

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長 合田幸広

### 偽造医薬品の分析について

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

研究要旨 平成 23 年 4 月 26 日付で奈良県から発表された「模造医薬品による健康被害に対する注意喚起」<sup>1)</sup>において, 偽造医薬品に関する事例が報告された. 奈良県より提供のあった当該模造医薬品について, 平成 23 年 5 月 10 日, 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課より分析の依頼を受けた. LC-PDA-MS 分析の結果, 4 検体全てから医薬品成分であるシルデナフィルが検出された. また, それ以外のピークは観察されなかった. さらに TLC 分析を行い, UV 波長 254 nm 及び 356 nm の照射や 10 % 硫酸及び 6 % リンモリブデン噴霧により検出されるスポットの有無を確認したところ, シルデナフィルに相当するスポット以外は検出されなかった. 以上のことから総合的に判断し, これらの検体に, シルデナフィル以外の化合物が混入されている可能性は低いものと考えられた. 本結果は, 平成 23 年 5 月 23 日に厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課に報告され, 5 月 26 日に報道発表された.

#### A. 研究目的

偽造医薬品(カウンターフィット薬, counterfeit medicines)は, 正規薬品購入の資金に窮した発展途上国の問題と思われがちであるが, 近年, 世界規模での問題になってきている<sup>2)</sup>. Center for Medicine in the Public Interest(米国)は, 2010 年の偽造医薬品の販売額は 750 億ドルで 2005 年の 9 割増になると予測していた<sup>2,3)</sup>. また, 国内で ED 治療薬を製造・販売している 4 社によって行われたインターネットで入手した ED 治療薬の鑑定調査の結果, そのおよそ 6 割が偽造品であることが判明した<sup>4)</sup>. 偽造医薬品の中には, 有効成分を含まないもの(治療機会の逸失)や健康被害をまねく有害な化合物を含むものなどもあり, 保健衛生の観点からも注意が必要である.

平成 23 年 4 月 26 日付で奈良県から発表さ

れた「模造医薬品による健康被害に対する注意喚起」<sup>1)</sup>において, 偽造医薬品に関する事例が報告された. 偽造医薬品との因果関係が疑われたため, 奈良県より提供のあった当該模造医薬品についての分析の依頼を, 平成 23 年 5 月 10 日, 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課より受けた. そこで LC-PDA-MS 及び TLC により成分分析を行うこととした.

#### B. 研究方法

**試薬・試液:** アセトニトリル, メタノールは LiChrosolv gradient grade LC 用(Merck 社)を, その他の試薬は特級品を用いた.

**偽造医薬品:**

1. シアリス錠 50 mg 1 錠
2. シアリス錠 100 mg 1 錠
3. レビトラ錠 20 mg 2 錠
4. ジフルカン錠 100 mg 1 錠

以上の4検体

#### 1. 試料調製

試料粉末 0.1 g をねじ口試験管に取り、これにメタノール5 mLを加え、10分間振とう抽出した。その後3,000 r.p.m 10分間遠心分離し、上清を分離した。さらに2回、同様に操作した後、上清液を合わせ、メタノールを加えて正確に20 mLとし、試験原液とした。これをメタノールで適宜希釈し、分析を行った。

#### 2. LC-PDA-MS 測定

LC部にShimadzu Prominence UFLC システムを配したShimadzu LCMS-2010 EV 質量分析計(島津製作所製)を用いた。

##### 測定条件

###### カラム

Hypersil Gold C18 (1.9  $\mu$ m), 2.1 mm x 100 mm (Thermo Fisher Scientific 社), 40  $^{\circ}$ C

###### 移動相

A 液(0.1 %ギ酸溶液)

B 液(0.1 %ギ酸アセトニトリル溶液)

###### グラジエント条件

initial (% B = 30) - 10 min (% B = 60) - 15 min (% B = 60)

流速:0.2 mL/min

フォトダイオードアレイ検出器(PDA)

200~600nm, 1.2nm 間隔でスキャン

注入量:1  $\mu$ L

インターフェース電圧:4.5 kV

CDL 電圧:-20 V

CDL 温度:250 $^{\circ}$ C

ヒートブロック温度:200 $^{\circ}$ C

イオン化法:ESI ポジティブ

検出器:100~800 u を 2,000 u/s でスキャン

#### 3. TLC 分析

TLC plate silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck 製)を用いた。

展開溶媒:クロロホルム/メタノール = 9/1

検出:UV 254 nm 及び 365 nm または呈色

呈色試薬:ドラーゲンドルフ試薬 (Merck 製), 10%硫酸及び 6%リンモリブデン酸

#### C. 研究結果

LC-PDA-MS分析の結果、4検体全てから、シルデナフィルと思われるピークが検出された。保持時間、マススペクトル及びUVスペクトルがシルデナフィル標品のそれらと一致したことから、シルデナフィルと同一とした。それぞれのクロマトグラム、マススペクトル及びUVスペクトルを図1~5に示した。なお、本条件でレビトラ錠の薬効成分バルデナフィルは保持時間2.8分付近に、シアリス錠の薬効成分タダラフィルは保持時間8.9分付近に検出される。また、いずれの検体においてもシルデナフィル以外に混入されたと思われる化合物のピークは検出されなかった。さらに、TLC分析においては、波長254 nm及び365 nmにおいてシルデナフィル標品と一致するR<sub>f</sub> 値のスポットが観察されるのみで、それ以外のスポットは観察されなかった。また、これに、10% 硫酸またはドラーゲンドルフ試薬または6%リンモリブデン酸を噴霧した後、ホットプレート上で加熱処理したが、いずれにおいてもスポットは観察されなかった。これらの結果を図6に示した。

以上のことから総合的に判断し、これらの検体に、シルデナフィル以外の化合物が混入されている可能性は低いものと考えられた。

#### D. 考察

今回の事例では、検体は、ED 治療薬であるシアリス錠、レビトラ錠及び合成抗菌薬であるジフルカン錠の偽造品で、いずれからも医薬

品成分であるシルデナフィル(ED 治療薬)以外, 混入されたとと思われる化合物は検出されなかった。シルデナフィルの主な副作用<sup>5)</sup>は, 血管拡張(ほてり, 潮紅), 頭痛, 動悸などであり, 使用上の注意の中に本事例の様な副作用の記載はない。しかしながら, 正規の製品とは有効成分も含量も異なることからこのような偽造医薬品には注意が必要であり, 健康被害を未然に防ぐためにも, 今後も監視, 取り締まりが重要であると考えられる。なお, 本結果は, 平成23年5月23日に厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課に報告され, 5月26日に報道発表<sup>6)</sup>された。

#### E. 結論

偽造医薬品4検体の成分分析を行ったところ, 正規品とは異なる医薬品成分であるシルデナフィルがすべての検体から検出された。また, それ以外の化合物が混入されている可能性は低いものと考えられた。

#### 文献等

- 1) 報道発表資料「模造医薬品による健康被害に対する注意喚起」別添。  
[<http://www.mhls.go.jp/stf/houdou/2r9852000001agwf.html>], 2011年3月2日アクセス
- 2) Growing threat from counterfeit medicines, *Bull. World Health Organ.*, **88**, 247-248 (2010)

