	ティーバッグ
-20	キャッツクロー [herb 0537]	樹皮
-21	キャッツクロー 50 g	粉末
-22	ハーブクラフト キャッツクロー	エキス

Table 2 The plant species contained in the cat's claw products speculated from DNA analysis.

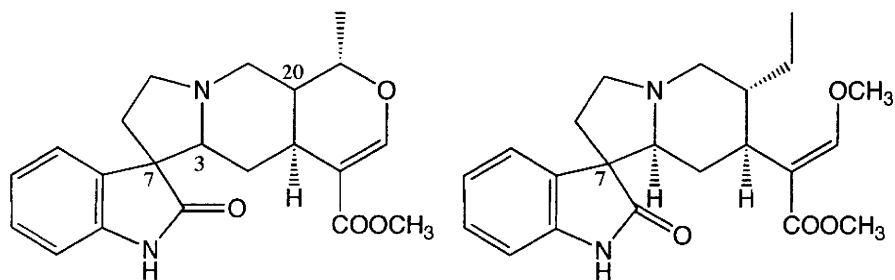
Sample	Direct sequence
Ca-2	<i>Cymbopogon citratus</i> (レモングラス; 98%)、 <i>Saccharum hybrid</i> (サトウキビ; 98%)
-3	解析不能
-5	<i>Solanum lycopersicum</i> 、 <i>Lycopersicon esculentum</i> (いずれもトマト; 96%)
-13	解析不能
-14	<i>Urochloa texana</i> ( <i>Urochloa</i> 属; 99%)、 <i>Panicum virgatum</i> ( <i>Panicum</i> 属; 97%)
-15	解析不能
-18	<i>Uncaria tomentosa</i> (キャッツクロー; 95%)、 <i>Uncaria guianensis</i> (キャッツクロー; 90%)
-19	<i>Ludekia booneensis</i> ( <i>Ludekia</i> 属; 87%) <i>Sarcocephalus latifolius</i> ( <i>Sarcocephalus</i> 属; 85%)
-20	<i>Phalaris arundinacea</i> (リードカナリーグラス; 93%) <i>Agrostis stolonifera</i> ( <i>Agrostis</i> 属; 91%)
-21	<i>Lepidium bonariense</i> (キレハマメグンバイナズナ; 86%) <i>Lepidium solandri</i> ( <i>Lepidium</i> 属; 85%)

Table 3 Each alkaloid ratio to total alkaloids in the cat's claw products.

Sample	speciophylline	mitraphylline	uncarine F	pteropodine	isomitraphylline	isopteropodine	isorhynchophylline (推定)	rhynchophylline
Ca-1	4.5968296	10.3265919	2.27341314	8.3010478	9.6400022	12.8969960	11.6208313	40.3442880
Ca-2	10.1684319	10.1204553	3.09376672	9.4175732	5.6437981	9.4525622	15.8021501	36.3012623
Ca-3	15.1428236	10.8857914	4.97771963	16.8044863	6.7651811	25.2330074	6.8199735	13.3710171
Ca-4	8.8451516	9.6337008	3.47806905	8.9816273	5.7721804	11.6849596	14.1813107	37.4230005
Ca-5	15.7747499	5.5907233	3.87528128	13.7473344	2.7982775	5.9262597	18.1345798	34.1527940
Ca-6	4.3300790	3.8208311	2.90339989	4.0160918	4.1887848	30.9954374	11.1475249	38.5978512
Ca-7	10.3651615	7.5034340	3.24599033	9.1900176	4.6499035	11.9585980	10.7129107	42.3739844
Ca-8	3.7589387	4.2808398	5.54980298	16.9002828	8.6541068	52.7488412	3.8214834	4.2857044
Ca-9	3.4966604	5.8227181	2.38903398	8.4949352	7.1600890	14.7245451	13.7836867	44.1283315
Ca-10	11.1548422	10.2226882	4.08266071	10.2286407	5.0488421	8.5120806	16.5930888	34.1571566
Ca-11	5.7122623	7.9074251	3.35480825	11.0269600	8.5170504	25.8314727	7.9278836	29.7221375
Ca-13	9.8763328	10.2823385	3.23574996	8.6998009	4.8503115	5.7675880	18.3247694	38.9631090
Ca-14	7.8688559	8.2197532	2.96201221	7.8380095	5.6628828	9.6103265	12.3137551	45.5244048
Ca-15	9.3234052	9.8689589	3.32045285	8.4436883	5.2923245	7.2798482	18.6625207	37.8088014
Ca-16	9.2482984	6.0694385	4.19724783	15.7339752	5.0541152	29.1347281	7.3444753	23.2177214
Ca-17	4.8100096	7.5329067	2.53767155	9.8081472	8.6871194	20.2328259	11.2942081	35.0971116
Ca-18	20.6281124	33.4815296	4.50673461	19.9384966	12.8352313	7.9223111	0.5293278	0.1582566
Ca-19	8.6384381	7.5022737	1.96754639	6.9096641	3.8583828	4.5245748	23.3086550	43.2904652
Ca-20	8.8167825	8.0509607	3.39502594	8.2843876	5.3723487	9.9352656	18.1493227	37.9959062
Ca-21	35.3659067	6.2672657	8.20259914	31.8197089	2.5698907	15.1896180	0.3703901	0.2146208

