

により精製し **6** および **7** を得た。

<倫理面への配慮>

本研究において、ヒト、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

化合物 **1** は無色非結晶性固体として得られ、比旋光度 $[\alpha]_D +43^\circ$ (c 1.0, MeOH) を示した。DART-TOF-MS より分子式 $C_{20}H_{29}NO_4$ であると推定した。CDCl₃ 中における ¹H, ¹³C NMR および HSQC スペクトルより、2 個のカルボニル炭素、1 個の sp^2 四級炭素、 sp^2 メチレン、 sp^3 四級炭素、メチル、5 個の sp^3 メチンおよび 9 個の sp^3 メチレンの存在が明らかとなった (Table 1)。

¹H-¹H COSY および HSQC スペクトルを解析することにより、3 つの部分構造 **a** (C-1 ~ C-3), **b** (C-5 ~ C-9, C-11, C-13), **c** (C-2' ~ C-5') が確認できた (Figure 3)。

HMBC 相関の解析により、H₂-2 (δ_H 1.60, 1.60) から C-4 (δ_C 149.0) および C-10 (δ_C 34.7), H-5 (δ_H 1.82) から C-3 (δ_C 36.7), H₂-6 (δ_H 1.12, 1.60) から C-10, H-8 (δ_H 4.60) から C-10, H₂-9 (δ_H 1.50, 2.17) から C-5 (δ_C 46.3) および C-1 (δ_C 42.1) への相関が認められ、部分構造 **a** および **b** のつながりが明らかとなった。次に、H₂-1 (δ_H 1.24, 1.55), H-5 および H-9 から C-14 (δ_C 17.7), H₂-15 (δ_H 4.46, 4.79) から C-3 および C-5, H-11 (δ_H 3.30) および H₂-13 (δ_H 3.11, 3.44) から C-12 (δ_C 176.9) への HMBC 相関より eudesmane 骨格の存在が確認された。また、13 位 (δ_H 3.11, 3.44, δ_C 51.3), 2' 位 (δ_H 3.72, δ_C 68.4) および 5' 位 (δ_H

2.74, 3.74, δ_C 55.1) のケミカルシフト値より、これらは窒素原子に結合していることが考えられた。さらに、H₂-13 から C-2', H₂-5' から C-13 および H₂-3' (δ_H 2.24, 2.32) から C-1' (δ_C 173.1) への HMBC 相関より eudesmane 骨格と部分構造 **c** のつながり、すなわちプロリンが結合していることが明らかとなった (Figure 3)。

NOESY スペクトルの解析により相対立体配置を推定した。H-1b/H₃-14, H-9b/H₃-14 および H-1b/H-9b に相関が得られたことより、H₃-14 は β 配置であると推定した。また、H-1a/H-5 および H-9a/H-5 に得られた相関より H-5 は α 配置であると推定した。さらに、H-5/H-7, H-7/H-8, H-7/H-9a に相関が得られたことより、H-7 および H-8 も α 配置であり、H-8/H-13a の相関より、H-11 は β 配置であると推定した (Figure 4)。13 位に結合しているプロリンの 2' 位の立体については NMR では推定できなかったため、既知化合物である isohelenin (**2**) に L-プロリンまたは D-プロリンをそれぞれ反応させ、生成物の各種機器データを **1** と比較検討した。

化合物 **2** をトリエチルアミン存在下、L-プロリンまたは D-プロリンと付加反応させ **6** および **7** を得た (Figure 5)。化合物 **6** および **7** の構造は、各種 NMR スペクトルの解析により確認された。L-プロリンを導入した **6** および D-プロリンを導入した **7** の比旋光度は、それぞれ $[\alpha]_D +37^\circ$ (c 1.0, MeOH) および $[\alpha]_D +84^\circ$ (c 1.0, MeOH) を示した。化合物 **6** の比旋光度は、**1** の比旋光度とほぼ一致した。また、**1**, **6** および **7** を HPLC 分析した結果、それぞれ 13.3 分, 13.3 分, 14.3 分に溶出された (Figure 6)。化合物 **1** および **6** の比旋光度および HPLC 分析による保持時間が

一致したことから、**1** の構造に含まれるプロリンはL-体であると決定した。

化合物 **2** は無色非結晶性固体として得られ、DART-TOF-MS より分子式 $C_{15}H_{20}O_2$ であると推定した。CDCl₃ 中における ¹H, ¹³C NMR および HSQC スペクトルより、1 個のカルボニル炭素、2 個の sp^2 四級炭素、 sp^2 メチレン、1 個の sp^3 四級炭素、メチル、3 個の sp^3 メチンおよび 5 個の sp^3 メチレンの存在が明らかとなった。また、各種二次元 NMR スペクトルを解析することにより、**2** は eudesmane 骨格を有する isohelenin⁹⁾ であると同一した (Figure 7)。

化合物 **3** は無色非結晶性固体として得られ、DART-TOF-MS より分子式 $C_{15}H_{20}O_2$ であると推定した。CDCl₃ 中における ¹H, ¹³C NMR および HSQC スペクトルより、1 個のカルボニル炭素、 sp^2 メチン、 sp^3 四級炭素、 sp^2 メチレン、2 個の sp^2 四級炭素、メチル、3 個の sp^3 メチンおよび 4 個の sp^3 メチレンの存在が明らかとなった。また、各種二次元 NMR スペクトルを解析することにより、**3** は eudesmane 骨格を有する alantolactone⁵⁾ であると同一した (Figure 7)。

化合物 **4** は白色非結晶性個体として得られ、DART-TOF-MS より分子式 $C_{15}H_{20}O_3$ であると推定した。CDCl₃ 中における ¹H, ¹³C NMR および HSQC スペクトルより、1 個のカルボニル炭素、 sp^2 四級炭素、 sp^2 メチレン、2 個の sp^3 四級炭素、メチル、および 4 個の sp^3 メチレン、 sp^3 メチンの存在が明らかとなった。また、各種二次元 NMR スペクトルを解析することにより、

4 は eudesmane 骨格を有する 5 α -epoxyalantolactone⁶⁾ であると同一した (Figure 7)。

化合物 **5** は白色非結晶性固体として得られ、DART-TOF-MS より分子式 $C_{15}H_{18}O_3$ であると推定した。CDCl₃ 中における ¹H, ¹³C NMR および HSQC スペクトルより、2 個のカルボニル炭素、 sp^3 メチン、メチル、3 個の sp^2 四級炭素、1 個の sp^2 メチレン、 sp^3 四級炭素、および 4 個の sp^3 メチレンの存在が明らかとなった。また、各種二次元 NMR スペクトルを解析することにより、**5** は eudesmane 骨格を有する 3-oxodiplophyllin⁷⁾ であると同一した (Figure 7)。