- 3) Burns, W.: WHO launches taskforce to fight counterfeit drugs, *Bull. World Health Organ.*, **84**, 689-690 (2006)
- 4) 国内で高まる健康被害のリスク, インターネットで入手したED治療薬の約6割が偽造品, ED治療薬の鑑定調査結果から  
[[http://www.pfizer.co.jp/pfizer/company/press/2009/2009\\_12\\_02.html](http://www.pfizer.co.jp/pfizer/company/press/2009/2009_12_02.html)], 2011年3月2日アクセス
- 5) バイアグラ錠 25 mg/バイアグラ錠 50 mg 添付文書
- 6) 報道発表資料「模造医薬品による健康被害に対する注意喚起(第2報)」別添。  
[<http://www.mhls.go.jp/stf/houdou/2r9852000001dl4u.html>], 2011年3月2日アクセス

#### F. 健康危機情報

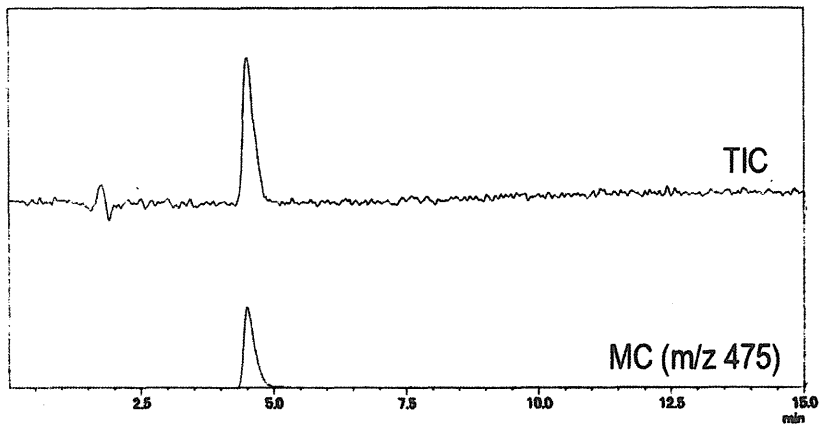
なし。

#### G. 研究発表

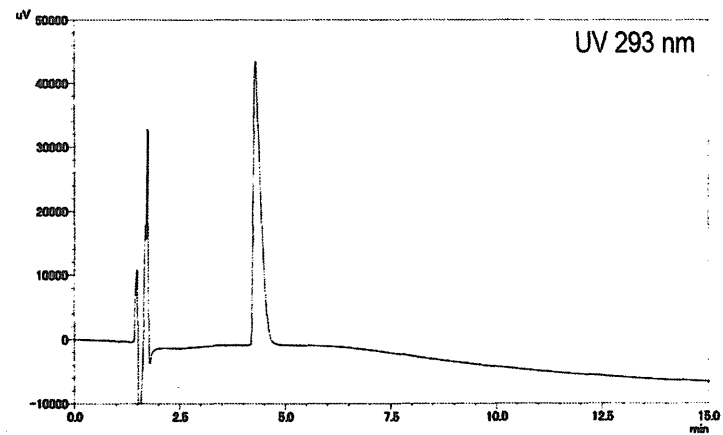
1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表等  
なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

