

可能だった。その要因としては、Sha-1, 2, 5 以外の試料はカプセル剤や錠剤など、加工試料であるため、原料の段階で *Asparagus* 属植物に別の植物が混入した可能性の他、粉砕器の使い回しや賦形剤の添加等加工段階において混入した可能性が考えられる。

そこで、*Asparagus* 属植物の *trnL* intron 領域に特異性の高いプライマーを設計し、これを用いて PCR を行ったところ、全ての試料から 183 bp の増幅産物が得られた (Fig. 1)。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、*A. racemosus* の配列と 100% の相同性を示した。

今回シャタバリ製品より得られた *trnL* intron 配列は、*A. racemosus* 標準植物試料を始めとする複数の *Asparagus* 属植物のものと相同性が高かったことから、*Asparagus* 属植物の配列であると確認された。

ARMS-PCRによる *Stemona* 属植物混入の確認法の開発とシャタバリ製品への応用

今回使用されたシャタバリ製品は、すべて *Asparagus* 属植物を原料に含むことが確認されたが、前述の通りユニバーサルプライマーを用いた *trnL* intron 領域の PCR では、sha-1, 2, 5 以外の製品から複数の増幅産物が得られたため、他の植物が混入している可能性が示唆された。そこで、シャタバリ製品中の *Stemona* 属植物の混入の有無を確認するため、ARMS (amplification refractory mutation system)-PCR による *Stemona* 属植物の検出法を検討した。

まず、データベース中の *Stemona* 属及び

Asparagus 属植物の *trnL* 領域について配列比較を行い、*Stemona* 属植物特異的な配列にプライマーを設計した。次に、*A. racemosus* 標準試料に *S. collinsae* の標準試料を 0, 1, 5, 10, 20, 40, 100% (w/w) 混入させた試料を作製し、これらの試料から抽出した DNA を鋳型に、上記のプライマーを用いて PCR を行った。その結果、*S. collinsae* 0% (*A. racemosus* 100%) の試料からは増幅産物が認められない一方で、*S. collinsae* 1 - 100% の試料では、*S. collinsae* をわずかに 1% 混入させた試料からも、配列情報から予測される約 450 bp の増幅産物が得られた (Fig. 2)。なお、Fig. 2 では、*S. collinsae* 5% の試料より 1% の試料から得られた増幅産物の方が多く観察された。本 PCR は鋳型として標準試料の根から抽出した DNA を用いており、DNA の純度がやや低かったため、このような微量な鋳型の PCR 反応の際に、鋳型量と増幅産物量が相関しなかったものと考えられる。しかし、*S. collinsae* 1% の試料でも増幅産物が得られることは複数回の分析により確認している。従って、本方法は *Stemona* 属植物に高い特異性を持ち、少なくとも 1% の混入を検知できる感度であることが確認できた。

そこで、この方法を用いて、すべてのシャタバリ製品から抽出した DNA を鋳型に PCR を行った結果、増幅産物は得られなかった (Fig. 3)。このことから、今回分析したシャタバリ製品に *Stemona* 属植物は (少なくとも 1% 以上は) 混入していないと考えられた。

D. 結論

現在流通しているシャタバリ製品の原料植

物を確認するため、DNA 塩基配列解析を行ったところ、すべての製品は *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結果、すべての製品に *Stemona* 属植物は混入していないことが判明した。中国や東南アジアの市場では *Asparagus* 属と *Stemona* 属植物は混同されている可能性があることが指摘されているが、本研究で行った ARMS-PCR 法は、シャタバリ製品中の *Stemona* 属植物の有無について簡易的に調査を行う手法として有用であると思われる。

E. 健康危険情報

直接的な健康危機情報はない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kumeta Y., Maruyama T., Wakana D., Kamakura H., Goda Y., Method for identifying the botanical origin of shatavari products and its application for survey analysis of products in the Japanese market. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **18**, 163-167 (2011)

2. 学会発表

1) 桑田幸恵, 丸山卓郎, 若菜大悟, 鎌倉浩之, 合田幸広: シャタバリ (*Asparagus racemosus*) を原料とするいわゆる健康食品の基原種について (2011年9月24,25日, 東京)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

参考文献

- 1) The Ayurvedic Pharmacopoeia of India, 1st Ed., part-I, Vol. IV, Ministry of Health and Family Welfare, India (2008)
- 2) Gautam M., Diwanay S., Gairola S., Shinde Y., Patki P., Patwardhan B., Immunoadjuvant potential of *Asparagus racemosus* aqueous extract in experimental system. *J. Ethnopharmacol.* **91**, 251-255 (2004)
- 3) Bhattacharya A., Murugandam A. V., Kumar V., Bhattacharya S. K., Effect of polyherbal formulation, EuMil, on neurochemical perturbations induced by chronic stress. *Ind. J. Exp. Biol.*, **40**, 1161-1163 (2002)
- 4) Pariah M. S., Hemnani T., Experimental excitotoxicity provokes oxidative damage in mice brain and attenuation by extract of *Asparagus racemosus*. *J. Neural Transm.*, **111**, 1-12 (2004)
- 5) Venkatesan N., Thiyagarajan V., Narayanan S., Arul A., Raja S., Kumar S. G. V., Rajarajan T., Perianayagam J. B., Anti-diarrhoeal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **8**, 39-45 (2005)
- 6) Dalvi S. S., Nadkarni P. M., Gupta K. C., Effect of *Asparagus racemosus*