D. 考察

I. helenium の根について成分探索を行った結果、アルカロイド成分として **1** を、セスキテルペンラクトンとして **2-5** を単離した。化合物 **1** は、*I. helenium* の主成分として得られた **2** の 13 位に L-プロリンが結合した構造の新規セスキテルペンアルカロイドで、天然物として初めて単離された。化合物 **1** の構造類似体として、*Saussurea lappa* の根より saussureamine 類が単離されており、抗潰瘍作用が報告されている⁸⁾。一方、*Inula* 属植物に含有されることが報告されているジテルペンアルカロイド類は、本研究では確認出来なかった。今回、*I. helenium* にアルカロイド成分が含有されていたことは、食薬区分の判断のための指標になると考えられる。また、**1** と共に単離したセスキテルペンラクトンのうち、**2** および **3** は抗炎症作用を示すことが報告されている。これに加えて、**2** は転写因

子 NF- κ B の活性化を阻害することが報告されている⁹⁾。さらに、**3** はヒト肝がん細胞 (HepG2、Bel-7402 および SMMC-7721) に対する増殖阻害活性を有し、HepG2 に対してアポトーシスを誘導することが報告されている¹⁰⁾。一方で、**4** はヒト胃腺がん細胞 (MK-1)、子宮頸部類上皮がん細胞 (HeLa) およびマウスメラノーマ細胞 (B16F10) に対する細胞増殖阻害活性が報告されている¹¹⁾。従って、*I. helenium* には、アルカロイドの他、既報の通り、多数のセスキテルペンラクトン類が含まれ、これらは、多種多様な生物活性を示し、その内容も細胞毒性に類するものが多い。これら既報の生物活性に関して、単離された化合物の植物中含量をみると、適正な用法、容量に従い服用する限り、直ちに健康被害を及ぼすものではないと考えられる。しかし、健康食品阻害が原因と思われる健康被害事例の中には、過剰摂取を原因とすると推察される例も少なくない。これらを勘案すると、*I. helenium* の根の食薬区分上の扱いは、引き続き“専ら医薬品”とし、薬事法の規制下で取り扱われるのが妥当と考えられた。

E. 結論

I. helenium の根について成分探索を行い、1種のセスキテルペンアルカロイドと4種のセスキテルペンラクトンを単離した。これらの化合物は、様々な処方せん薬様の生理活性を有することが報告されていることから食薬区分上の扱いは“専ら医薬品”として対応することが適切であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

在間一将, 若菜大悟, 糸田幸恵, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 合田幸広: *Inula helenium* の含有成分から見た安全性の評価に関する研究: 日本薬学会第133年会 (2013年3月28-30日, 横浜)

参考文献

- 1) Talapatra S. K., Chatterjee A. *J. Indian Chem. Soc.*, **36**, 437-447 (1959).
- 2) Edwards O. E., Rodger M. N. *Can. J. Chem.*, **37**, 1187-1190 (1959).
- 3) Lu Y., Li Ying., Jin M., Yang J. H., Li X., Chao G. H., Park H. H., Park Y. N., Son J. K., Lee E., Chang H. W. *J. Ethnopharmacol.*, **143**, 151-157 (2012).
- 4) Lee J., Tae N., Lee J. J., Kim T., Lee J. H. *Eur. J. Pharmacol.*, **636**, 173-180 (2010).
- 5) Klochkov S. G., Afanaseva S. V., Pushin A. N. *Chem. Nat. Comp.*, **42**, 400-406 (2006).
- 6) Cantrell C. L., Abate L., Fronczek F. R., Franzblau S. G., Quijano L., Fischer N. H. *Planta Med.*, **65**, 351-355 (1999).
- 7) Asakawa Y., Toyota M., Takemoto, T., Suire C. *Phytochemistry*, **18**, 1007-1009 (1979).
- 8) Yoshikawa M., Hatakeyama S., Inoue Y., Yamahara J. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 214-216 (1993).
- 9) Bork P. M., Schmitz M. L., Kuhnt M., Escher C., Heinrich M. *FEBS Lett.*, **402**, 85-90 (1997).
- 10) Lei J. C., Yu J. Q., Liu Y. W., Zou G. L. *Food Chem. Toxicol.*, **50**, 3313-3319 (2012).

11) Konishi T., Shimada Y., Nagao T., Okabe H.,
Konoshima T. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**,
1370-1372 (2002).

Table 1. ^1H [δ_{H} (J , Hz)] and ^{13}C NMR data (δ_{C}) of compound A (**1**) in CDCl_3

position	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1a	1.24 (td, 6.6, 13.3)	42.1	C-2, C-3, C-5, C-9, C-10, C-14
1b	1.55 (t, 13.3)		C-2, C-3, C-5, C-9, C-10, C-14
2a	1.60 (m)	22.6	C-1, C-4, C-10
2b	1.60 (m)		C-1, C-4, C-10
3a	2.00 (td, 5.4, 13.3)	36.7	C-1, C-2, C-4, C-5, C-15
3b	2.32 (t, 13.3)		C-1, C-2, C-4, C-5, C-15
4		149.0	
5	1.82 (d, 12.7)	46.3	C-14, C-6, C-10, C-3, C-7, C-9, C-1, C-15, C-4
6a	1.12 (q, 12.7)	21.4	C-4, C-5, C-7, C-10
6b	1.60 (m)		C-4, C-5, C-7, C-8, C-10
7	2.67 (brs)	39.2	C-8
8	4.60 (brs)	78.4	C-6, C-10
9a	1.50 (dd, 3.6, 15.6)	41.1	C-1, C-5, C-10, C-14
9b	2.17 (d, 15.6)		C-1, C-4, C-5, C-7, C-8, C-10, C-14
10		34.7	
11	3.30 (brd, 5.4)	45.2	C-6, C-7, C-12
12		176.9	
13a	3.11 (dd, 5.4, 12.3)	51.3	C-7, C-11, C-12, C-2', C-5'
13b	3.44 (dd, 5.4, 12.3)		C-7, C-11, C-12, C-2', C-5'
14	0.78 (s)	17.7	C-1, C-5, C-9, C-10
15a	4.69 (s)	106.6	C-3, C-4, C-5
15b	4.79 (s)		C-3, C-4, C-5
1'		173.1	
2'	3.72 (brs)	68.4	C-4'
3'a	2.24 (brs)	29.7	C-5'
3'b	2.32 (brs)		C-1', C-2', C-4',
4'a	1.98 (m)	24.1	C-2', C-5', C-3'
4'b	1.98 (m)		C-2', C-5', C-3'
5'a	2.74 (q, 8.8)	55.1	C-13, C-3', C-4'
5'b	3.74 (brs)		C-2', C-3'