Table 4 Total peak area in recommended intake amount a day.

Sample	Total peak area in 10 mg product	Recommended intake amount a day (g)	Total peak area / recommended intake amount a day
Ca-1	27.64628864	1	2764.62886
Ca-2	3.42618808	ca. 5.463	1871.72655
Ca-5	5.22020701	1.8	939.63726
Ca-6	0.40285793	0.75	30.21435
Ca-7	2.08195128	1.5	312.29269
Ca-8	0.29443227	0.75	22.08242
Ca-9	2.84626256	3	853.87877
Ca-10	4.56900401	0.5	228.45020
Ca-11	2.02870586	1.4	284.01882
Ca-13	10.26899853	6	6161.39912
Ca-14	7.30522625	ca. 4.365	3188.73126
Ca-15	9.46961232	6	5681.76739
Ca-16	19.62294569	2.5	4905.73642
Ca-17	11.29629124	ca. 2.26	2552.96182
Ca-19	6.38947468	5	3194.73734
Ca-21	4.27726836	2	855.45367



Compound	Configuration of chiral center		
	C-3	C-7	C-20
Speciophylline (1)	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
Mitraphylline (2)	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
Uncarin F (3)	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
Pteropodine (4)	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
Isomitraphylline (5)	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
Isopteropodine (6)	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>