- (Shatavari) on gastric emptying time in normal healthy volunteers. J. Postgraduate Med., **36**, 91-94 (1990)
- 7) Hayes P. Y., Jahidin A. H., Lehmann R., Penman K., Kitching W., De Voss J. J., Steroidal saponins from the roots of *Asparagus racemosus*. Phytochemistry, **69**, 796-804 (2008)
- 8) Saxena V. K., Chourasia S., A new isoflavone from the roots of *Asparagus racemosus*. Fitoterapia, **72**, 307-309 (2001)
- 9) Sekine T., Fukasawa N., Kashiwagi Y., Ruangrungsi N., Murakoshi I., Structure of asparagamine A, a novel alkaloid from *Asparagus racemosus*. Chem. Pharm. Bull., **42**, 1360-1362 (1994)
- 10) Sekine T., Ikegami F., Fukusawa N., Kashiwagi Y., Aizawa T., Fujii Y., Ruangringsi N., Murakoshi I., 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**, 391-393 (1995)
- 11) Wiboonpun N., Phuwapraisirisan P., Tip-pyang S., Identification of antioxidant compound from *Asparagus racemosus*. Phytother. Res. **18**, 771-773 (2004)
- 12) Gregner H., Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids. Planta Med., **72**, 99-113 (2006)
- 13) Brem B., Seger C., Pacher T., Hofer O., Vajrodaya S., Greger H., Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloids - A source of potent natural insecticides. J. Agri. Food Chem., **50**, 6383-6388 (2002)
- 14) Brüggemann M., McDonald A. I., Overman L. E., Rosen M. D., Schwink L., Scott J. P., Total synthesis of (±)-didehydrostemofoline (asparagamine A) and (±)-isodidehydrostemofoline. J. Am. Chem. Soc., **125**, 15284-15285 (2003)
- 15) Fan L. L., Zhu S., Chen H. B., Yang D. H., Cai S. Q., Komatsu K., Molecular analysis of *Stemona* plants in China based on sequences of four chloroplast DNA regions. Biol. Pharm. Bull., **32**, 1439-1446 (2009)
- 16) Fukuda T., Ashizawa H., Suzuki R., Ochiai T., Nakamura T., Kanno A., Kameya T., Yokoyama J., Molecular phylogeny of the genus *Asparagus* (Asparagaceae) inferred from plastid *petB* intron and *petD-rpoA* intergenic spacer sequences. Plant Species Biol., **20**, 121-132 (2005)

Table 1 Details of the commercial shatavari products used in this study

Sample no.	Product form	Composition*
Sha-1	Powder	100% shatavari powder
Sha-2	Powder	100% shatavari powder
Sha-3	Granule	Shatavari 0.56 g with sugar 4.44 g /5g
Sha-4	Granule	Shatavari with sugar and water
Sha-5	Powder	Shatavari powder
Sha-6	Tablet	Shatavari churna 500 mg /tablet
Sha-7	Capsule	Shatavari 400 mg /capsule
Sha-8	Capsule	Root extract 500 mg /capsule
Sha-9	Capsule	Shatavari 250 mg /capsule
Sha-10	Capsule	Root extract 500 mg /capsule
Sha-11	Tablet	Root extract 250 mg, stem and root powder 400 mg /tablet

* Each composition is sourced to the product information.

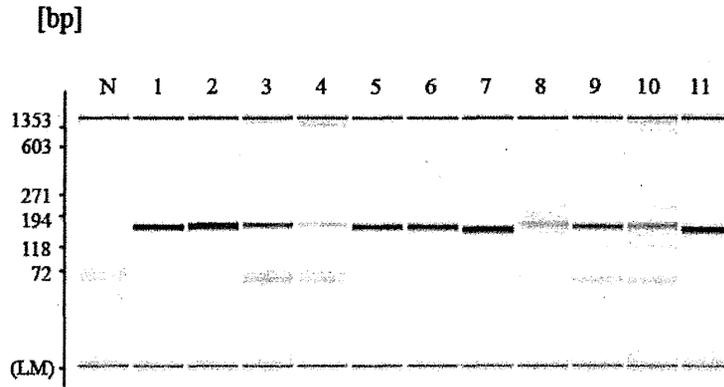


Fig. 1 PCR amplification of *Asparagus* specific *trnL* intron region of shatavari products
 Lane numbers correspond to those in Table 1.
 Lane N means no template control.

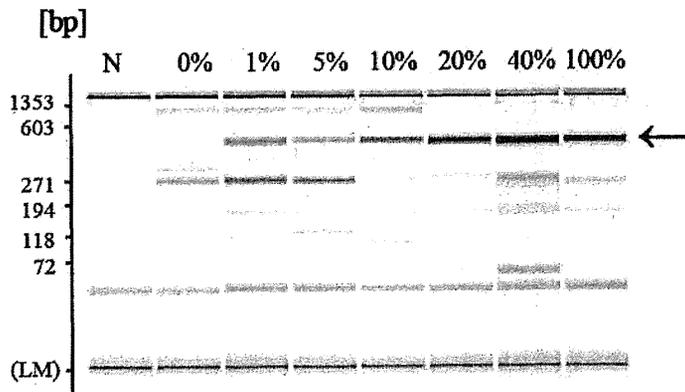


Fig. 2 Sensitivity of PCR with the primers based on *Stemonon* specific *trnL* intron region
 An arrow indicates the amplicons of *Stemonon* specific sequence.
 Percentages mean the ration of *S. collinsae* in *A. racemosus*.
 Lane N means no template control.

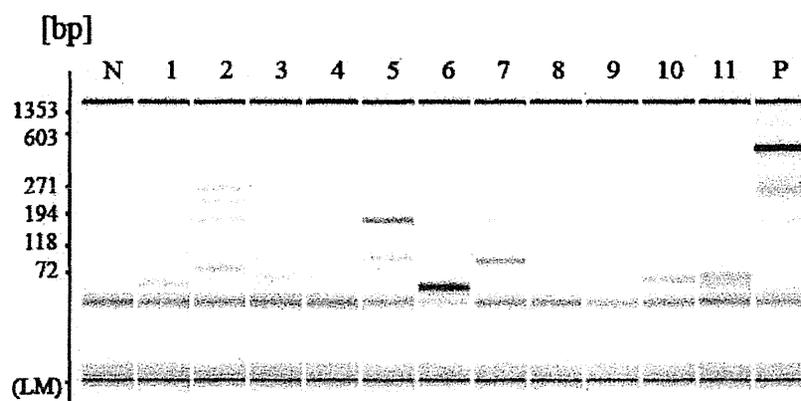


Fig. 3 Application of ARMS-PCR to shatavari products by specific *Stemona* DNA amplification
 Lane numbers correspond to those in Table 1.
 P, Positive control (*S. collinsae*)