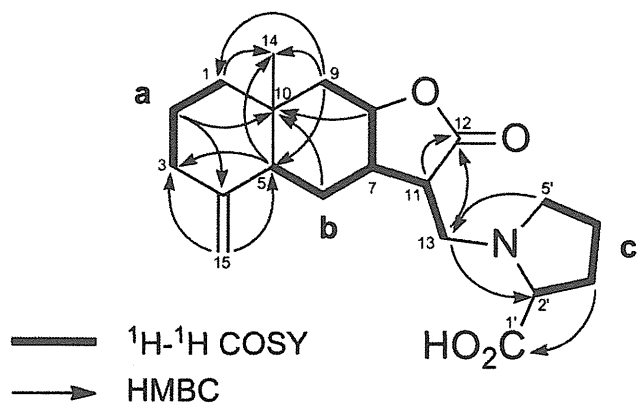


Figure 3. Selected 2D NMR correlations for compound A (1)

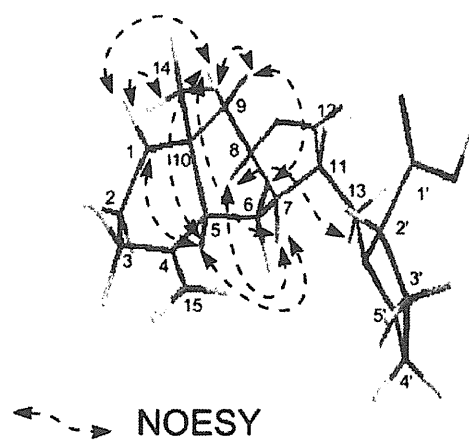


Figure 4. Selected NOESY correlations for compound A (1)