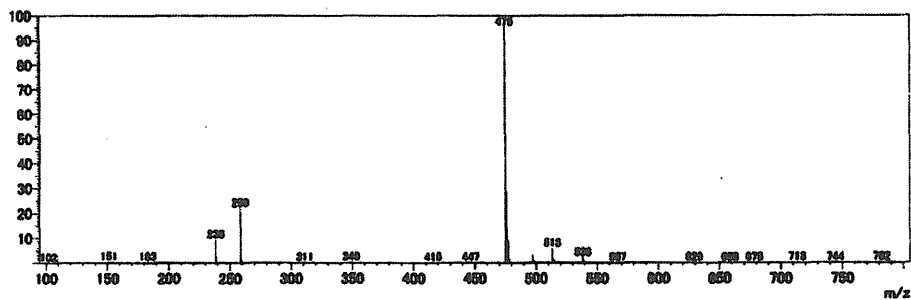
なし。



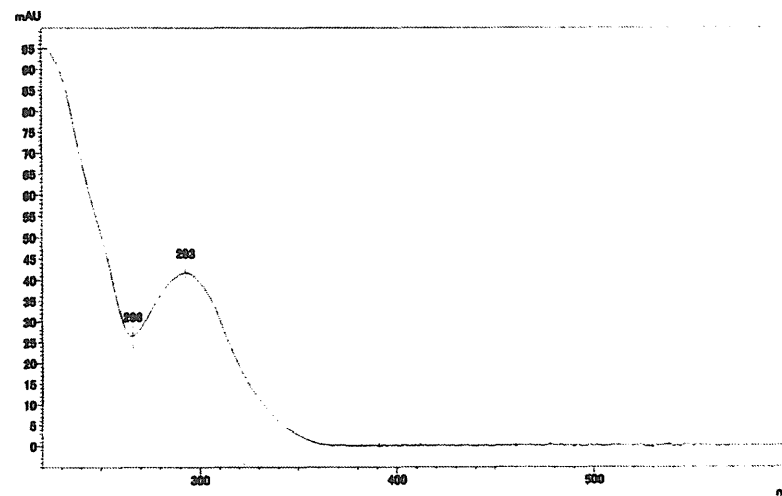
a) クロマトグラム



c) クロマトグラム

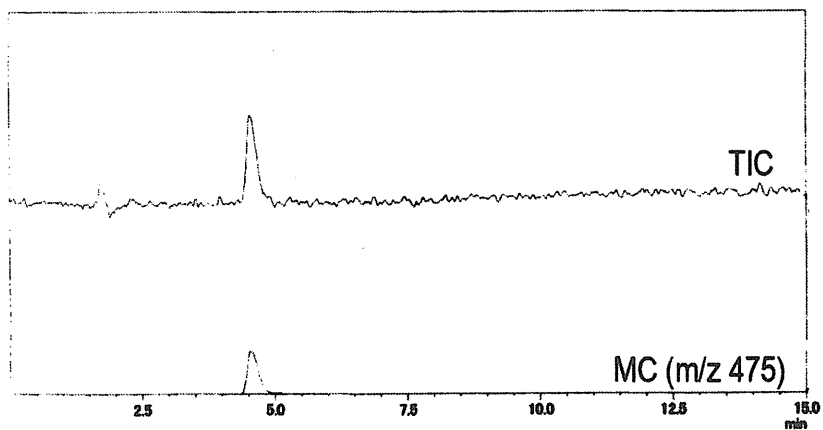


b) マススペクトル

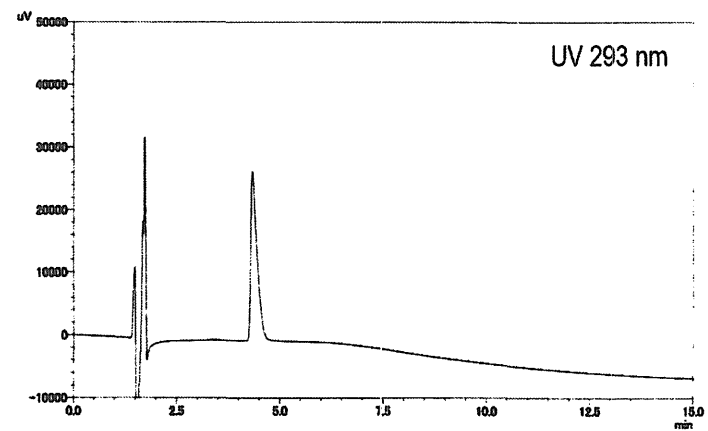


d) UVスペクトル

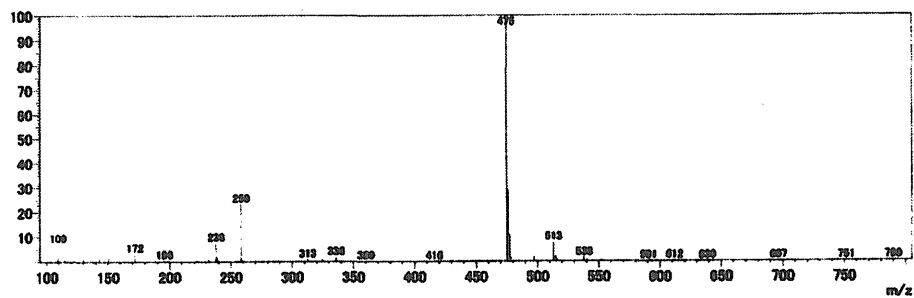
図1 シルデナフィル標品のクロマトグラム及びスペクトル



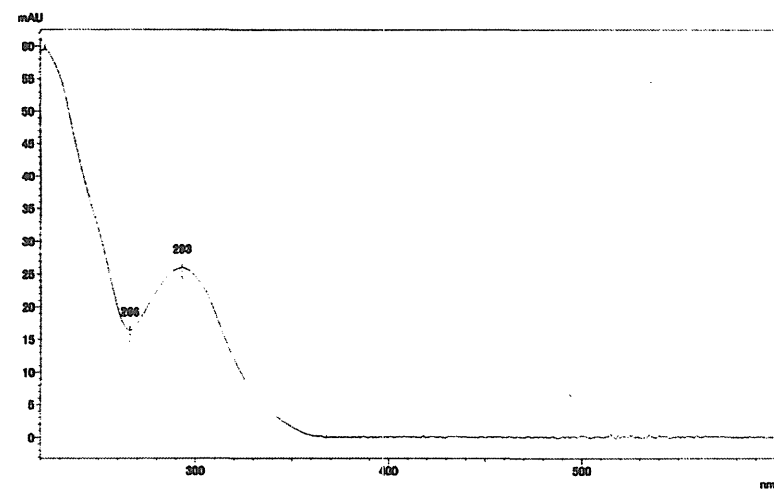
a) クロマトグラム



c) クロマトグラム

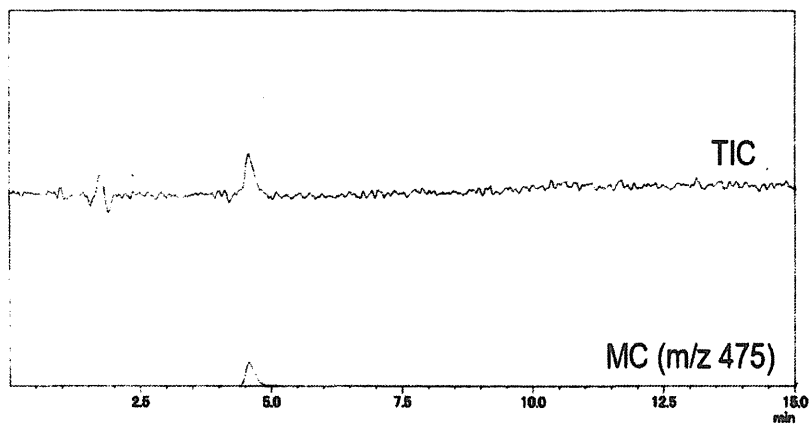


b) マススペクトル

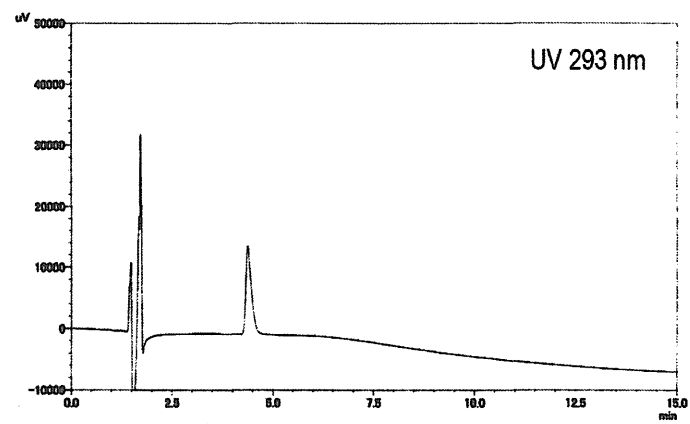


d) UVスペクトル

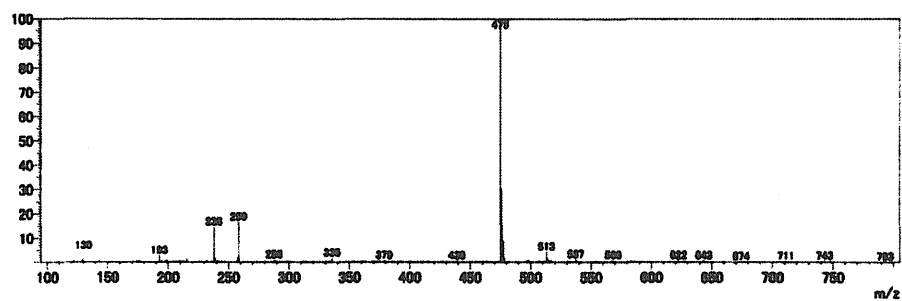
図2 検体1 (シアリス錠 50 mg) のクロマトグラム及びスペクトル



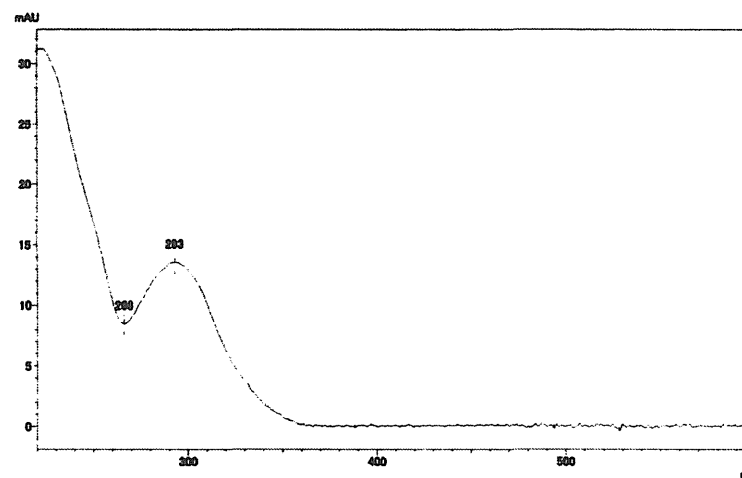
a) クロマトグラム