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

シヤタバリ製品の成分分析による基原種鑑別とアルカロイド成分について

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部研究員 糸田幸恵

研究要旨 シヤタバリ (*Asparagus racemosus*) 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、*A. racemosus* 中の毒性アルカロイド asparagamine A の有無について検証を行った。まず、遺伝子解析により *Asparagus* 属植物を原料とすることが確認されたシヤタバリ製品について、*A. racemosus* に特徴的なステロイドサポニン成分を分析することにより、これらの製品の基原が *A. racemosus* であることを明らかにした。さらに、基原が確認された製品と *A. racemosus* 標準植物試料のアルカロイド成分の分析を行い、いずれの検体にも asparagamine A は含有していないことを確認した。

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

若菜大悟 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部流動研究員

A. 研究目的

シヤタバリは、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¹⁾、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²⁻⁶⁾。

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⁷⁻¹¹⁾。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¹²⁾。*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^{12, 13)}。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¹²⁻¹⁴⁾、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。そこで、まず先の研究において日本で流通しているシャタバリ製品 11 検体について、塩基配列解析による基原種の確認を行った。その結果、すべての製品において *Stemona* 属植物の混入は認められず、*Asparagus* 属植物が原料として使用されていることが確認された¹⁵⁾。しかしながら、*Asparagus* 属植物は、これまで配列解析が行われている領域において、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いことが知られており¹⁶⁾、塩基配列解析だけで種の同定をするのは困難であった。ケモタキソノミー的にみると、*Asparagus* 属植物数種については成分分析もなされており、ステロイドサポニン類を含有することが知られている^{7,17-19)}。特に *Asparagus* 属植物の中でも *A. racemosus* では、shatavarin VI や VII のような特徴的なステロイドサポニンの存在が報告されている⁷⁾。そこで我々は、*A. racemosus* に特徴的なステロイドサポニン類分析を実施することにより、遺伝子解析に加えケモタキソノミーの観点から、シャタバリ製品の基原種が *A. racemosus* であることを明らかにした。

さらに、基原が確認された製品とともに *A.*

racemosus 標準植物試料のアルカロイド分析を行うことにより、*A. racemosus* 中の asparagine A 含有の有無について検証を行った。

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。

ステロイドサポニン分析

1) 試料調製

エキス由来の試料である Sha-8, 11 は 50 mg、それ以外の試料 (Sha-3, 4 は除く) は 500 mg を秤取し、5 mL の MeOH を加え、震盪抽出 (300 min⁻¹, 15 min) した。終了後、1200×g, 5 min 遠心し、上清を試料溶液とした。また、Sha-3, 4 に関しては、各 4.46 g (sha-3 製品情報に基づき、*A. racemosus* 500 mg に相当する量) を秤取し、EtOH を 20 mL 加え、震盪抽出 (300 min⁻¹, 15 min) した後、残渣をろ去した。ろ液から溶媒を減圧留去した後、MeOH 5 mL に再溶解し、試料溶液とした。

2) LC-TOFMS 分析

装置に LCMS-IT-TOF (Shimadzu) を、カラムに XBridge C18 (2.1 x 100 mm, 3.5 μm; Waters) を用いた。移動相は、0.3% AcOH を A 液、0.3% AcOH を含む acetonitrile を B 液とし、流速 0.4

mL/min で送液し、以下のグラジエントプログラムを用いた：10% B (0.00 min) - 77.5% B (15 min)。試料注入量は 1 mL、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 ネガティブモードを用い、キャピラリー電圧 1570 V、乾燥ガス 100 kPa (N₂)、ネブライザーガス流量 1.5 mL/min、ヒートブロック温度 200°C で使用した。また、glycyrrhizin を外部標準として精密質量の補正をした。

3) LC-QMS 分析

装置に LCMS-2020 (Shimadzu) を用い、カラム、移動相、グラジエントプログラム等は上記と同様の条件で行った。質量分析は、ESI negative の SIM モード (m/z : 739, 869, 883, 885, 901, 927, 1033, 1065) で行い、キャピラリー電圧は 1100 V、乾燥ガスは 10 L/min, 250°C (N₂) で使用した。ネブライザーガス流量、ヒートブロック温度は上記と同様である。

サポゲニン分析

1) 加水分解

サポニン分析の際に調製した各試料の MeOH エキス 800 mL に、6N HCl 400 mL を加えて 80°C で 3 時間インキュベートすることにより、サポニンを加水分解した。終了後、反応溶液を 15,500×g, 1 分遠心し、得られた上清を LC-MS 分析用試料とした。

2) LC-TOFMS 分析

移動相を、H₂O:Acetonitrile = 15:85 のアイソクラティック条件とした以外は、ステロイドサポニン分析の時の条件と同様に行った。

アルカロイド分析

1) Asparagamine A の単離

S. collinsae 標準植物試料 1.75 g を MeOH (20 mL×2) で終夜抽出した。得られた MeOH エキス (1.03 g) を酸及び塩基性条件下、酢酸エチルエステル (20 mL×2) で順次分配し、塩基性画分 8.2 mg を得た。このものを分取の HPLC に供することにより、asparagamine A (1.5 mg) を単離した。構造の確認は、NMR (ECA-500; Jeol) 及び MS (LCMS-IT-TOF; Shimadzu) データを文献値²⁰⁾と比較することにより行った。

2) LC-TOFMS 分析

まず、asparagamine A 標品を 1000, 100, 10 ng/mL に調製し、下記に示す条件で分析を行うことにより、検出限界を確認した。次いで、*A. racemosus* 標準試料の MeOH エキス及びサポニン分析の際に調製した各試料の MeOH エキスを試料溶液とし、各サンプル中の asparagamine A の確認を行った。LC-TOFMS 分析は、移動相を 0.3%AcOH (A) 及び 0.3% AcOH を含む acetonitrile (B) とし、グラジエントプログラムを 10% B (0.00 min) - 30% B (10 min)、イオン化を ESI ポジティブモードとした 以外はステロイドサポニン分析の時の条件と同様に行った。