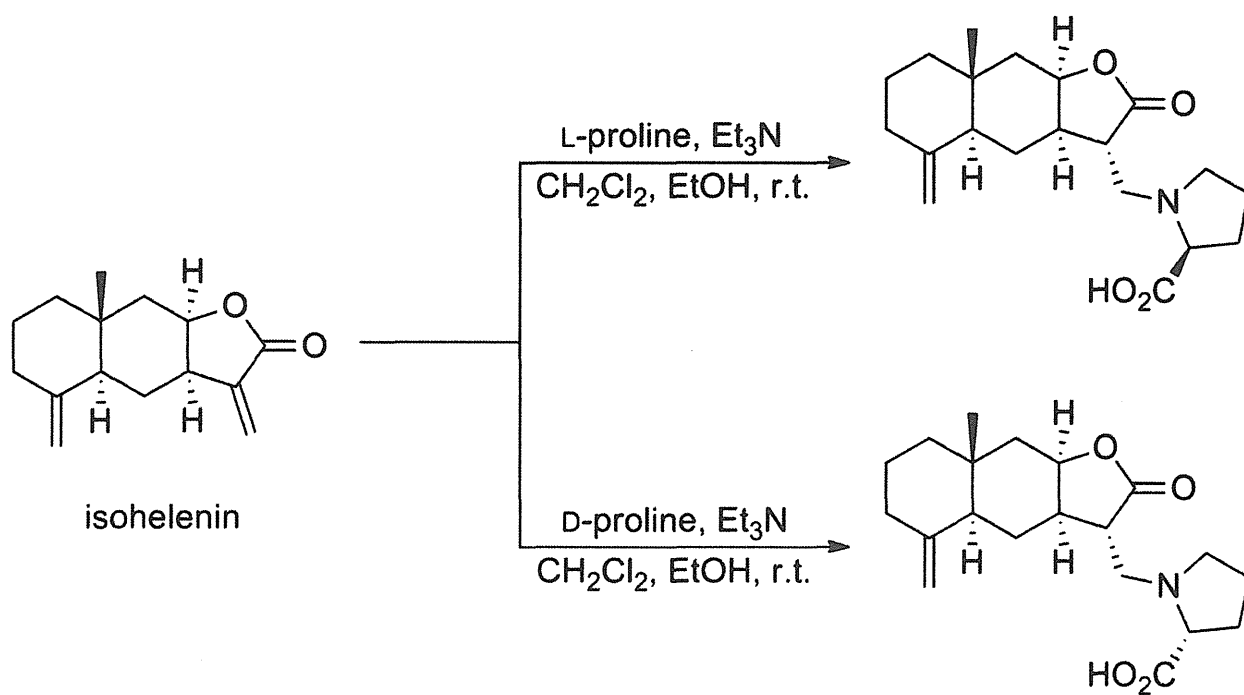


Figure 5. Syntheses of 6 and 7

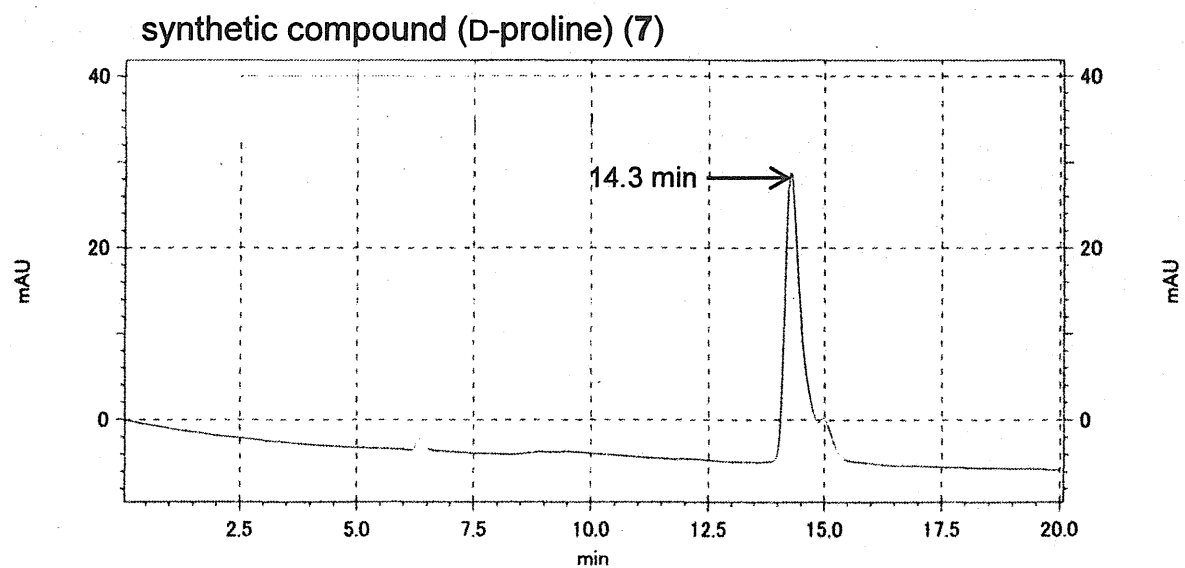
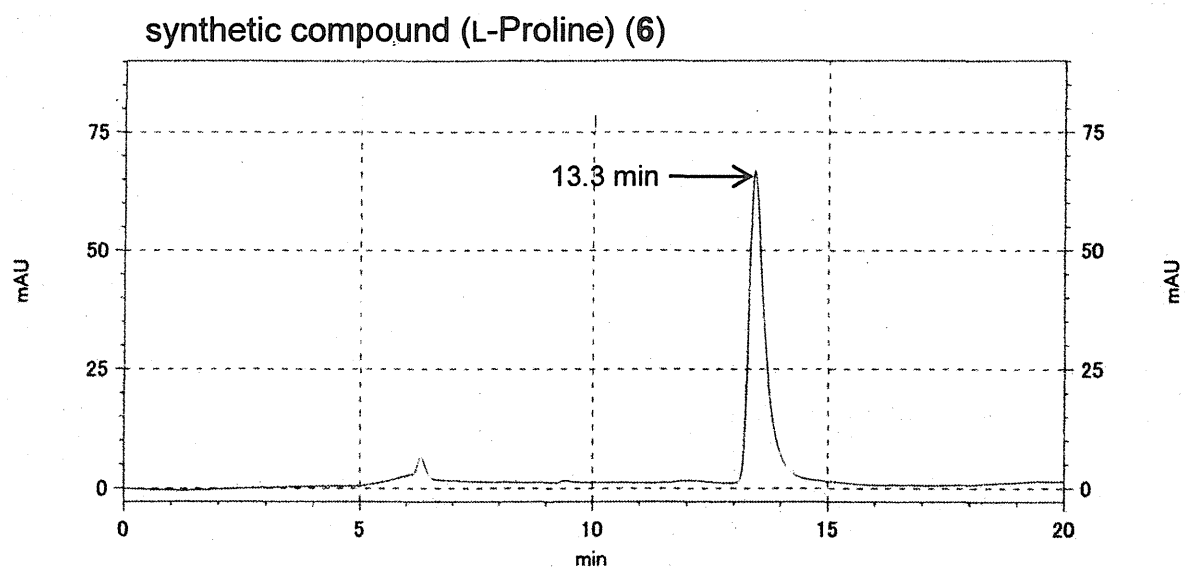
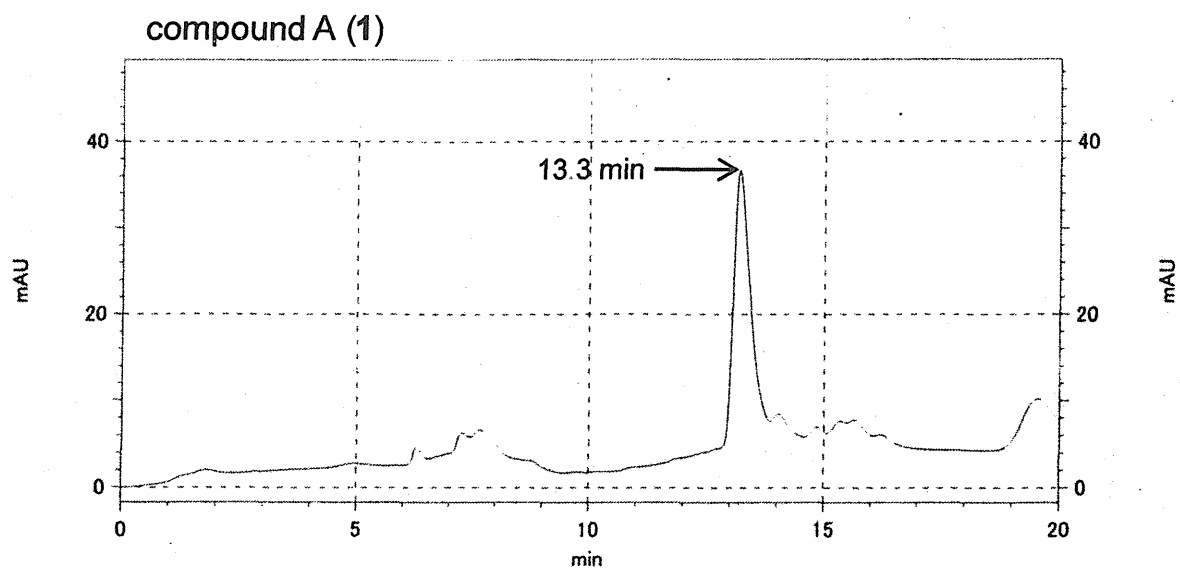


Figure 6. Comparison of retention time for compound A (1) with synthetic compounds (6 and 7)

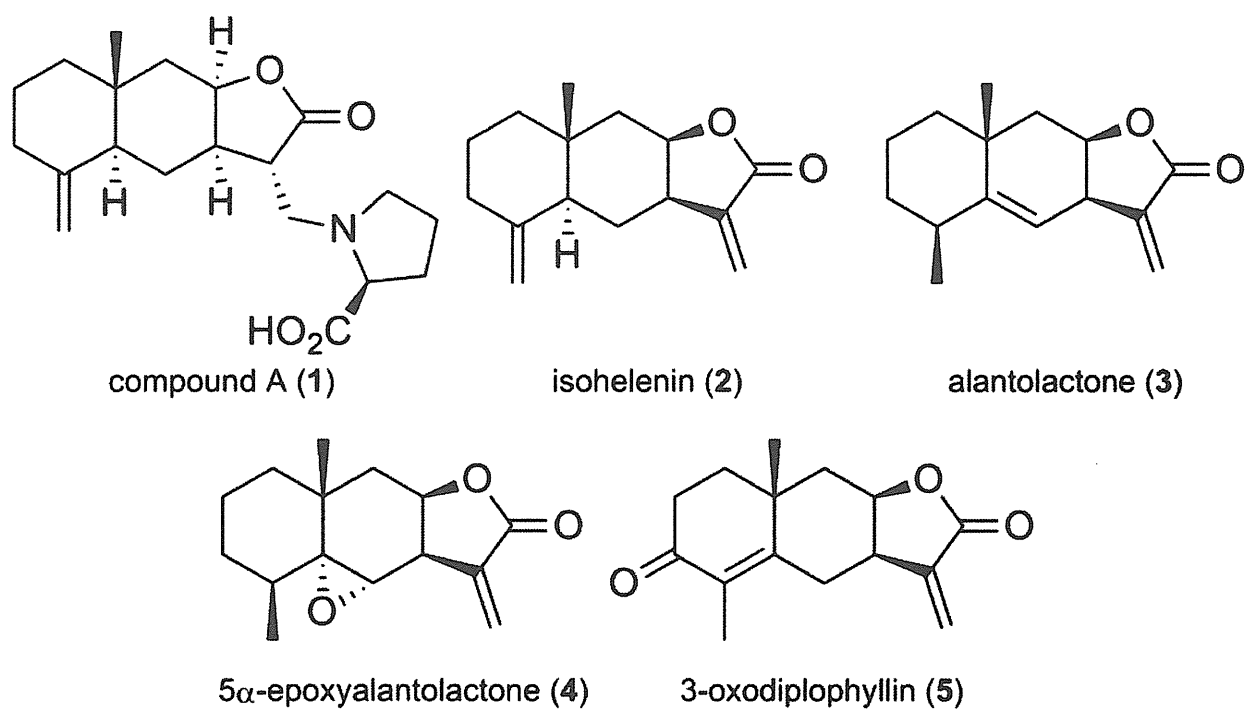


Figure 7. A new sesquiterpene alkaloid and known sesquiterpene lactones from *I. helenium*