c) クロマトグラム

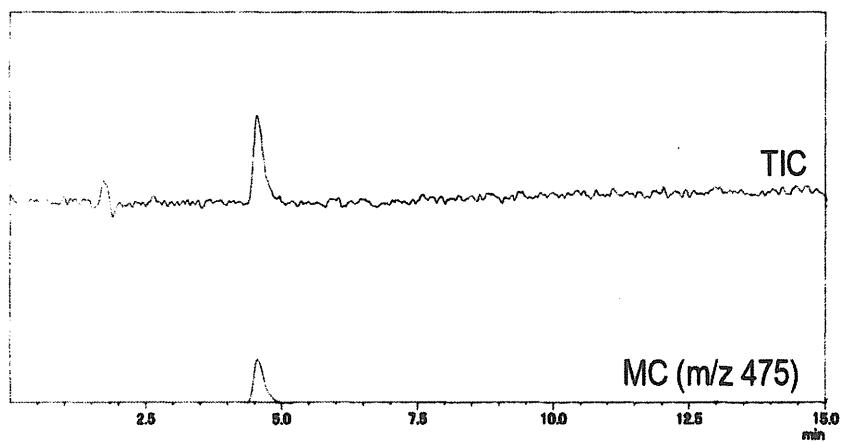


b) マスペクトル

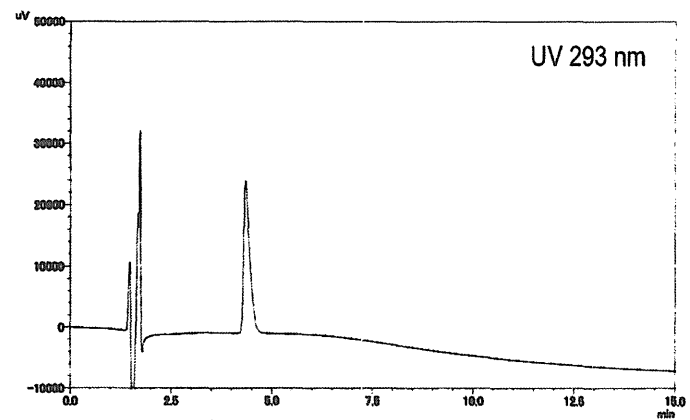


d) UVスペクトル

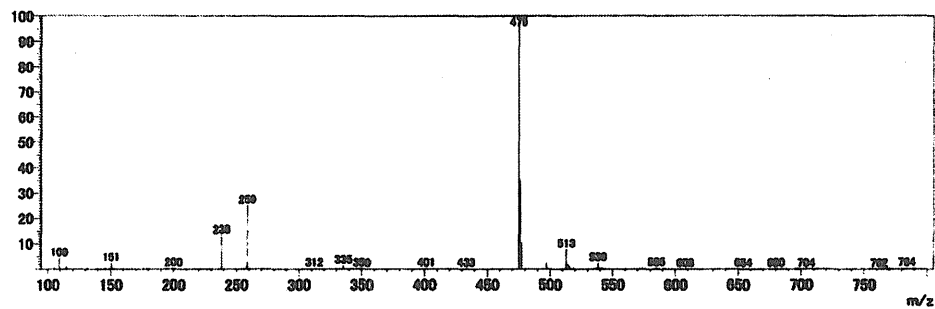
図3 検体2 (シアリス錠 100 mg) のクロマトグラム及びスペクトル



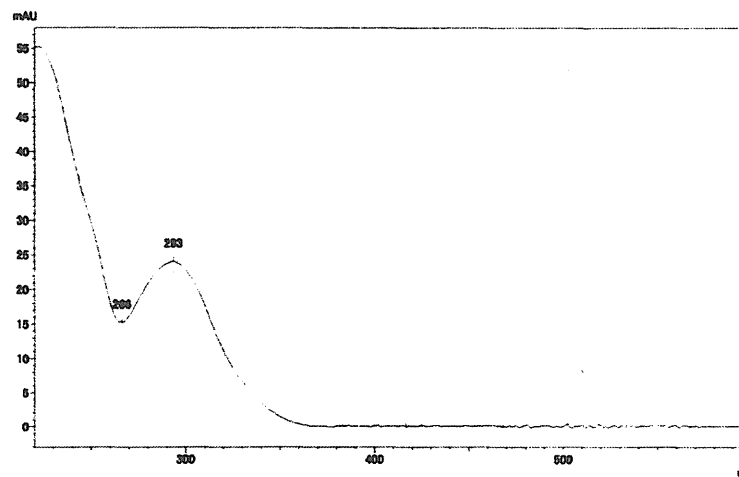
a) クロマトグラム



c) クロマトグラム

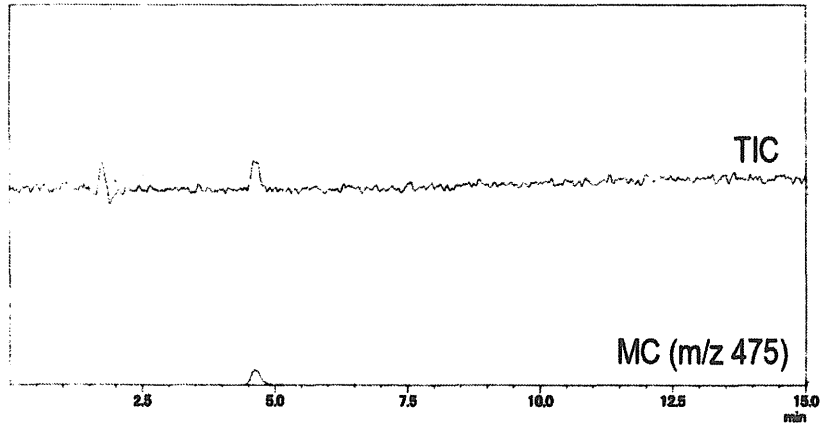


b) マススペクトル

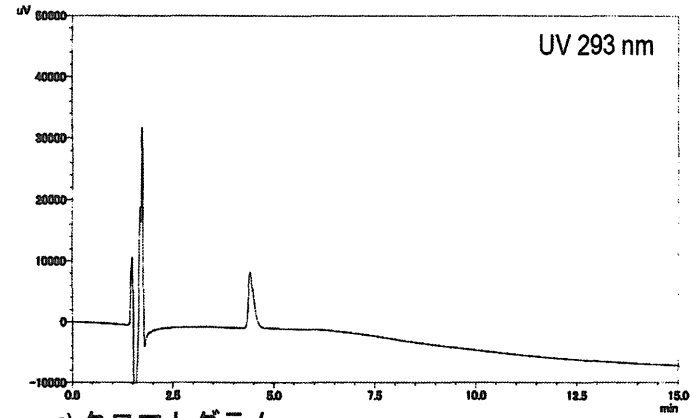


d) UVスペクトル

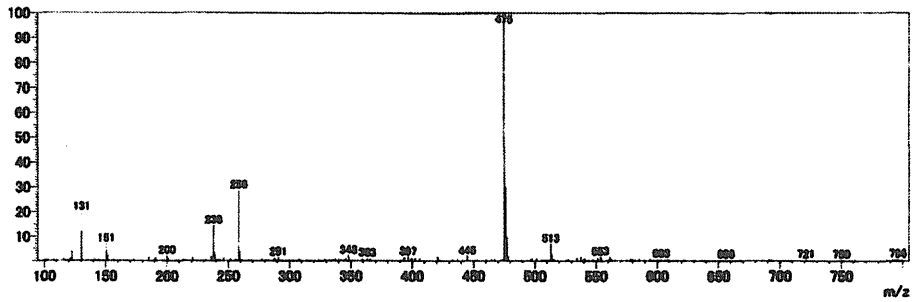
図4 検体3 (レビトラ錠 20 mg) のクロマトグラム及びスペクトル



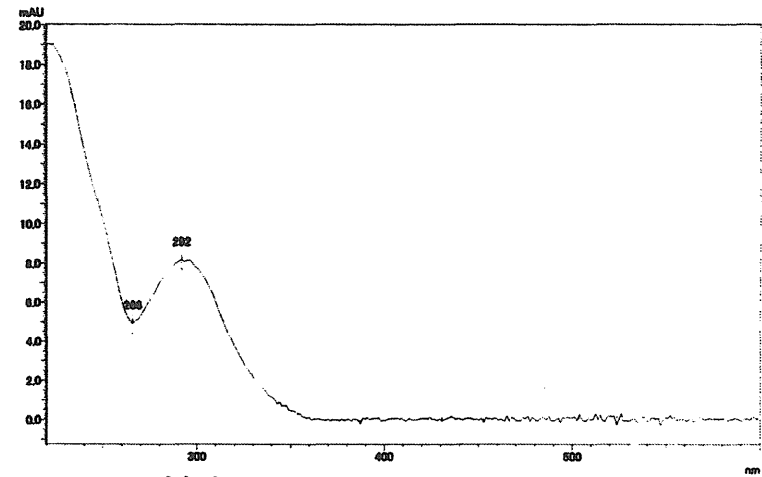
a) クロマトグラム



c) クロマトグラム



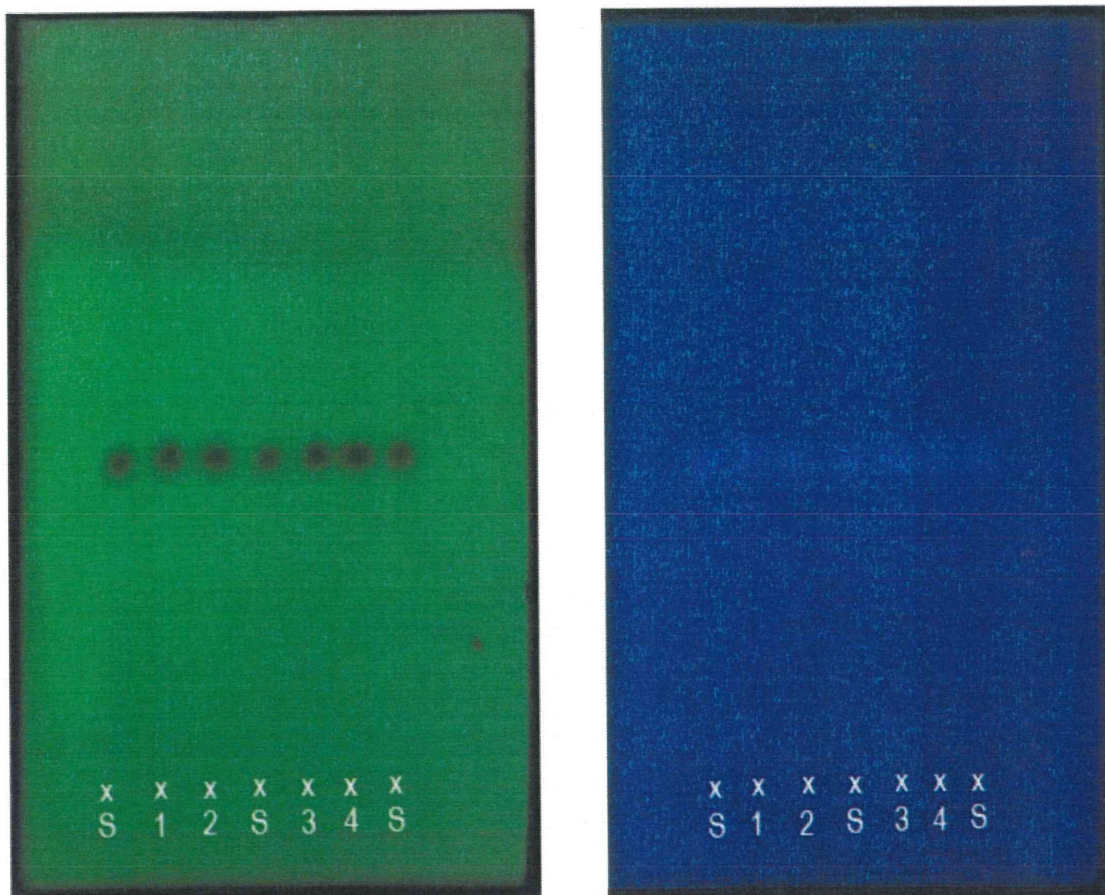
b) マススペクトル



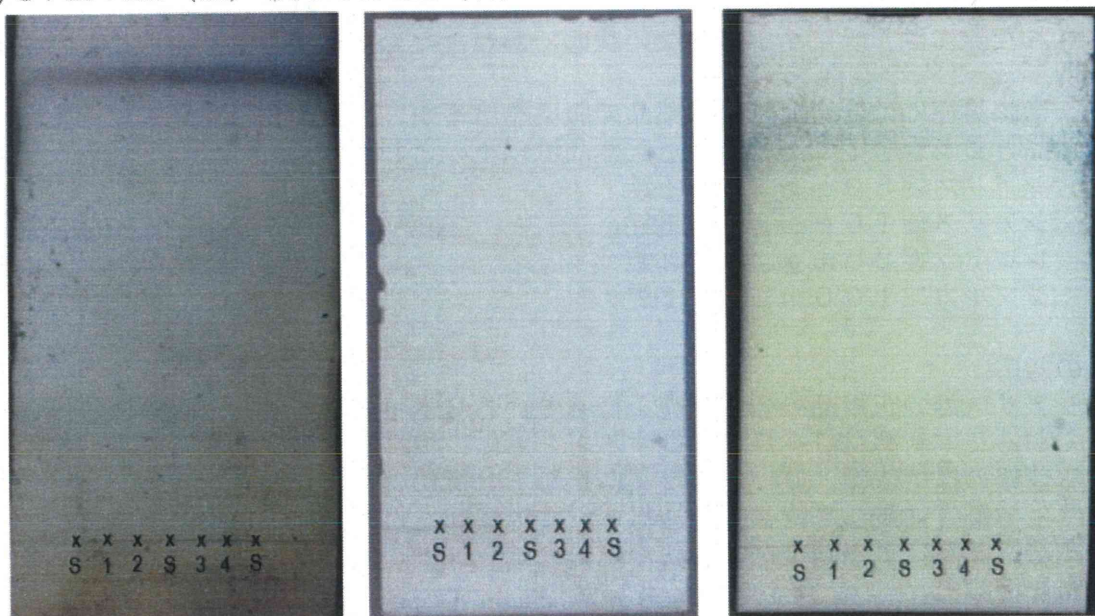