C. 研究結果及び考察

シャタバリ製品中のステロイドサポニン類の分析

A. racemosus からは、特徴的な成分として、約 10 種のステロイドサポニンが報告されている⁷⁾。本研究で使用するシャタバリ製品 11 検体が、*A. racemosus* を基原としていることを明ら

かにするため、まずシャタバリ製品におけるステロイドサポニン成分の LC-MS 分析を行った。

始めに、入手したサンプルの中で一番量の多い Sha-2 サンプルについて分析を行った。論文報告されている 10 種のサポニンは、いずれも標品が入手困難だったため、精密質量分析による各成分の推定を行った。Sha-2 のメタノールエキスを調製し、ネガティブモードで LC-TOFMS 分析を行い、論文中の 10 種のサポニンに相当する 8 種の分子式に基づく疑似分子イオンピーク (m/z 739, 869, 883, 885, 901, 927, 1033, 1065) について、マスクロマトグラムを確認したところ、14 本のピークが観察された。この内の 12 本のピークのそれぞれの精密質量は、shatavarin X に相当すると思われる m/z 927 のピークを除き、全て該当する成分の分子式から推定される精密質量から ± 3 mmu 以内の値を示した (Fig. 2)。このうち保持時間 11.5 min に確認されたピーク (peak No. 8) は、 m/z 885 を示したこと、また同様の移動相を用いた際の 10 種のサポニンの溶出の順番の情報により [7]、shatavarin IV と推定され、別途行った LC-MS SIM モードでの分析においても shatavarin IV と推定されるピークが最大のピークであった。このことは、*A. racemosus* に含有されるステロイドサポニンのうち shatavarin IV が主要成分であるという報告と一致する⁷⁾。

同様に、保持時間 11.0 min に確認されたピーク (peak No. 6) は、*A. racemosus* に特徴的な成分である shatavarin VII (Type II) と推定され、このことはポジティブモードの MS/MS 分析において、アグリコンである dehydrosarsasapogenin (Fig. 1) に相当する

フラグメントイオン ($m/z=415$) が観測されたことから支持された。

さらに、Sha-2 メタノールエキスを酸加水分解し、その生成物をポジティブモードで LC-MS 分析したところ、shatavarin 類の主アグリコンである sarsasapogenin (Fig. 1) の標品と保持時間 ($t_R=3.9$) 及び質量数 ($m/z=417.30$) が一致するピークを認めた (Fig. 3)。以上の事から、LC-TOFMS 分析で見出されたピーク群は、*A. racemosus* から報告されているステロイドサポニン類であると考えられた。

同様に、全検体のメタノールエキス及び酸加水分解成績体中の分析を行ったところ、全ての検体においてサポニン類及び sarsasapogenin が検出された (data not shown)。

10 種のステロイドサポニンのうち、sarsasapogenin をアグリコンとするサポニン (Fig. 1, Type III) はクサスギカズラ科の植物に広く分布する化合物である。その中で shatavarin IV や shatavarin I (Type IV) は *Asparagus* 属の他の種からも単離報告があるが^{17, 18)}、sarsasapogenin の C-22 における F 環の立体配置が異なる化合物をアグリコンとするサポニン (Type I) や dehydrosarsasapogenin (Fig. 1) をアグリコンとするサポニン (Type II) の含有が報告されているのはクサスギカズラ科では *A. racemosus* のみであり⁷⁾、その他でもユリ科の *Dichelostemma multiflorum*²¹⁾ や *Yucca schidigera*²²⁾、キンポウゲ科の *Helleborus macranthus*²³⁾ からの報告例しかない。

以上のように、全ての検体において、*A.*

racemosus に特異的なサポニンを含む、*A. racemosus* の根から単離報告のある 10 種のステロイドサポニンとみられるピーク群が検出された。先に行った塩基配列情報を利用した実験結果と合わせて考えると、今回の研究で使用されたシャタバリは、全て *A. racemosus* を基原とすることが確認された。

A. racemosus 標準植物試料とシャタバリ製品のアルカロイド分析

次に、地上部を含めた形態学的見地及び DNA 配列解析により *A. racemosus* と同定された *A. racemosus* 標準試料とともに、これらの製品について LC-MS による asparagamine A の分析を行い、*A. racemosus* 中の同化合物含有の有無について確認した。

まず、*A. racemosus* の他にこれまでに asparagamine A の単離報告のある *S. collinsae* ^{13, 20, 24)} より同化合物の単離を行い、1.5 mg の asparagamine A を得た。得られたものを標準試料として LC-TOFMS 分析を行ったところ、asparagamine A の検出限界は 0.1 ng であった (Fig. 4-A)。

同条件で *A. racemosus* の根の MeOH エキスを分析した結果、asparagamine A のピークは検出されなかった (Fig. 4-B)。さらに、シャタバリ製品 11 検体についても同様に分析したが、全ての製品において asparagamine A のピークは検出されないことが確認された (Fig. 4-C)。

また、全ての検体の MeOH エキスの分析において、主要なピークの $[M+H]^+$ を確認した。これまでに約 130 種の pyrrolo[1, 2-a]azepine アルカロイド (分子量は 223 から 563) の存在が知

られているが、これらのアルカロイドと考えられるピークは検出されなかった。このことは、アルカロイドの生合成的観点からも、*A. racemosus* に asparagamine A は含まれないという我々の結果を支持するものである。

今回の研究結果により、*A. racemosus* 標準植物とシャタバリ製品からは asparagamine A が検出されないことが明らかとなった。*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みられないものもある。さらに、asparagamine A が単離された *A. racemosus* サンプルから dihydrophenanthrene 誘導体である racemosol (=stemanthrene D) の単離も報告されているが ²⁵⁾、この化合物は *S. collinsae* をはじめいくつかの *Stemona* 属植物に特有のステルベンであることが示されている ^{26, 27)}。上述のように、*A. racemosus* と *Stemona* 属植物の根の形態が似ていることも鑑みて、*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高いと考えられる。

A. racemosus におけるアルカロイド含有の有無は、日本において、シャタバリ製品を食品と医薬品のどちらに区分するか判断する際の重要な事項である。本研究結果は、日本におけるシャタバリ製品の食薬区分を行う際に重要な情報を与えるものである。

D. 結論

遺伝子解析により *Asparagus* 属植物を原料とすることが確認されたシャタバリ製品について、*A. racemosus* に特徴的なステロイドサポニ

ン成分を分析することにより、これらの製品の基原が *A. racemosus* であることを確認した。

さらに、基原が確認された製品と *A. racemosus* 標準植物試料のアルカロイド成分の分析を行い、いずれの検体にも asparagamine A は含有されていないことを確認した。このことから、*A. racemosus* に asparagamine A は含まれないと考えられる。

E. 健康危険情報

直接的な健康危機情報はない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abbaskhan A., Choudhary M. I., Ghayur M. N., Parween Z., Shaheen F., Gilani A., Maruyama T., Iqbal K., Tsuda Y., Biological activities of Indian celery, *Seseli diffusum* (Roxb. Ex Sm.) Sant. & Wagh. *Phytother. Res.*, on line available, doi: 10.1002/ptr.3600 (2011)
- 2) Kumeta, Y., Maruyama, T., Wakana, D., Kamakura, H., Goda, Y., Chemical analysis to reveal botanical origin of shatavari products and confirmation of absence of alkaloid asparagamine A in *Asparagus racemosus*. *J. Nat. Med.* **66**, accepted (2012).