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・分析・有害性予測と監視に関する研究

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

東南アジア市場に流通するシャタバリの基原植物種について

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部研究員 桑田幸恵

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* からは、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、昨年度の我々の研究により、 *A. racemosus* から asparagamine A は検出されないことが確認されたことから、先の報告は、 asparagamine A のような pyrrolo[1,2-a] azepine アルカロイドを含有する *Stemona* 属植物を *A. racemosus* と誤同定したことによる可能性が指摘された。本年度は、インド及びバングラデシュの市場でシャタバリとして販売されていた試料を入手し、昨年度我々が確立した遺伝子解析法（ARMS-PCR）及びステロイドサポニン成分分析により、基原植物種の確認を行った。その結果、インドの試料は *Asparagus* 属であったが、バングラデシュの試料は *Stemona* 属であることが判明し、 *Stemona* 属が *Asparagus* 属と混同されている実態が明らかとなった。また、インドの試料は、 *Asparagus* 属と確認されたものの、 *A. racemosus* とは異なるステロイドサポニン成分パターンを示したため、 *A. racemosus* ではない可能性も示唆された。以上の結果から、東南アジア市場でシャタバリとして流通している製品は、特に基原の確認が重要であることが再認識された。

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

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. 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、

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ことから¹²⁾、 *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

前より指摘されてきた¹²⁻¹⁴⁾。

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、昨年度、我々は遺伝子情報及び成分分析により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を行い、シャタバリからは Asparagamine A は検出されないことを示した。このことから、*Asparagus* 属と同様に塊根状の根を有する *Stemona* 属植物は、シャタバリと誤同定されやすく、*Stemona* 属植物がシャタバリとして市場に流通していることが考えられた。本年度は、インド及びバングラデシュの市場でシャタバリとして実際に販売されていた試料を入手し、昨年度確立した遺伝子解析法 (ARMS-PCR)¹⁵⁾ 及びステロイドサポニン成分分析により、基原植物の確認を行った。

B. 研究方法

実験材料

インド及びバングラデシュの市場から入手したシャタバリ試料 (それぞれ KKB0306 及び KKB0307) は、千葉大学石橋博士より提供を受けた。このうち、KKB0307 は、薄層クロマトグラフィーにおいてドラーゲンドルフ陽性のスポットがあることが確認されている。

ARMS (amplification refractory mutation system)-PCR

シャタバリ試料からの DNA 抽出は、皮を取り

除き粉碎した後、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて行った。

Asparagus 属、*Stemona* 属特異的検出 PCR (ARMS-PCR) は、昨年度の報告と同様に行った。

ステロイドサポニン分析

500 mg の試料を秤取し、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。

LC-MS 分析は、装置に LCMS-2020 (Shimadzu) を、カラムに XBridge C18 (2.1 x 100 mm, 3.5 μm; Waters) を用いて行った。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 μL、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 1100 V、乾燥ガス 10 L/min, 250°C (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。

C. 研究結果及び考察

シャタバリ試料の ARMS-PCR 分析

シャタバリの基原種鑑別のために昨年度確立した *Asparagus* 属と *Stemona* 属を特異的に検出する PCR 法を、インド及びバングラデシュの市場から入手したシャタバリ試料に適用した。PCR の結果、インドの試料 (KKB0306) からは *Asparagus* 属特異的検出 PCR によって増幅産物が得られ、バングラデシュの試料 (KKB0307)

からは *Stemona* 属特異的検出 PCR によって増幅産物が得られた (Fig. 1). この結果から, KKB0306 は *Asparagus* 属であるが, KKB0307 は *Stemona* 属であることが明らかとなった. *Stemona* 属植物にはアルカロイドが含まれることが知られていることから, KKB0307 が *Stemona* 属であるという結果は, KKB0307 がドラージェンドルフ陽性の成分を含有することとも合致する.

シャタバリ試料のステロイドサポニン分析

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 (Fig. 2) が報告されており, その中の 2 種 (Shatavarin VI, VII) は, *Asparagus* 属植物のうち *A. racemosus* からのみ単離報告があるサポニンである⁷⁾. PCR により *Asparagus* 属であることが明らかとなった KKB0306 が *A. racemosus* であるかどうかを確認するため, ステロイドサポニン成分の LC-MS 分析を行った.

KKB0307 のメタノールエキスについて, ネガティブモードで LC-MS を行い, 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) の TIC を確認したところ, 当研究室で保管しているシャタバリ試料と異なる TIC を示した (Fig. 3). *A. racemosus* 特異的なサポニンに相当するピーク (Fig. 3, peak No. 5, 6) がみられなかったことから, KKB0307 が *A. racemosus* とは断定できず, *Asparagus* 属の他の種である可能性も示唆された.

D. 結論

インド及びバングラデシュの市場から入手したシャタバリ試料 (それぞれ KKB0306 および KKB0307) の基原植物を確認したところ, 遺伝子解析により KKB0306 は *Asparagus* 属, KKB0307 は *Stemona* 属植物であることが明らかとなり, 東南アジアの市場では, シャタバリとして販売されているものの中に *Stemona* 属由来のものがある現状が確認された. また, KKB0306 については, *Asparagus* 属であることは確認されたものの, LC-MS によるサポニン分析において, *A. racemosus* 特異的なサポニンが検出されなかったことから, *A. racemosus* ではなく, 他の種である可能性も示唆された. *Asparagus* 属と *Stemona* 属の根は互いに似ていることから, 今後も *Stemona* 属あるいは *Asparagus* 属の中でも *A. racemosus* とは異なる種のもものがシャタバリとして流通する恐れがあり, 注意が必要である.

E. 健康危険情報

直接的な健康危機情報は無い.

F. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) Kumeta Y., Maruyama T., Wakana D., Kamakura H., Goda Y., Chemical analysis reveals the botanical origin of shatavari products and confirms the absence of alkaloid asparagamine A in *Asparagus racemosus*. J. Nat. Med., **67**, 168-173 (2013).
- 2) Goda, Y., Quality assurance of natural products, Miscellaneous thoughts from the fact that Shatavari does not contain

alkaloid asparagamines. *Foods & Food Ingradients Journal of Japan*, **217**, 380-381 (2012).