7-*R*: Rhynchophylline  
7-*S*: Isorhynchophylline

Fig. 1 Chemical structures of *Uncaria tomentosa* alkaloids

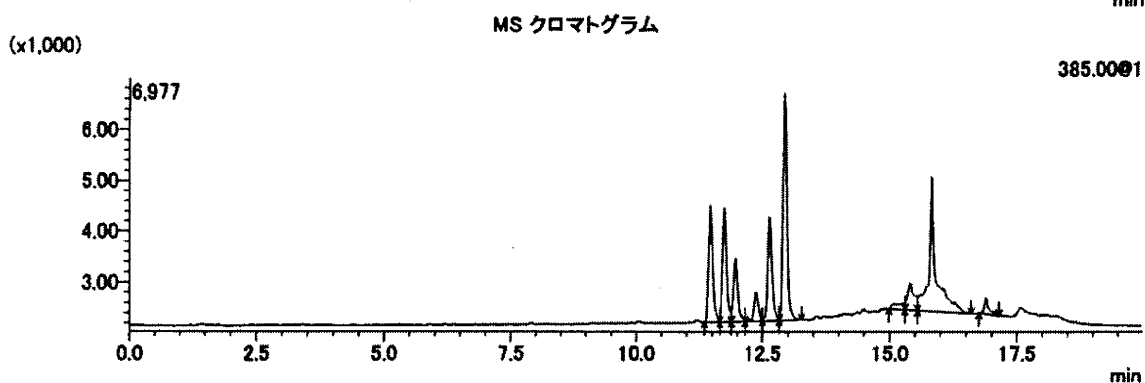
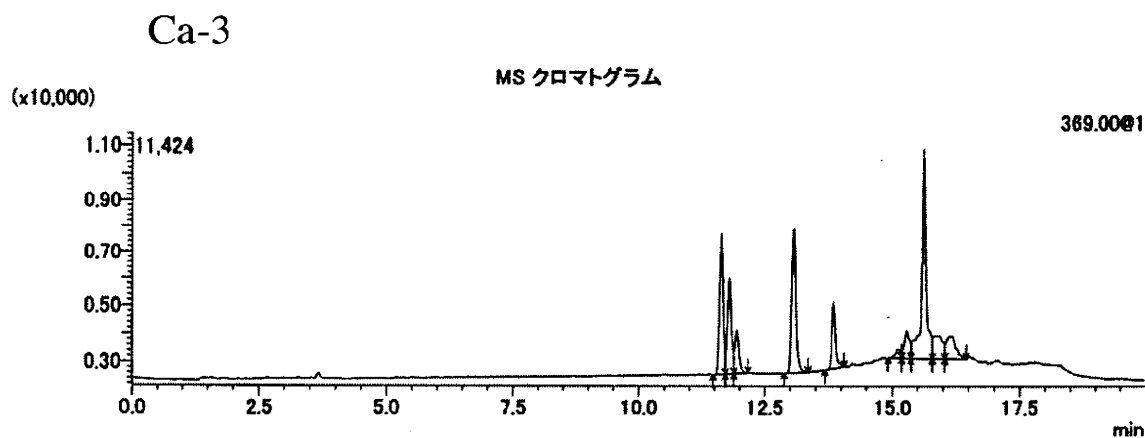