2. 学会発表

- 1) 糸田幸恵, 丸山卓郎, 若菜大悟, 鎌倉浩之, 合田幸広: シャタバリ (*Asparagus racemosus*) を原料とするいわゆる健康食品の基原種に

ついて (2011年9月24, 25日, 東京)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

参考文献

- 1) The Ayurvedic Pharmacopoeia of India, 1st Ed., part-I, Vol. IV, Ministry of Health and Family Welfare, India (2008)
- 2) Gautam M., Diwanay S., Gairola S., Shinde Y., Patki P., Patwardhan B., Immunoadjuvant potential of *Asparagus racemosus* aqueous extract in experimental system. *J. Ethnopharmacol.* **91**, 251-255 (2004)
- 3) Bhattacharya A., Murugandam A. V., Kumar V., Bhattacharya S. K., Effect of polyherbal formulation, EuMil, on neurochemical perturbations induced by chronic stress. *Ind. J. Exp. Biol.*, **40**, 1161-1163 (2002)
- 4) Pariah M. S., Hemnani T., Experimental excitotoxicity provokes oxidative damage in mice brain and attenuation by extract of *Asparagus racemosus*. *J. Neural Transm.*, **111**, 1-12 (2004)
- 5) Venkatesan N., Thiyagarajan V., Narayanan S., Arul A., Raja S., Kumar S. G. V., Rajarajan T., Perianayagam J. B., Anti-diarrhoeal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **8**, 39-45 (2005)

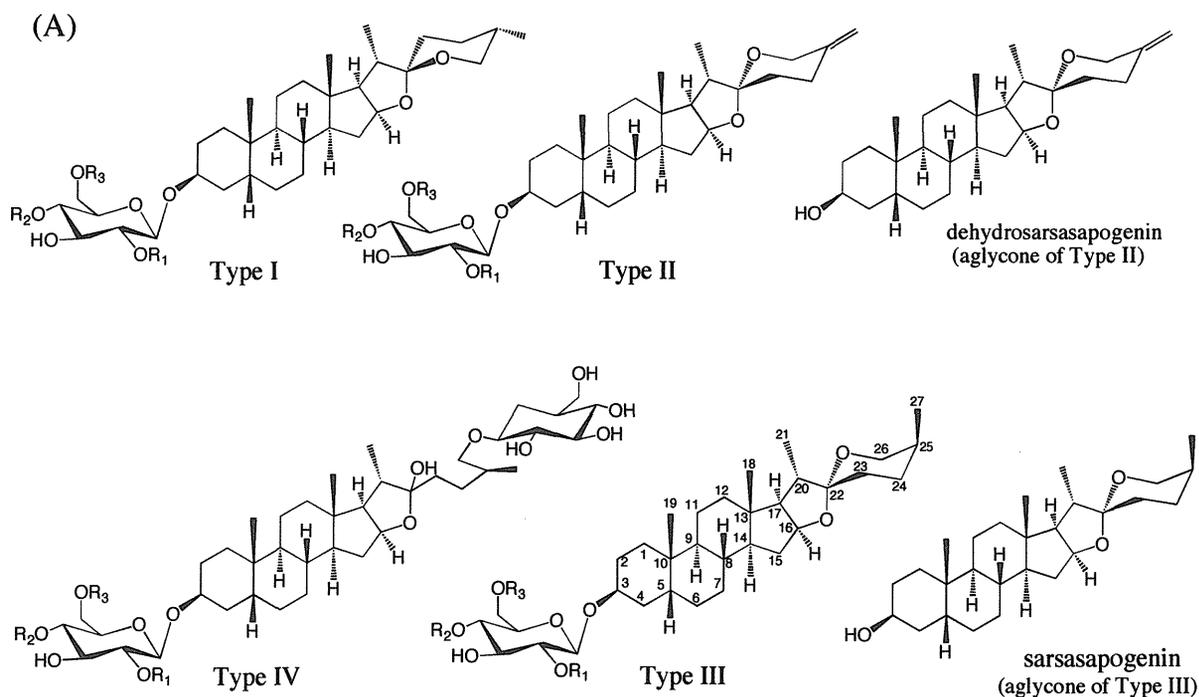
- 6) Dalvi S. S., Nadkarni P. M., Gupta K. C., Effect of *Asparagus racemosus* (Shatavari) on gastric emptying time in normal healthy volunteers. J. Postgraduate Med., **36**, 91-94 (1990)
- 7) Hayes P. Y., Jahidin A. H., Lehmann R., Penman K., Kitching W., De Voss J. J., Steroidal saponins from the roots of *Asparagus racemosus*. Phytochemistry, **69**, 796-804 (2008)
- 8) Saxena V. K., Chourasia S., A new isoflavone from the roots of *Asparagus racemosus*. Fitoterapia, **72**, 307-309 (2001)
- 9) Sekine T., Fukasawa N., Kashiwagi Y., Ruangrungsi N., Murakoshi I., Structure of asparagamine A, a novel alkaloid from *Asparagus racemosus*. Chem. Pharm. Bull., **42**, 1360-1362 (1994)
- 10) Sekine T., Ikegami F., Fukusawa N., Kashiwagi Y., Aizawa T., Fujii Y., Ruangrungsi N., Murakoshi I., 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**, 391-393 (1995)
- 11) Wiboonpun N., Phuwapraisirisan P., Tip-pyang S., Identification of antioxidant compound from *Asparagus racemosus*. Phytother. Res. **18**, 771-773 (2004)
- 12) Gregner H., Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids. Planta Med., **72**, 99-113 (2006)
- 13) Brem B., Seger C., Pacher T., Hofer O., Vajrodaya S., Greger H., Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloids - A source of potent natural insecticides. J. Agri. Food Chem., **50**, 6383-6388 (2002)
- 14) Brüggemann M., McDonald A. I., Overman L. E., Rosen M. D., Schwink L., Scott J. P., Total synthesis of (±)-didehydrostemofoline (asparagamine A) and (±)-isodidehydrostemofoline. J. Am. Chem. Soc., **125**, 15284-15285 (2003)
- 15) Kumeta Y., Maruyama T., Wakana D., Kamakura H., Goda Y., Method for identifying the botanical origin of shatavari products and its application for survey analysis of products in the Japanese market. Jpn. J. Food Chem. Safety, **18**, 163-167 (2011)
- 16) Fukuda T., Ashizawa H., Suzuki R., Ochiai T., Nakamura T., Kanno A., Kameya T., Yokoyama J., Molecular phylogeny of the genus *Asparagus* (Asparagaceae) inferred from plastid *petB* intron and *petD-rpoA* intergenic spacer sequences. Plant Species Biol., **20**, 121-132 (2005)
- 17) Zhang H. J., Sydara K., Tan G. T., Ma C., Southavong B., Soejarto D. D., Pezzuto J. M., Fong Harry H. S., Bioactive constituents from *Asparagus*