d) UVスペクトル

図5 検体4 (ジフルカン錠 100 mg) のクロマトグラム及びスペクトル





a) UV 254 nm (左) 及び 365 nm (右)



b) 硫酸 (左), ドラーゲンドルフ試薬 (中) 及びリンモリブデン酸 (右)

S : シルデナフィル標品, 1 : シアリス錠 50 mg, 2 : シアリス錠 100 mg,  
3 : レビトラ錠 20 mg, 4 : ジフルカン錠 100 mg

図6 検体及びシルデナフィル標品の各種 TLC

## 報道資料

### 模造医薬品による健康被害に対する注意喚起

平成23年4月26日  
奈良県薬務課 谷、早川  
直通0742-27-8664  
内線3172, 3174

模造医薬品を服用したことによる健康被害の発生事例があり、次のとおり対応しましたので、注意喚起のためお知らせします。

#### 1. 背景

平成23年1月中旬に奈良県立医科大学附属病院から、海外から個人輸入された模造医薬品による健康被害を防ぐための手段がないかどうか相談された。

医師への聞き取りを行ったところ、平成22年6月頃に40歳代の男性が模造医薬品であるシアリス錠50mg（写真）を服用し、数時間でケイレン、意識低下を生じ、同センターに搬送され、脳の静脈に血栓があることが確認されたが、その後回復し退院された。