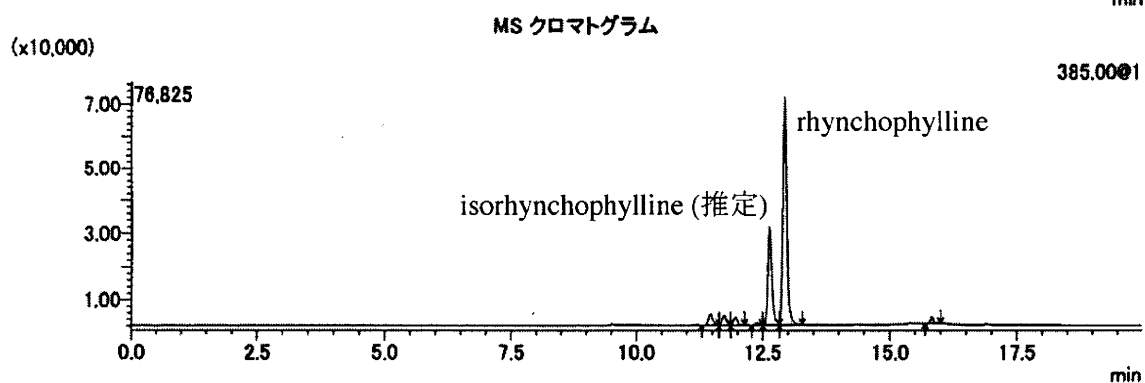
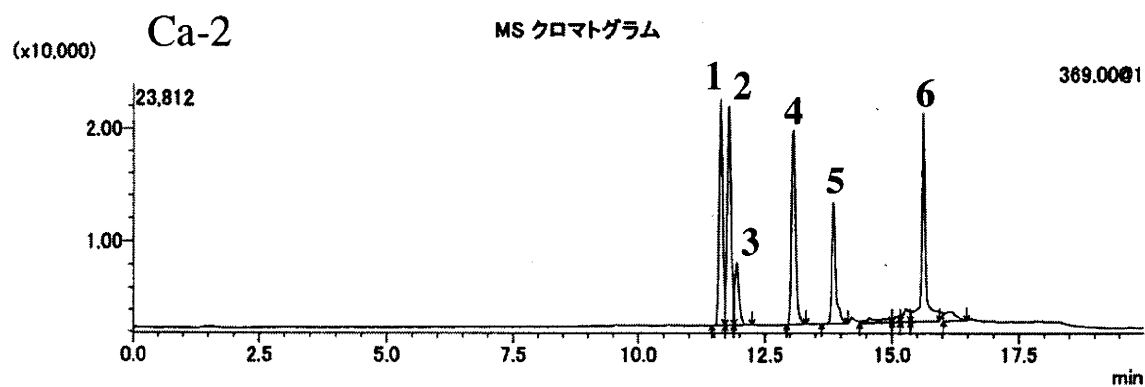
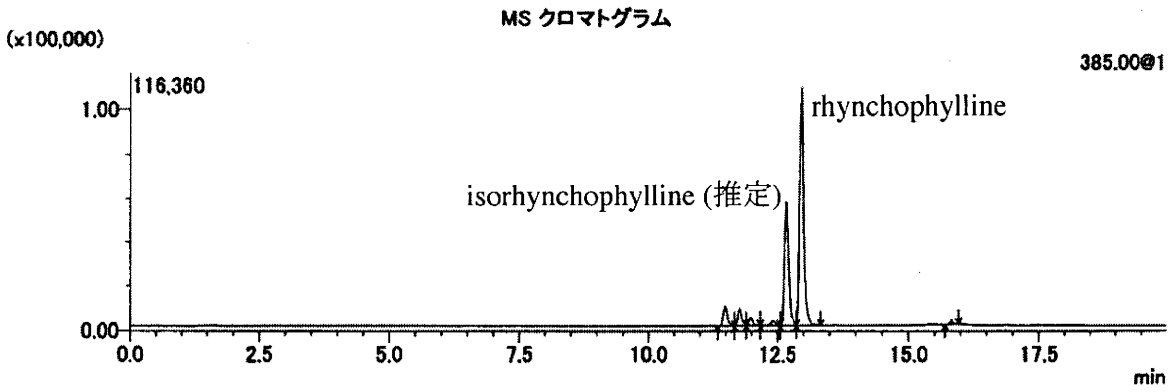
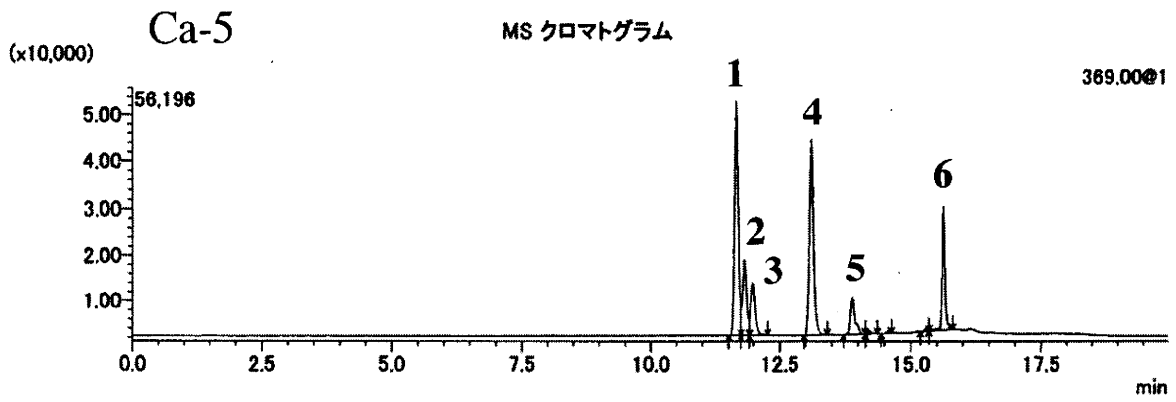