2. 学会発表

- 1) 大崎愛弓, 小宮山哲平, 小沢正晃, Samir K SADHU, Ahmed FIROJ, 桑田幸恵, 袴塚高志, 合田幸広, 影近弘之, 石橋正己, シャタバリの成分と同定に関する検討, 日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月, 横浜)

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., Ruangrunsi 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., Ruangrunsi N., Murakoshi I., Structure and relative stereochemistry of a new

- polycyclic alkaloid, asparagine 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 (asparagine 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)

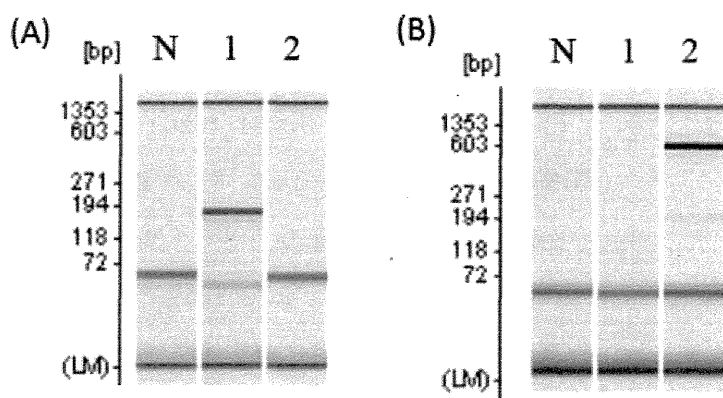
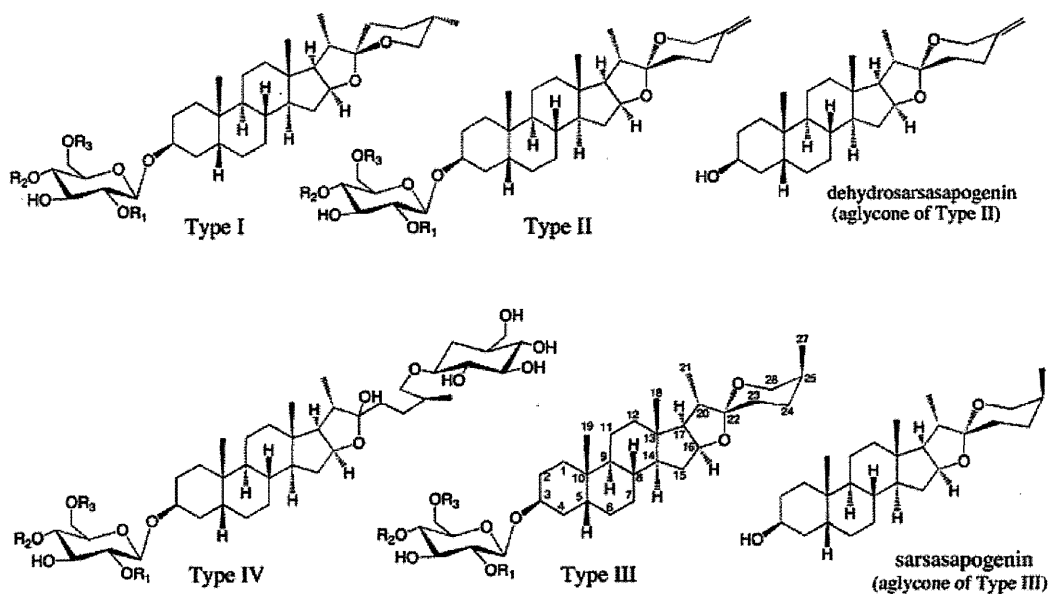
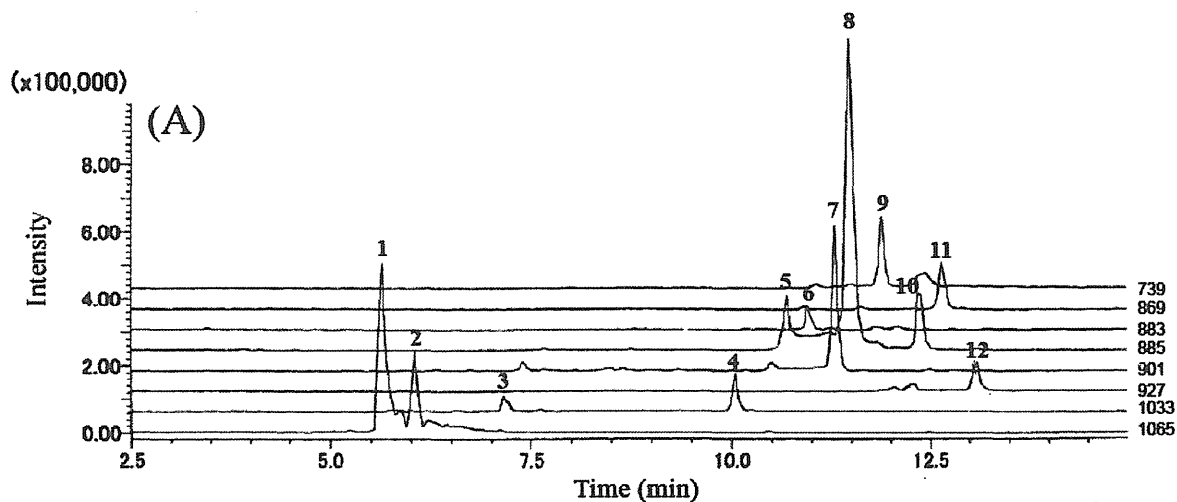


Fig. 1 ARMS-PCR amplification by (A) *Asparagus*-specific and (B) *Stemona*-specific primers N, negative control; 1, KKB0306 (India); 2, KKB0307 (Bangladesh)



	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	885.4853
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	885.4853
shatavarin IV	III	β-D-Glc	α-L-Rha	H	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	885.4853
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

Fig. 2 Chemical structures of steroidal saponins reported previously from the roots of *Asparagus racemosus*



Peak No.	<i>m/z</i>	estimated compound	Peak No.	<i>m/z</i>	estimated compound
1	1065	Shatavarin I*	7	901	Shatavarin IX
2	1065	Shatavarin I*	8	885	Shatavarin IV
3	1033	Shatavarin III**	9	739	asparinin A
4	1033	Shatavarin III**	10	885	Shatavarin V
5	885	Shatavarin VI	11	869	immunoside
6	883	Shatavarin VII	12	927	Shatavarin X