- cochinchinensis*. J. Nat. Prod., **67**, 194-200 (2004)
- 18) Huang X., Kong L., Steroidal saponins from roots of *Asparagus officinalis*. Steroids, **71**, 171-176 (2006)
- 19) Sautour M., Miyamoto T., Lacaille-Dubois M.A., Steroidal saponins from *Asparagus acutifolius*. Phytochemistry, **68**, 2554-2562 (2007)
- 20) Jiwajinda S., Hirai N., Watanabe K., Santisopasri V., Chuengsamarnyart N., Koshimizu K., Ohigashi H., Occurrence of the insecticidal 16,17-didehydro-16(*E*)-stemofoline in *Stemona collinsae*. Phytochemistry, **56**, 693-695 (2001)
- 21) Inoue T., Mimaki Y., Sashida Y., Nikaido T., Ohmoto T., Steroidal saponins from *Dichelostemma multiflorum* tubers and their inhibitory activity on cAMP phosphodiesterase. Phytochemistry, **39**, 1103-1110 (1995)
- 22) Miyakoshi M., Tamura Y., Masuda H., Mizutani K., Tanaka O., Ikeda T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a new antifood-deteriorating agent. J. Nat. Prod., **63**, 332-338 (2000)
- 23) Petricic J., Tarle D., Kupinic M., Tarle D., Structure of macranthogenin, the main aglycon of saponin in subsurface parts of *Helleborus macranthus*. Acta. Pharm. Jugoslavica, **19**, 149-154 (1996)
- 24) Seger C., Mereiter K., Kaltenecker E., Pacher T., Greger H., Hofer O., Two pyrrolo[1,2-a]azepine type alkaloids from *Stemona collinsae* Craib: structure elucidations, relationship to asparagine A, and a new biogenetic concept of their formation. Chem. Biodivers. **1**, 265-279 (2004)
- 25) Sekine T., Fukusawa N., Murakoshi I., Ruangrunsi N., A 9,10-dihydro-phenanthrene from *Asparagus racemosus*. Phytochemistry, **44**, 763-764 (1997)
- 26) Pacher T., Seger C., Engelmeier D., Vajrodaya S., Hofer O., Greger H., Antifungal stilbenoids from *Stemona collinsae*. J. Nat. Prod., **65**, 820-827 (2002)
- 27) Kostecky K., Engelmeier D., Pacher T., Hofer O., Vajrodaya S., Greger H., Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona cf. pierrei*. Phytochemistry, **65**, 99-106 (2004)

Table 1 Details of the commercial shatavari products used in this study

Sample no.	Product form	Composition*
Sha-1	Powder	100% shatavari powder
Sha-2	Powder	100% shatavari powder
Sha-3	Granule	Shatavari 0.56 g with sugar 4.44 g /5g
Sha-4	Granule	Shatavari with sugar and water
Sha-5	Powder	Shatavari powder
Sha-6	Tablet	Shatavari churna 500 mg /tablet
Sha-7	Capsule	Shatavari 400 mg /capsule
Sha-8	Capsule	Root extract 500 mg /capsule
Sha-9	Capsule	Shatavari 250 mg /capsule
Sha-10	Capsule	Root extract 500 mg /capsule
Sha-11	Tablet	Root extract 250 mg, stem and root powder 400 mg /tablet

* Each composition is sourced to the product information.



	Type	R ₁	R ₂	R ₃	Molecular formula	calcd. exact mass [M-H] ⁻
shatavarin VI	I	β-D-Glc	α-L-Rha	H	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	885.4274
shatavarin VII	II	β-D-Glc	α-L-Rha	H	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	883.4699
shatavarin VIII	III	β-D-Glc	α-L-Ara	β-D-Glc	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₂	1033.5255
shatavarin IX	III	β-D-Glc	β-D-Glc	H	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	901.4802
shatavarin X	III	α-L-Rha	β-D-Glc (6-OAc)	H	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	927.4959
shatavarin V	III	α-L-Rha	β-D-Glc	H	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	885.4274
shatavarin IV	III	β-D-Glc	α-L-Rha	H	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	885.4274
asparinin A	III	β-D-Glc	H	H	C ₃₉ H ₆₄ O ₁₃	739.4274
immunoside	III	α-L-Rha	α-L-Rha	H	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₆	869.4904
shatavarin I	IV	β-D-Glc	α-L-Rha	H	C ₅₁ H ₈₆ O ₂₃	1065.5487

(B)