Fig. 2 LC-MS chromatograms of methanol extracts of the cat's claw products  
 1, speciophylline; 2, mitraphylline; 3, uncarine F; 4, pteropodine; 5, isomitraphylline; 6, isopteropodine





Ca-18

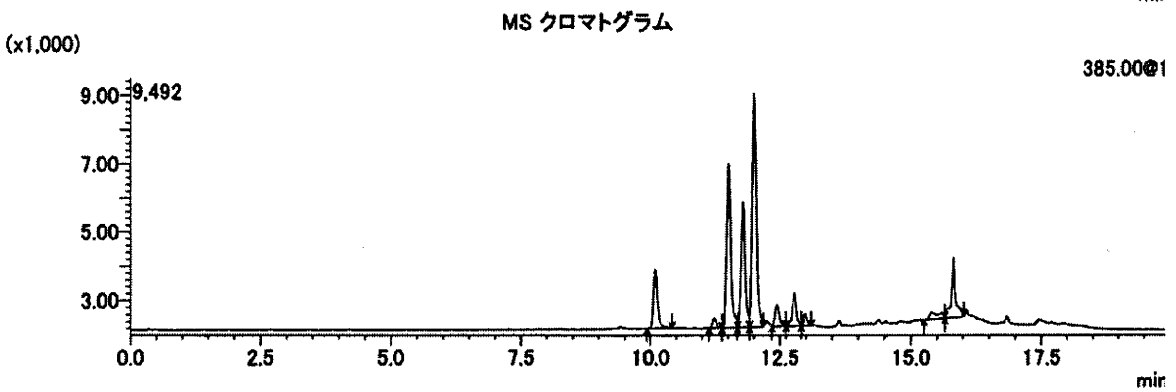
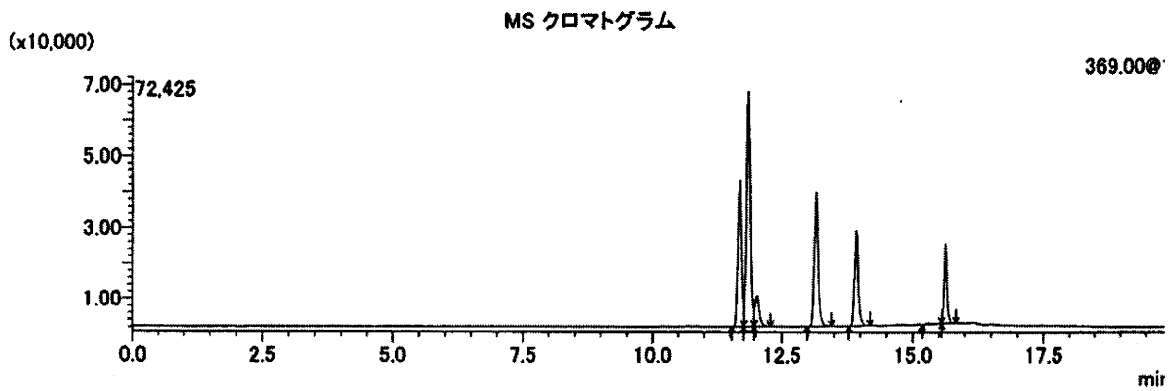


Fig. 2 Continued

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析，有害性評価に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部部長 合田 幸広

シヤタバリ (*Asparagus racemosus*) における asparagamine A 含有の真偽について

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長 丸山 卓郎

研究要旨 健康食品素材として使用されるシヤタバリ (*Asparagus racemosus*) 中の含有が報告されている毒性アルカロイド，asparagamine A について，その含有の真偽を文献調査により検証した結果，同植物からの asparagamine A の単離は，*Stemona* 属植物を誤同定したことによるものである可能性が高いことが明らかになった．一方で，*A. racemosus* と *Stemona* 属植物を誤同定したと思われる文献は，他にも見出されたことから，*A. racemosus* 含有を標榜する健康食品に有毒植物である *Stemona* 属植物が混入している可能性があるものと考えられた．