*Both peaks are possible to represent Shatavarin I

**Both peaks are possible to represent Shatavarin III

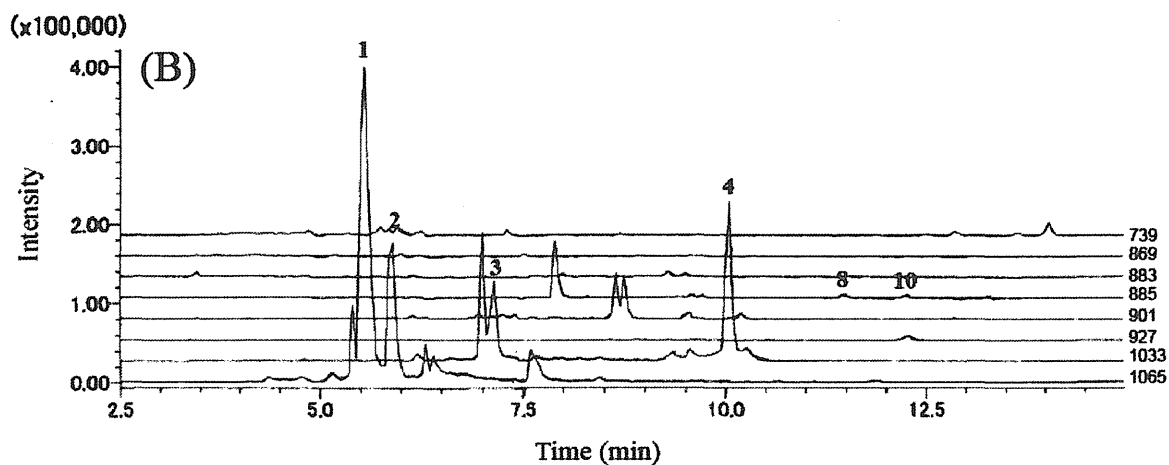


Fig 3 MS chromatograms of the methanol extracts of (A) shatavari sample deposited at our laboratory and (B) KKB0306 (India)

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・分析・有害性予測と監視に関する研究

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

遺伝子情報に基づく *Sida* 属植物の基原種解析について

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 *Sida* 属植物の有害性評価及び規制の範囲の検討に資する知見を得ることを目的に、世界各地の植物園より種子交換により導入した *Sida* 属植物、12 検体について、遺伝子情報の整備を行った。その結果、2 つの試料において、導入元からの情報と異なっていることが明らかになった。これらの試料は、一方は、*S. rhombifolia* と推定されたが、他方は、特定が出来なかった。また、*S. hermaphrodita* は、他の *Sida* 属植物とは、明らかに異なった塩基配列を示し、同種を *Sida* 属として分類することに疑問がもたれた。本研究結果から、世界の植物園においても、*Sida* 属植物の同定は、混乱していることが明らかになったため、同植物の食薬区分の検討に際しては、引き続き、試料を収集し、遺伝子情報と形態観察による基原種の整理が必要である。

協力研究者

若菜大悟 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
流動研究員

鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
主任研究官

杉村康司 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究
センター 種子島研究部研究員

飯田 修 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究
センター 種子島研究部研究リーダー

山路誠一 日本薬科大学 准教授

あると考えられる^{4),5)}。アユルヴェーダにおいて “Bala” と呼称される生薬は、この植物の根であるとされるが、インドの生薬市場では、他に、*S. acuta*, *S. cordata*, *S. rhombifolia* などの同属植物も “Bala” として使用されている⁵⁾。

我が国にも、種子島以南の亜熱帯地域を中心に、*S. rhombifolia* (和名：キンゴジカ)、*S. spinosa* (和名：アメリカキンゴジカ) 及び *S. rhombifolia* subsp. *insularis* (和名：ハイキンゴジカ) の 3 種が野生あるいは帰化し、最近では、関東以西まで分布を広げている⁶⁾。

A. 研究目的

Sida 属は、熱帯-温帯地域を中心に、世界に 100 種以上が分布するアオイ科最大の属である¹⁻³⁾。*Sida* 属植物の中には、アユルヴェーダやユナニーなどの伝統医学において、リウマチや淋病治療、解熱鎮痛、利尿、消炎など、様々な目的で使用される *S. cordifolia* などのように、強い薬理作用を有するものもあり、その主要成分は、ephedrine を初めとする多種のアルカロイドで

Sida 属植物の食薬区分上の取り扱い、*Sida cordifolia* 及び *S. mysorensis* の根及び葉が、「オウカシ」として、*S. rhombifolia* の全草が、「オウカボ」として、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リストに記載されている。しかし、上述の通り、*Sida* 属植物は、非常に多くの種が存在し、その中には、*S. cordifolia* と同様に生薬として使用あるいは誤用されるものもある。さらに、これら同属植物にも比較的高濃

度のエフェドリン、インドール及びキナゾリンアルカロイドが含まれることが報告されている^{5,7)}。

従って、既に専ら医薬品に指定されている3種以外の *Sida* 属植物を使用した瘦身目的等の健康食品が流通した場合、重篤な健康被害が危惧される。また、ephedrine は覚醒剤原料であることから、乱用目的での *Sida* 属植物の使用も懸念される。そこで我々は、*Sida* 属植物の食薬区分の範囲に関する研究として、海外及びインターネット市場で、*Sida* 属植物として流通している製品を購入し、形態観察及び塩基配列解析による基原植物調査を行った結果、*Sida* 属植物として流通している製品には、*Sida* 属以外の植物が多数誤用されているものがある他、*Sida* 属植物であっても、種小名まで同定出来ないものも多数認められた⁸⁾。

このため、*Sida* 属植物の食薬区分の範囲について検討するには、まず、*Sida* 属植物の形態学的特徴や遺伝子情報を整備し、基原植物を明確にする必要がある。本研究では、種子交換によって世界各地の植物園より導入した *Sida* 属植物について、遺伝子情報の整備を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された *Sida* 属植物を Table 1 に示した。これらの試料は、全て医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部が種子交換により導入し、系統保存しているものである。

2. 実験方法

各試料を、MM-300 (Qiagen) により粉砕し、試料の粉末、約 10 mg を TE buffer 200 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit (Promega) に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument (Promega) により、genomic DNA を抽出、精製した。このもの

を鋳型とし、植物の rDNA に保存性の高い配列に設計したプライマーを用いて、PCR を行うことにより、目的の ITS 領域を含む DNA 断片を得た。PCR は、酵素に BIOTAQ DNA polymerase (Bioline)-Ampdirect plus (Shimadzu) 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. 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。シーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) により行い、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。塩基配列の多重整列解析は、Clustal W を用いて行い、分子系統樹は、Kimura' s two parameter による距離行列を基に、NJ 法により作成した。

C. 研究結果及び考察

各試料より genomic DNA を調製し、核 rDNA の ITS 領域を含む DNA 断片を PCR により増幅し、塩基配列解析を行った。得られた塩基配列を Blast Search Program により相同性検索した結果を Table 2 に示した。また、我々のこれまでの調査で、整備した *Sida* 属植物由来の遺伝子型とともに作成した分子系統樹を Fig. 1 に、核配列の多重整列解析を Fig. 2 に示した。

U53 は、*S. rhombifolia* として導入されたものの、葉の形態から *S. cordifolia* と推定されていた試料であったが、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) 上のどちらの配列とも相同性を示さなかった。

一方、*S. rhombifolia* として導入された U87, V27, V67, V74 及び *S. cordifolia* として導入されたが、葉の形態から *S. rhombifolia* と推定された V26 は、いずれも同一の配列を示し、先に我々が報告した *Sida* spp-4 の配列と一致した。