なお、これらの症状と模造医薬品を飲んだこととの因果関係は否定できない。

また、当該男性には既往症や他の薬品の服薬歴は不明。

#### ※相談にいたったきっかけ

1月中旬に同センターに呼吸苦により搬送され、間質性肺炎で死亡された患者宅から、本事例と同じ模造医薬品であるシアリス錠50mgが届け出された。

・搬送された際には、既に話ができない状態であったため、模造医薬品を服用したかどうかは不明。

・また、当該男性には既往症や他の薬品の服薬歴は不明。

・他に遺品として患者宅にあった模造医薬品は以下のとおり。

シアリス錠50mg	1錠
シアリス錠100mg	1錠
レビトラ錠20mg	2錠
ジフルカン100mg	1錠

#### 2. 県の対応

(1) シアリス錠の正規品の製造販売を行っている日本イーライリリー(株)及び国内発売元である日本新薬(株)へ情報提供するとともに、模造医薬品に関する両者が把握している情報の提供依頼、並びに当該品にかかる分析法の相談などを行った。

(2) 厚生労働省に対して情報提供を行い、注意喚起を掲載した。

(3) 模造医薬品による健康被害を防ぐためのチラシ（別添）を作成し、4月20日から配布を行った。

#### 参考事項

・シアリス錠50mgは、正規の医薬品として販売されていない製品である。

成分名：タダラフィル

効能：勃起不全（満足な性行為を行うに十分な勃起とその維持が出来ない患者）

＜注意喚起していただきたい事項＞

・個人輸入される医薬品等の品質、有効性及び安全性（以下「品質等」という。）については、我が国の薬事法に基づく確認がなされていません。

国によっては、医薬品等の品質等について、我が国と同じレベルでの確認が行われていないことがあります。

・品質等の確認が行われていない医薬品等は、期待する効果が得られなかったり、人体に有害な物質が含まれている場合があります。

（承認前の医薬品等の広告の禁止）

第六十八条 何人も、第十四条第一項又は第二十三条の二第一項に規定する医薬品又は医療機器であつて、まだ第十四条第一項若しくは第十九条の二第一項の規定による承認又は第二十三条の二第一項の規定による認証を受けていないものについて、その名称、製造方法、効能、効果又は性能に関する広告をしてはならない。

（罰則）

第八十五条 次の各号のいずれかに該当する者は、二年以下の懲役若しくは二百万円以下の罰金に処し、又はこれを併科する。

五 第六十八条の規定に違反した者

<国内正規品>

シアリス錠 5mg、10mg、20mg (有効成分：タダラフィル)  
勃起不全 (満足な性行為を行うに十分な勃起とその維持が出来ない患者)



レビトラ錠 5mg、10mg、20mg (有効成分：バルデナフィル塩酸塩水和物)  
勃起不全 (満足な性行為を行うに十分な勃起とその維持が出来ない患者)

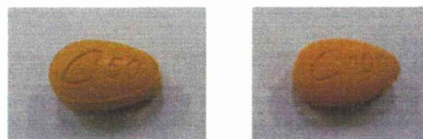


ジフルカンカプセル 50mg、100mg (有効成分：フルコナゾール)  
カンジダ属及びクリプトコッカス属による下記感染症  
真菌血症、呼吸器真菌症、消化管真菌症、尿路真菌症、  
真菌髄膜炎



<模造品>

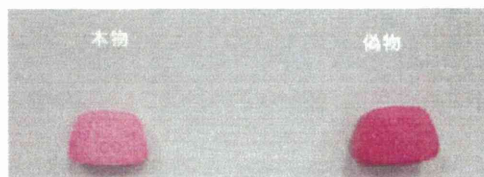
シアリス錠 50mg、100mg  
(正規品としては存在しない規格である。)



レビトラ錠 20mg



ジフルカン錠 100mg  
(海外では正規品として存在する剤型である。)





# 注意しましょう！ 医薬品の個人輸入

正規メーカーが製造したものでない偽造医薬品が、海外だけでなく、インターネットを通じて国内にも流通(※1)しています。

※1 インターネットで流通している偽造医薬品の割合

インターネットで流通している勃起不全治療薬（ファイザー株式会社：パイアグラ、バイエル薬品株式会社：レビトラ、日本イーライリリー株式会社・日本新薬株式会社：シアリス）を調査したところ、55.4%が偽造品でした。

偽造医薬品の中には、有効成分を含まないものから、健康被害を生じるような有害な化学物質を含むものなど、様々なものがあります。

有害物質を含むものを服用することにより、健康を害することもあり、重篤な場合は死に至ることもあります。（死亡を含む多くの健康被害が発生しています。）

## 抗肥満薬 Xenical (orlistat 120mg)

日本において、個人輸入された製品を分析したところ、すべてデンプンであり、有効成分が全く含まれていない偽造医薬品であることが確認された。

## 抗インフルエンザ薬 Tamiflu (Oseltamivir Phosphate 75mg)

米国において、当該製品の有効成分である oseltamivir でなく、cloxacillin を含有した偽造医薬品が確認された。

## 勃起不全治療薬 Cialis (tadalafil) 50mg (※2)

オーストラリアにおいて、当該製品の有効成分である Tadalafil ではなく、sildenafil 0.5mg と血糖降下薬である Glibenclamide 152.8mg（日本での承認用量は1日最大10mg）を含有した偽造医薬品が確認され、重篤な健康被害が発生しました。

## 勃起不全治療薬

シンガポールにおいて、精力増強を謳う違法な製品を使用したことによると疑われる死亡例1例、昏睡例2例を含む89例の入院事例があったことが確認されました。

## 勃起不全治療薬 Cialis (tadalafil) 50mg (※2)

日本において、重篤な健康被害（多臓器不全、血栓症）による入院事例が発生しました。

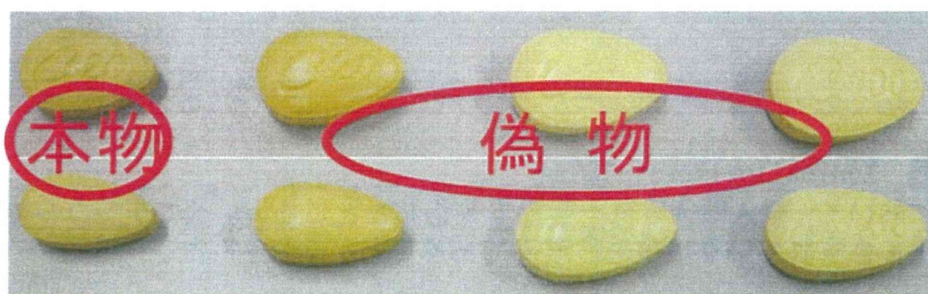
※2 Cialis（シアリス®）の50mg錠や100mg錠は、世界中のどの国でも発売されていません。

また、偽造医薬品が製造されている製造現場は、写真の事例のようにアパートの一室などの不衛生な場所で製造されており、また、麻薬や覚せい剤なども製造されている可能性もあり、それらの物質が混入する恐れもあります。

### <偽造医薬品の製造現場>



### <偽造医薬品の例(シアリス®)> 偽物との判別が難しい



本物のC20錠の表裏

偽物のC20錠、C50錠、C100錠の表裏  
(本物には、C50錠、C100錠は存在しない)