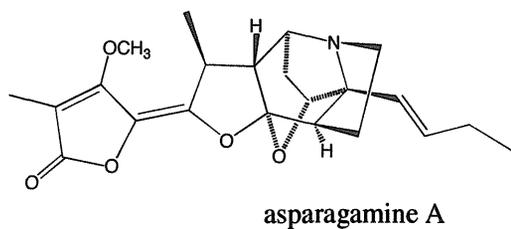
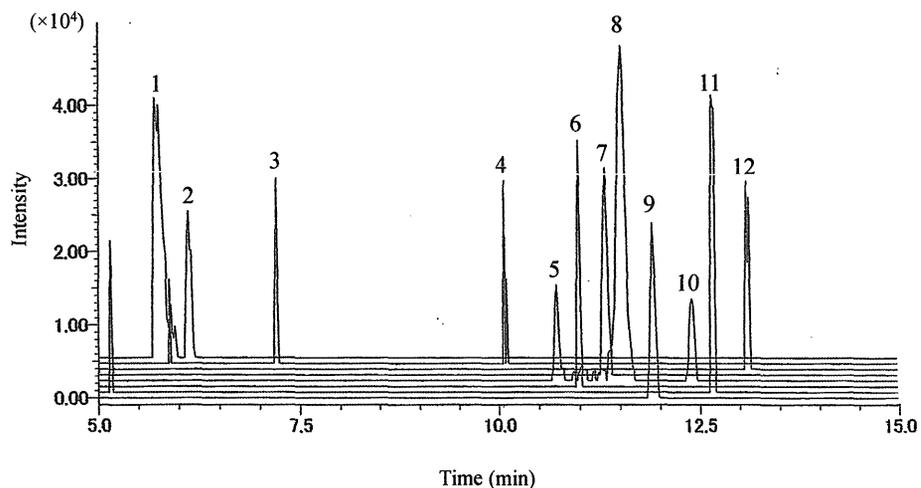


Fig. 1 Chemical structures of steroidal saponins (A) and asparagine A (B) reported previously from the roots of *Asparagus racemosus*



Peak No.	Time	<i>m/z</i>	estimated compound	Peak No.	Time	<i>m/z</i>	estimated compound
1	5.8	1065.5493	Shatavarin I*	7	11.3	901.4819	Shatavarin IX
2	6.1	1065.5498	Shatavarin I*	8	11.5	885.4861	Shatavarin IV
3	7.2	1033.5235	Shatavarin III**	9	11.9	739.4251	asparinin A
4	10.1	1033.5242	Shatavarin III**	10	12.4	885.4851	Shatavarin V
5	10.7	885.4853	Shatavarin VI	11	12.7	869.4889	immunoside
6	11.0	883.4711	Shatavarin VII	12	13.1	927.5040	Shatavarin X

*Both peaks are possible to represent Shatavarin I

**Both peaks are possible to represent Shatavarin III

Fig. 2 MS chromatograms of the methanol extract from Sha-2 product on LC-MS analysis for saponins

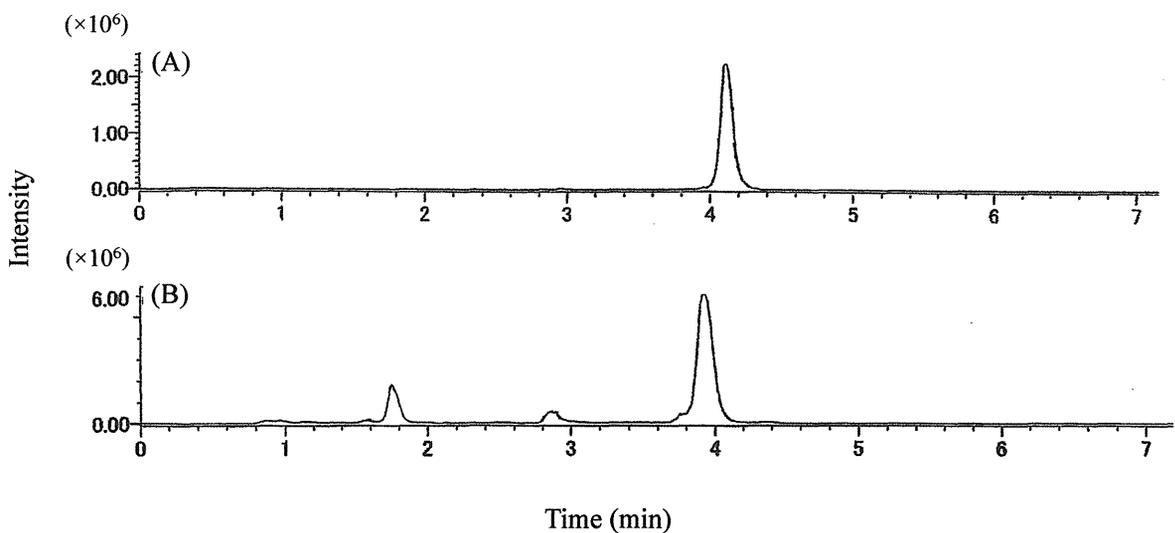


Fig. 3 MS chromatogram of sarsasapogenin (A), the acid-hydrolysate of methanol extract from Sha-2 product (B) on LC-MS analysis ($m/z = 417.30$)