この配列は、データベース上の *S. rhombifolia* と完全に一致はしないものの、高い相同性を示し、系統樹解析においても、同一のクラスターに分類された。複数の機関より *S. rhombifolia* として導入された試料が全て同じ配列を示しており、データベース上の *S. rhombifolia* の配列とは、種内変異の範囲内であると推定された。

U106, V65, V66, V215, W16 は、いずれも *S. hermaphrodita* として導入され、遺伝子解析の結果からも同種と 96% の相同性を示した。しかしながら、その他の *Sida* 属植物とは、相同性が高くなく、*Plagianthus* 属の配列と相同性を示した。分子系統解析の結果においても、アウトグループとして用いた *Abutilon andrewsianum* の配列よりもさらに外側に分類され、Tate らの報告³⁾ と一致する結果であった。

D. 結論

Sida 属植物の食薬区分の範囲に関する検討のため、世界各地の植物園より種子交換により導入した *Sida* 属植物について、遺伝子情報の整備を行った。その結果、世界各地の植物園においても、同植物の同定には、混乱が見られることが明らかになった。従って、同植物の食薬区分の検討に際しては、引き続き、試料収集と形態観察、遺伝子情報による基原植物の整理が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Wakana D., Maruyama T., Kamakura H., Sugimura K., Iida O., Kanai T., Yamaji S., Kimura T., Goda Y., Morphological features and botanical origin of the plant products sold as *Sida* spp. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **19**, 111-118 (2012).

2. 学会発表

1) 米本愛, 玉川恵香, 山路誠一, 伏谷眞二, 若菜

大悟, 丸山卓郎, 鎌倉浩之, 合田幸広, 杉村康司, 飯田修, *Sida* 属植物の組織形態学的研究 (3), 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜

2) 玉川恵香, 米本愛, 山路誠一, 伏谷眞二, 若菜大悟, 丸山卓郎, 鎌倉浩之, 合田幸広, 杉村康司, 飯田修, *Sida* 属植物の組織形態学的研究 (4), 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜

参考文献

- 1) Mabberley D. J., Mabberley's plant-book: A portable dictionary of plants, their classification and uses, 3rd ed., Cambridge University Press, New York, USA, 2008, p. 795 (ISBN: 978-0-521-82071-4).
- 2) Clark J. L., Zimmer E. A., *Syst. Bot.*, **28**, 365-375 (2003).
- 3) Tate J. A., Aguilar J. F., Wagstaff S. J. *et al.*, *Am. J. Bot.*, **92**, 584-602 (2005).
- 4) Kapoor L. D., Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants, CRC press, Florida, USA, 1990, p. 303 (ISBN: 0-8493-0559-4).
- 5) Khatoon S., Srivastava M., Rawat A. K. S. *et al.*, *J. Planar Chromatogr.*, **18**, 364-367 (2005).
- 6) The Flora-Kanagawa association ed., Flora of Kanagawa 2001, the Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, Odawara, Japan, 2001, pp995-996.
- 7) Prakash A., Varma R. K., Ghosal S., *Planta Med.*, **43**, 384-388 (1981).
- 8) Wakana D., Maruyama T., Kamakura H., Sugimura K., Iida O., Kanai T., Yamaji S., Kimura T., Goda Y., *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **19**, 111-118 (2012).

Table 1 Details of *Sida* plants used in this study

Sample no.	Species	Source
U53	<i>Sida rhombifolia</i> L.*	Botanischer Garten des Institutes für Botanik der Karl-Franzens-Universität Graz, AUSTRIA
U106	<i>Sida hermaphrodita</i> Rusby	Hortus Botanicus Nationalis Academiae Scientiarum Ucrainae, UKRAINE
V65	<i>Sida hermaphrodita</i> Rusby	Botanischer Garten des Institutes für Botanik der Karl-Franzens-Universität Graz
V66	<i>Sida hermaphrodita</i> Rusby	Jardin Botanique Faculté de Pharmacie VILLE DE CLERMONT-FERRAND
V215	<i>Sida hermaphrodita</i> Rusby	Jardin Botanique, FRANCE
V216	<i>Sida hermaphrodita</i> Rusby	Jardin Botanique de la Ville et de l' Université, FRANCE
W16	<i>Sida hermaphrodita</i> Rusby	Hortus Botanicus Kausensis Vytautas Magnus University, LITHUANIA
U87	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Botanical Garden Delft University of Technology, NETHERLANDS
V26	<i>Sida cordifolia</i> L.*	Botanischer Garten der Universität, GERMANY
V27	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Botanischer Garten der Universität, GERMANY
V67	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants
V74	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Universität Potsdam Botanischer Garten, GERMANY

*: U53, V26 は、葉の形態からは、それぞれ、*S. cordifolia*, *S. rhombifolia* と推定。

Table 2 The results of Blast search for *Sida* plants used in this study

Sample no.	ITS1	ITS2
U53	<i>Sida poeppigiana</i> (98)	<i>Sida poeppigiana</i> (98)
	<i>Sida fallax</i> (98)	<i>Sida fallax</i> (99), partial
	<i>Sida acuta</i> (95)	<i>Sida rhombifolia</i> (91)
U106, V65, V66, V215, W16	<i>Sida hermaphrodita</i> (96)	<i>Plagianthus regius</i> x <i>Plagianthus divaricatus</i> (97)
	<i>Plagianthus divaricatus</i> (95)	<i>Plagianthus regius</i> x <i>Plagianthus divaricatus</i> (97)
	<i>Plagianthus divaricatus</i> (95)	<i>Plagianthus regius</i> subsp. <i>Chathamicus</i> (97)
U87, V26, V27, V67, V74	<i>Sida fallax</i> (97)	<i>Sida fallax</i> (99), partial
	<i>Sida poeppigiana</i> (96)	<i>Sida poeppigiana</i> (97)
	<i>Sida rhombifolia</i> (97)	<i>Sida rhombifolia</i> (93)

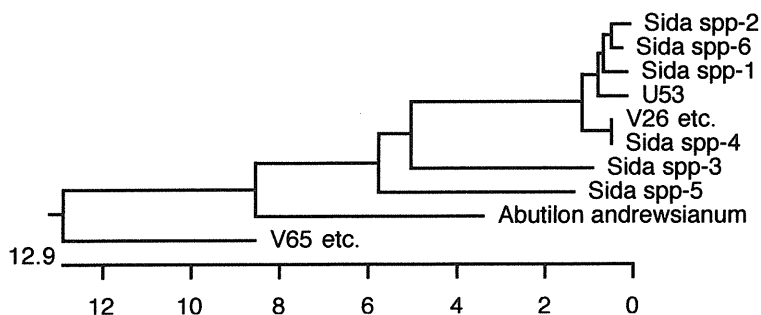


Fig. 1 NJ tree constructed from the ITS sequences of several *Sida* plants