写真提供：日本イーライリリー株式会社、日本新薬株式会社

## 重要

### 医師からの処方せんに基づき、薬局で調剤された医薬品を服用しましょう！

日本では、薬事法という法律のもとに、適切な品質が確保された製造所で、有効性・安全性が認められた医薬品だけが市場に流通しています。

医師の診察により、個人にあった医薬品を処方してもらい、薬局で調剤された医薬品を服用しましょう。

奈良県医療政策部薬務課 TEL 0742-27-8673

## 報道資料

### 模造医薬品による健康被害に対する注意喚起について（第2報） 模造医薬品の分析の結果 シルデナフィル検出

平成23年5月26日  
奈良県薬務課 谷、吉田  
直通0742-27-8664  
内線3172, 3174

平成23年4月26日に報道発表いたしました標記について、平成23年1月に間質性肺炎で死亡された患者（第1報の【症例2】）の家族から提供された模造医薬品を国立医薬品食品衛生研究所で検査したところ、他のED治療薬の有効成分であるシルデナフィルが検出されましたので報告します。

#### 【症例2】 今年1月に間質性肺炎で死亡（シアリス50mgほか所持、服用不明）

##### <検査結果>

患者が所持していた次の模造医薬品について分析した結果、いずれの模造医薬品からも本来の有効成分ではない、他のED治療薬の有効成分であるシルデナフィルが次のとおり検出されました。

1. シアリス錠 50 mg	（1錠 547.5 mg あたり）	シルデナフィル 118 mg 検出
2. シアリス錠 100 mg	（1錠 571.0 mg あたり）	シルデナフィル 60.0 mg 検出
3. レビトラ錠 20 mg	（1錠 262.1 mg あたり）	シルデナフィル 51.1 mg 検出
4. ジフルカン 100 mg	（1錠 417.2 mg あたり）	シルデナフィル 27.4 mg 検出

※ シルデナフィルは、ファイザー社製のバイアグラの有効成分であり、国内正規品は、1錠中シルデナフィル 25mg と 50mg の2種類で、外国では、100mg 規格品もある。この模造医薬品は、ファイザー社によって製造されたものではない。

※ バイアグラ正規品（25mg と 50mg）の主な副作用としては、血管拡張（ほてり、潮紅）、頭痛、動悸などの副作用が報告されている。  
100mg 規格品がある外国における副作用報告では、心血管系の既往症のある患者で、心原性突然死、心筋梗塞、一過性脳虚血発作と高血圧などの重篤な心血管系障害が服用後発現した報告がある。（頻度不明）  
なお、間質性肺炎は、使用上の注意の中で副作用としての記載がない。

※ 検査実施機関  
厚生労働省と連携し国立医薬品食品衛生研究所で実施

##### <進捗状況>

- 模造医薬品の入手先については、本人が死亡されており、家族への聞き取り調査を行ったが、インターネットや雑誌等から購入した明確な情報は得られなかった。  
また、患者が使用していた痕跡も見あたらないほか、新たに模造医薬品も見つからなかった。
- 死因となった間質性肺炎と薬剤との因果関係について調査を行いました。

患者は、高血圧、高脂血症の既往症があり、14年間複数の降圧薬などを服用していた。その間、健康状態は良好。今年1月にかぜ様症状（熱、咳など）を訴えかかりつけ医にかかり、抗生物質や解熱剤などを処方され安静にしていた。

熱が下がらないことから近医を受診したところ、肺炎の疑いと診断され、近隣の病院に搬送された。呼吸困難、気胸など重篤な症状を呈しており、必要な措置を行った上で、医大へ搬送したが、一週間後死亡された。

平成8年から服用していた降圧薬1剤と、かぜ症状の際にもらった抗生物質1剤と解熱剤1剤については、使用上の注意の中で間質性肺炎（頻度不明）の副作用報告はあるが、因果関係を裏付ける情報は見い出せなかった。

#### <注意喚起>

今回、症例2から提供された模造医薬品からは、他のED治療薬の有効成分であるシルデナフィルが検出されました。このような模造医薬品がインターネット上で簡単に入手できてしまうことや、身の回りに存在することが明らかになりました。

このような模造医薬品には有効な成分が含まれ健康被害に陥る可能性があることから、医薬品は医師の診断のもと、適正に服用することを心がけ、個人輸入などによる安易な使用をお控えください。



### <国内正規品>

シアリス錠 5mg、10mg、20mg (有効成分：タダラフィル)  
勃起不全 (満足な性行為を行うに十分な勃起とその維持が出来ない患者)



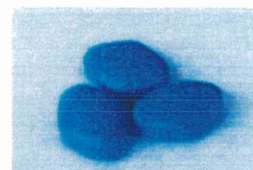
レビトラ錠 5mg、10mg、20mg (有効成分：バルデナフィル塩酸塩水和物)  
勃起不全 (満足な性行為を行うに十分な勃起とその維持が出来ない患者)



ジフルカンカプセル 50mg、100mg (有効成分：フルコナゾール)  
カンジダ属及びクリプトコッカス属による下記感染症  
真菌血症、呼吸器真菌症、消化管真菌症、尿路真菌症、  
真菌髄膜炎



バイアグラ 25mg、50mg (有効成分：シルデナフィルクエン酸塩)  
勃起不全 (満足な性行為を行うに十分な勃起とその維持が出来ない患者)

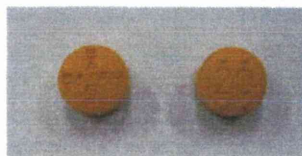


### <模造品>

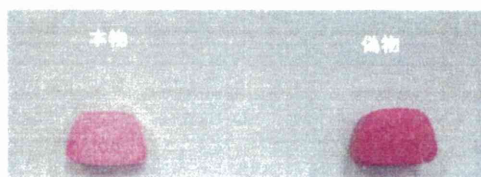
シアリス錠 50mg、100mg  
(正規品としては存在しない規格である。)  
1錠あたり シルデナフィル 118mg 検出  
1錠あたり シルデナフィル 60.0mg 検出



レビトラ錠 20mg  
1錠あたり シルデナフィル 51.1mg 検出



ジフルカン錠 100mg  
(海外では正規品として存在する剤型である。)  
1錠あたり シルデナフィル 27.4mg 検出



厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器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 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長 合田幸広

日本市場に流通するシャタバリ製品の遺伝子解析による基原種の鑑別  
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 糸田幸恵

研究要旨 シャタバリは、主に女性の強壯を目的として使用されるアユルヴェーダ生薬であり、その基原は *Asparagus racemosus* の根と規定されている。*A. racemosus* の成分として、毒性アルカロイドである asparagamine A の単離が報告されているが、asparagamine A のような pyrrolo[1,2-a]azepine アルカロイドは、*Stemona* 属植物に広く分布が知られる化合物であることから、この報告は *Stemona* 属植物を *A. racemosus* と誤同定したことによる可能性が以前より指摘されている。*A. racemosus* 中のアルカロイドの有無はシャタバリ製品の食薬区分上の取り扱いにおいて重要な事項であることから、基原が確認されたシャタバリにおけるアルカロイドの有無に関する研究が必要であると考えられた。その研究の一環として、本研究では、現在日本市場に流通しているシャタバリ製品について、DNA 塩基配列解析による基原種鑑別を行った。その結果、本研究で用いた製品はすべて *Asparagus* 属植物を原料としていることが確認された。さらに、*Stemona* 属植物の混入の有無を確認するため、*Stemona* 属植物特異的なプライマーを用いた ARMS-PCR 法を構築し、各シャタバリ製品に適用したところ、すべての製品において1%以上の *Stemona* 属植物の混入は認められなかった。