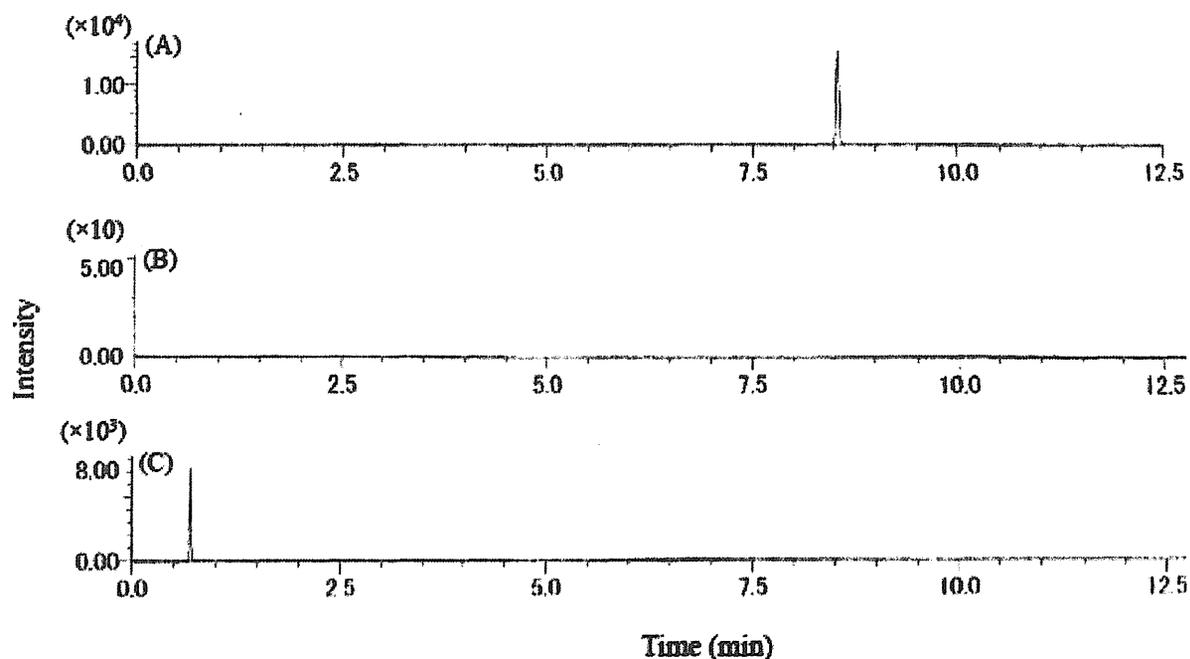


Fig. 4 MS chromatogram of asparagamine A (0.1 ng) (A), the methanol extract from *A. racemosus* plant (B) and from Sha-2 product (C) on LC-MS analysis ($m/z = 386.1-386.2$)

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析に関する研究
研究分担者 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授 大塚英昭
国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

「専ら医薬品」の調査に関する研究

我が国の「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」に例示される成分であるかどうか、依頼のあった新規な植物由来物質 8 品目、化学物質 3 品目の本質について、文献調査等を行った。このうち kawakawa についても、麻薬、向精神薬及び覚醒剤様作用があるもの並びにこれらの原料植物と判断されることから、専ら医薬品とすべき成分本質である物と考察した。また、magnoflorine は、劇薬相当の LD50 値を持つことから、専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した。また、「医薬品の成分本質に関するワーキンググループ」のための資料を作成に協力した。

研究協力者

海老塚豊 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員

若菜大悟 国立医薬品食品衛生研究所流動研究員（日本医学医療交流財団）

A. 研究目的

無承認無許可医薬品とは、医薬品としての承認や許可を受けていないにもかかわらず、医薬品としての目的性を持たせた製品であり、その判断は、医薬品の範囲に関する基準（直近の改正：平成 21 年 2 月 20 日付医薬発第 0220001 号厚生労働省医薬局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」）に基づき行われる。本基準は、主に成分本質（原材料）、効能効果、形状、用法用量の 4 要素に分けられるが、本研究では、特に成分本質（原材料）により無

条件に「専ら医薬品」と判断されるべき成分本質について調査を行うものである。

分担研究者らは、平成 15 年度より、本研究班の前身である「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」において、平成 13 年 3 月 27 日付の「専ら医薬品リスト」に記載された 331 品目について、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性および安全性の評価に関する研究」として、これらの品目について、徹底的な調査・分析を行い、最終的に「A 安全性に十分な配慮が必要であり、専ら医薬品と考えられる、B 国内外を含め医薬品として使用実態があり、専ら医薬品と考えられる、C さらに調査を続ける必要がある、D 現在のところ判断データがない、E 医薬品としての使用実績が乏しく、含有成分等からも食薬区分の見直

し対象となり得ると考えられる」の5段階の評価を行って来た。また、現在食薬区分上分類がなされていない新規成分本質（原材料）について、国内外の医薬品としての使用実態、毒性、麻薬様作用、含有成分の構造等に基づき、食品又は医薬品のどちらに分類すべきものであるか調査を行い、さらに判断の根拠となる各種実験を行ってきた。その結果を基礎に、平成19年4月に医薬品の範囲に関する基準が大改正（平成19年4月17日 医薬発第1115003号）され、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）が321成分（植物由来242、動物由来21、その他58）となった。さらに引き続き「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究において新規に申請のあった成分本質（原材料）や、近年、違法ドラッグ取り締まり等で新たに発見される化合物等について食薬区分の検討を行い、前述した平成21年の通知では、専ら医薬品として使用される成分本質は、320成分（植物由来233、動物由来21、その他66）となった。本研究では、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の他の分担研究と連携しながら、文献調査等を行い、医薬食品局監視指導・麻薬対策課長が招集する「医薬品の成分本質に関するワーキンググループ」のための調査・検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

調査項目は、主に以下の①～⑩である。

- ①名称、他名等、部位等、備考
- ②学名、基原植物和名等、生薬名、英名等
- ③医薬品としての使用実態があるか
- ④毒性データ
- ⑤アルカロイド、毒性タンパク、毒薬劇薬指

定成分等を含むか

- ⑥麻薬、向精神薬及び覚醒剤様作用があるもの（類似化合物も含む）及びその原料植物であるか
- ⑦主要な二次代謝産物等
- ⑧主要な生理活性
- ⑨その他注意すべき点
- ⑩指定医薬品または要指示医薬品に相当する成分を含むか

本調査では、原著論文以外に、主に以下の参考文献を使用している。

- 1：日本薬局方（15局，15局第一追補，15局第二追補，JPフォーラムに収載された16局案）
- 2：日本薬局方外生薬規格
- 3：（新訂）和漢薬，医歯薬出版（赤松金芳）
- 4：中薬大辞典，小学館
- 5：The Complete German Commission E Monographs Therapeutic Guide to Herbal Medicines, The American Botanical Council (Com E)
- 6：Botanical Safety Handbook, American Herbal Products Association
- 7：Dictionary of Plant Toxins, Jeffery B. Harborne FRS, Herbert Baxter, Willey
- 8：WHO Monographs on Selected Medicinal Plants
- 9：ブラジル産 薬用植物事典（橋本悟郎）
- 10：和漢薬百科図鑑（難波恒雄）
- 11：原色牧野和漢薬草大図鑑，北隆館
- 12：（原色）牧野植物大図鑑：北隆館
- 13：日本の野生植物，平凡社
- 14：園芸植物大辞典，小学館
- 15：世界の植物，朝日新聞社
- 16：中国薬典2010