#### A. 研究目的

シヤタバリは，インドにおいて，催乳，催淫，鎮痛，利尿などの目的に用いられるアヌルヴェーダ生薬の一つである<sup>1,2)</sup>．その本体は，ユリ科植物，*Asparagus racemosus* の根であるとされている．近年，同生薬の効能が国内においてもよく知られるようになり，主に婦人用強精剤として，シヤタバリを原料に用いたいわゆる健康食品が多数流通している．同植物の食薬区分上の取り扱いについて，厚生労働省では，厚労科研費補助金による「『専ら医薬品』としての規制の範囲に関する研究」班が検討を行い，毒性アルカロイド，asparagamine A (Fig. 1) の含有<sup>1,3,4)</sup>，エストロゲン様作用を有するサポニン類の含有<sup>1)</sup>，英国及びインドにおける医薬品としての使用実態<sup>1)</sup>を理由に，専ら医薬品として判断すべきとの結論を示している<sup>5)</sup>．

しかしながら，*Asparagus* 属植物のアルカロイド含有は一般的ではなく，また，*A. racemosus*

からの asparagamine A の単離を報告している論文中には，実験材料についての記述が全く見られないものもあることから，実験材料の誤同定の可能性が，以前より指摘されている<sup>6-8)</sup>．そこで本研究では，この点について検証を行った．

#### B. 研究方法

Google scholar 及び TOXNET を用いて文献検索を行うとともに，文献 6 に挙げられている参考文献について，その内容を精査した．

#### C. 研究結果

Sekine らが，タイ産の *A. racemosus* より単離を報告している化合物 2 種を Fig. 1 に示した．この内，asparagamine A の様な pyrrolo[1,2-a]azepine アルカロイドは，ビャクブ科 *Stemona* 属植物に広く分布が知られる化合物群である<sup>8)</sup>．実際，asparagamine A は，*S. collinsae* より単離の報告がある<sup>6,9)</sup>．一方，Cong

らは、中国各地の *Stemona* 属植物 5 種、44 検体及び *Asparagus* 属植物 4 種、9 検体のアルカロイド含量を呈色法により調べたところ、*Stemona* 属植物では全ての検体でアルカロイドが確認されたのに対し、*Asparagus* 属植物では、いずれの検体からもアルカロイドは検出されなかった(ただし、*A. racemosus* は、検体内に含まれていない)<sup>10)</sup>。

また、興味深いことに、Sekine らが、asparagamine A を単離した試料から phenanthrene 誘導体である racemosol (Fig. 1) の単離も報告している<sup>11)</sup>のに対し、Pacher らもまた、*S. collinsae* と同定した試料より、racemosol 及び類似のスチルベン類 (stemofuran A-K) を単離している (Figs. 1, 2)<sup>12)</sup>。さらに、Wiboonpun らも、*A. racemosus* と同定した試料より、asparagamine A, racemosol 及び racemofuran と名付けられた stemofuran 類似のスチルベンを単離している (Fig. 2)<sup>13)</sup>。

なお、*Asparagus racemosus* の成分探索の報告は、他にも複数なされており、サポニン類やイソフラボン類の単離が示されている (Fig. 3)<sup>1)</sup>。

#### D. 考察

含有成分の相同性から考えて、Sekine ら、Pacher ら及び Wiboonpun らが asparagamine A やスチルベン類を単離した試料は、同種あるいはごく近縁種であると想像される。従って、いずれかの試料の同定が誤っている可能性が高い。

Chemotaxy の観点からは、asparagamine A のような pyrrolo[1,2-a]azepine 骨格を有するアルカロイドは、*Stemona* 属植物において、80 化合物以上の分布が知られている<sup>8)</sup> ことから、文献 3, 4, 13 における *A. racemosus* との同定が誤

っているものと思われる。このことは、文献 10 の研究結果からも支持される。

一方で、文献 3, 4, 13 において *A. racemosus* と誤同定された試料は、いずれもタイ国産であり、さらに、文献 13 では、タイ国の herbarium of the Royal Forest Department, Ministry of Agriculture and Cooperative に保存の標本との比較により、試料の同定を行っているにも拘らず、誤同定と思われる結果を招いている。このことは、タイ国で、*A. racemosus* と *Stemona* 属植物が誤認識されていることを示唆している。*Stemona* 属植物は、前述の通り、アルカロイド成分を豊富に含むことから、国内で販売される *A. racemosus* 含有健康食品の原料に *Stemona* 属植物が誤って使用された場合、重篤な健康被害の発生が予想される。