協力研究者

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部室長

A. 研究目的

シャタバリは、インドのアユルヴェーダ薬局方において *Asparagus racemosus* の根を基原とする生薬と規定されており<sup>1)</sup>、現地では古来より催乳、催淫、鎮痛、利尿などを目的として用いられてきた。基原植物である *A. racemosus* は、主にインドの森林地帯に分布するユリ科（クサスギカズラ科）の植物であるが、この植物のエキスの薬理作用は多く研究されており、

免疫系の調整や神経変性疾患、下痢、消化不良の治療など、さらに大きな可能性をもつことが示唆されている<sup>2-6)</sup>。

*A. racemosus* の成分としては、これまでに shatavarin 類などのステロイドサポニン、イソフラボンなどの他、毒性アルカロイドである asparagamine A が報告されている<sup>7-11)</sup>。しかし、asparagamine A のような 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である<sup>12)</sup>。*Stemona* 属植物は、約 25 種が知られているが、その多くが塊根状の根を有しており、中国や東南アジアの市場では、塊根状の根の形状がよく

似ていることから、異なる種由来であっても、また時には異なる科由来のものでも現地固有の同じ名称で呼ばれている<sup>12, 13)</sup>。このことから、*A. racemosus* からの asparagamine A の単離の報告は、*Stemona* 属植物を *A. racemosus* と誤同定した結果による可能性が以前より指摘されており<sup>12-14)</sup>、現地において *Asparagus* 属と *Stemona* 属植物の根が混同されていることが予想される。

近年、補完代替医療への関心の高まりから、主に女性用強壯剤としてシャタバリを原料に用いたいいわゆる健康食品が日本をはじめ世界各国で流通している。シャタバリ中のアルカロイドの有無はシャタバリ製品の食薬区分上の取り扱いにおいて重要な事項であることから、基原が確認されたシャタバリにおけるアルカロイドの有無に関する研究が必要であると考えられる。その研究の一環として、本研究では、現在日本市場に流通しているシャタバリ製品について、DNA 塩基配列解析による基原種鑑別を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 実験材料

本研究に使用したシャタバリ製品の詳細を 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。

また、*A. racemosus*、*S. collinsae* の標準植物試料は、東北大学菅野博士、タイ国 Kasetsart 大学 S. Jiwajinda 博士よりそれぞれ提供を受けた。

### 塩基配列解析

*A. racemosus* 標準試料は、皮を取り除き粉碎した後 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。Sha-3, 4, 6, 11 以外のシャタバリ製品試料は、粉碎後上記同様に DNA を抽出した。Sha-3, 4 (砂糖含有), Sha-6, 11 (錠剤) は粉碎後滅菌水に溶かし、遠心した後の沈殿物を乾燥させたものを DNA 抽出に用いた。

上記のように抽出した *A. racemosus* とシャタバリ製品の DNA を鋳型とし、全植物の葉緑体 DNA *trnL* 領域で保存性の高い配列に設計したユニバーサルプライマー、*Asparagus* 属植物に特異的な *trnL* 領域 (DDBJ/GenBank/EBI accession No. AJ441164-AJ441168, AB508807) に設計したプライマーを用いてそれぞれ PCR を行い、目的とする配列を増幅させた。反応溶液は、KOD plus ver. 2 buffer (Toyobo)、0.2 mM dNTP mix、0.5 U KOD plus polymerase (Toyobo)、0.5  $\mu$ M プライマー、1.8 mM  $MgSO_4$  を含む液に、1 または 2  $\mu$ L DNA 溶液を加え、全量を 20  $\mu$ L とした。PCR 反応は、DNA Engine thermal cycler (Bio-Rad) を用いて行い、温度プログラムは、94°C 2 min; 98°C 10 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 min, 40 cycles; 68°C 2 min (ユニバーサルプライマーを用いた PCR)、または 94°C 2 min; 98°C 10 sec, 50°C 30 sec, 68°C 30 sec, 45 cycles; 68°C 1 min (*Asparagus* 属特異的なプライマーを用いた PCR) とした。増幅産物は、マイクロチップ電気泳動装置 MCE202 MultiNA (Shimadzu) を用いて電気泳動した。得られた PCR 産物は、MinElute PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、ダイレクトシーケンスまたは pCR-Blunt vector (Invitrogen) に

サブクローニング後、塩基配列を決定した。PCR産物または plasmid の蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/life technologies) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3130-genetic analyzer (Applied Biosystems/life technologies) により行った。

### Stemona 属植物検出のための ARMS (amplification refractory mutation system) PCR

*Stemona* 属植物の *trnL* 領域 (Genbank accession No. AB490125-AB490133<sup>15)</sup>) に特異的な配列にプライマーを設計した。*A. racemosus* の根に *S. collinsae* の根を 0, 1, 5, 10, 20, 40, 100%混合した試料から、前述同様に抽出した DNA を鋳型として、上記のプライマーを用いて PCR を行うことにより、検出限界及び特異性を調べた。反応溶液は、10  $\mu$ L Ampdirect plus (Shimadzu)、0.5 U Ex Taq polymerase (Takara)、0.5  $\mu$ M プライマーを含む液に、1  $\mu$ L DNA 溶液を加え、全量を 20  $\mu$ L とした。PCR プログラムは、94°C 2 min; 98°C 10 sec, 50°C 30 sec, 72°C 30 sec, 40 cycles; 72°C 1 min で行った。全シャタバリ製品から抽出した DNA を鋳型に、同条件で PCR を行うことにより、各シャタバリ製品の *Stemona* 属植物混入の有無を確認した。

## C. 研究結果及び考察

### 塩基配列解析

Fukuda らは、*A. racemosus* を含む *Asparagus* 属植物 24 種について、*petB* intron、*petD-rpoA*

領域及び *trnL* intron、*trnL-trnF* 領域の配列解析を行っている (データベース上に *A. racemosus* の *trnL* intron、*trnL-trnF* 領域の配列情報は登録されていない)。その結果、これらの領域において種間の特徴的な塩基配列の違いは極めて少ない、または全くみられなかったことから、*Asparagus* 属植物種は形態に多様性があるにも関わらず、種間の遺伝的差異は小さいのではないかと推測している<sup>16)</sup>。そのため、形態の全くわからない、食品製品の原料植物を DNA 配列解析だけで *A. racemosus* と同定するのは困難であると予想される。一方、特に *trnL* intron、*trnL-trnF* 領域は植物の遺伝子鑑別によく用いられる領域であり他の植物の配列情報も豊富にある。従って、これらの領域の配列を解析することにより、少なくとも *Asparagus* 属植物由来のものであるかどうかの判断はできると考えられる。そこで、各シャタバリ製品の原料植物の同定を行うため、各シャタバリ製品及びデータベース上の情報がない *A. racemosus* の標準植物試料の *trnL* intron 領域の塩基配列解析を行った。

本研究で使用された *A. racemosus* 標準植物試料の *trnL* intron 領域の配列は、データベース上の *Asparagus* 属植物 (*A. cochinchinensis*, AB508807; *A. acutifolius*, AJ441168; *A. falcatus*, AJ441166; *A. officinalis*, AJ441164) の配列と 99%の相同性を示した。また、11 個のシャタバリ製品のうち、sha-1, 2, 5 の *trnL* intron 領域の配列は同一であり、*A. racemosus* の該当配列と 487 bp 中 1 bp を除き一致した。しかし、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は不