今後は、マーケットバスケット方式により *A. racemosus* 含有健康食品を収集し、*A. racemosus* にアルカロイド成分が含有しないことを確認するとともに、国内流通品の中に、*Stemona* 属植物の混入した製品がないかを調査すべきであると思われる。

#### E. 結論

Sekine らが報告した、*A. racemosus* からの asparagamine A の単離は、実験材料の誤同定の可能性が高いと考えられた。一方で、*A. racemosus* と有毒植物である *Stemona* 属植物を混同した例が、複数の文献で見出されたことから、*A. racemosus* 含有健康食品に *Stemona* 属植物が混入する危険性が懸念された。

シャタバリそのものは、インドのアユルヴェーダ薬として最も重要な生薬であること、子宮がん等のガンリスクを増大させるステロイドサポニン等、比較的強い生理活性を持つ化合物の

単離が別に報告されていること、また、今回の研究結果を鑑みれば市場で利用されるシャタバリには、誤同定された *Stemona* 属植物が混入する危険性も十分存在すること等を考慮して、食薬区分を実施するなら、専ら医薬品として対応することが適切と考える。なお、成書 (Ayurveda, The Divine Science of Life, Todd Caldecott CIH AG 著, Mosby 出版, 2006) や多くの論文では, Satavari の基原植物を *A. racemosus* としているものの、インドのアユルベーダ薬局方 2008 では、基原植物を *A. officinalis* L., としており、今回検討した結果も考え合わせると、食薬区分を行う際には、少なくともその範囲をどのように規定すべきか、議論することが必要になるものと考ええる。

F. 研究発表

1. 学会発表

無し

2. 論文発表

無し

G. 知的財産権の出願、登録状況

無し

H. 健康危機情報

健康食品素材として多くの製品が流通する *Asparagus racemosus* は、有毒植物である *Stemona* 属植物と混同される場合があることから、原料植物の誤同定による健康被害の発生に注意が必要である。

1) N. Bopana, S. saxena, *Asparagus racemosus* -Ethnopharmacological evaluation and conservation

needs, *J. Ethnopharmacol.*, **110**, 1-15 (2007).

2) L. D. Kapoor, Handbook of ayurvedic medicinal plants, CRC press, Florida, p 56 (1990).

3) T. Sekine, N. Fukasawa, Y. Kashiwagi, N. Ruangrunsi, I. Murakoshi, Structure of asparagamine A, a novel alkaloid from *Asparagus racemosus*, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1360-1362 (1994).

4) T. Sekine, F. Ikegami, N. Fukasawa, Y. Kashiwagi, T. Aizawa, Y. Fujii, N. Ruangrunsi, I. Murakoshi, Structure and relative stereochemistry of a new polycyclic alkaloid, asparagamine A, showing anti-oxytocin activity, isolated from *Asparagus racemosus*, *J. Chem. Soc. Parkin Trans. 1*, **1995**, 391-393.

5) 海老塚豊, 合田幸広, 大塚英昭, 厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業, 「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究, 平成 20 年度総括・分担研究報告書, p9-13, 専ら医薬品の規制範囲と見直しに関する研究 (2009).

6) B. Brem, C. Seger, T. Pacher, O. Hofer, S. Vajrodaya, H. Greger, Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloids-A source of potent natural insecticides, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6383-6388 (2002).

7) M. Brüggemann, A. I. McDonald, L. E. Overman, M. D. Rosen, L. Schwink, J. P. Scott, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15284-15285 (2003).

8) H. Greger, Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids, *Planta Med.*, **72**, 99-113 (2006).

9) S. Jiwajinda, N. Hirai, K. Watanabe, V. Santisopasri, N. Chuengsamarnyart, K. Koshimizu, H. Ohigashi, Occurrence of the insecticidal 16, 17-didehydro-16