

Fig. 5 Mass chromatograms of food supplements for tonicity spiked with authentic propoxyphenyl sildenafil (1) and hydroxythiovardenafil (2)

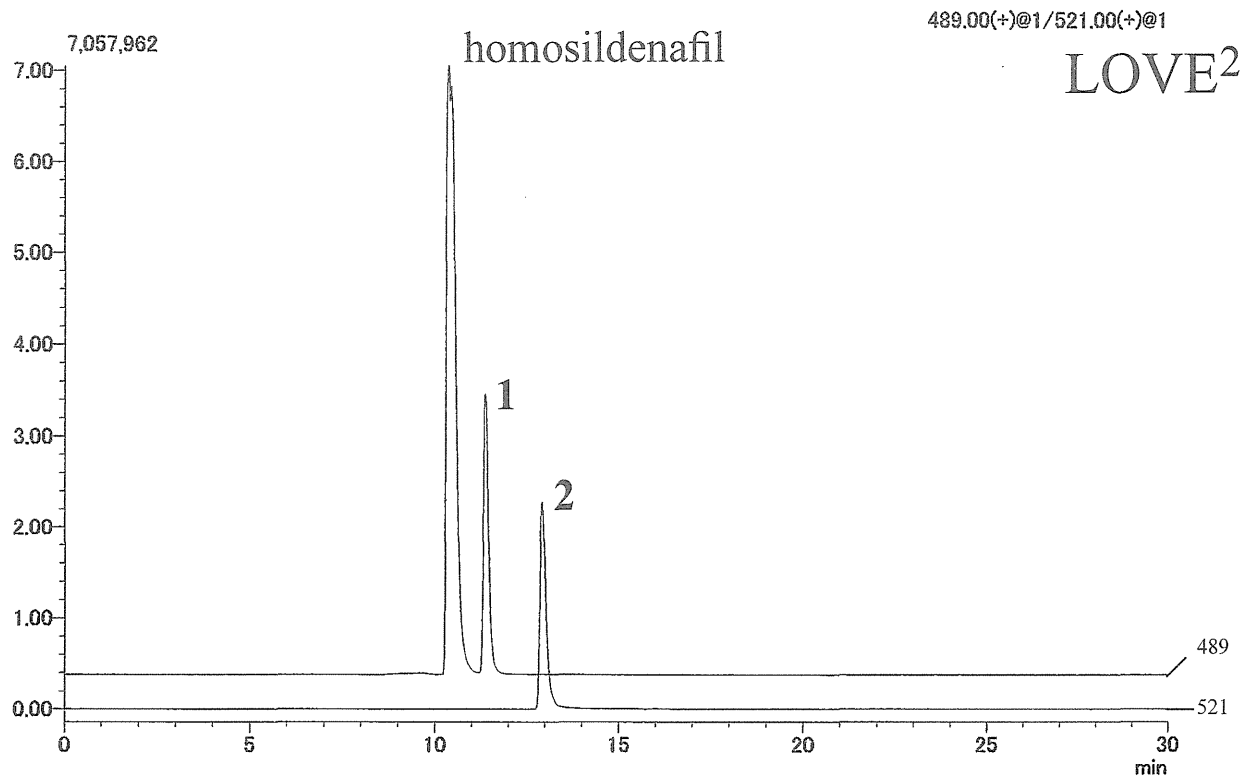


Fig. 5 Continued

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 健康食品と称して販売される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室長 丸山卓郎

オオイタドリ中の anthraquinone 類および resveratrol の定量
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 在間一将

研究要旨 オオイタドリは、我が国で健康食品として流通し、anthraquinone (AQ) 類や resveratrol (RV) を含有することが知られている。健康食品は、原材料の濃縮物の流通の可能性があるため、オオイタドリにおいても健康被害の発生が危惧される。そこで、LC/MS を用いたオオイタドリの AQ 類および RV の迅速定量分析法を開発し、*Polygonum* 属植物由来の生薬 3 種 (コジョウコン, カシュウ, ケンジン), 健康食品 7 製品および各地で採集したオオイタドリおよびイタドリについて定量を行った。その結果、コジョウコンおよびカシュウからは、RV, emodin-8-*O*- β -D-glucoside (EMG), emodin (EM), rhein (RH), physcion (PH) が検出され、ケンジンでは今回の分析対象とした化合物は検出されなかった。一方、オオイタドリからは RV, EMG, EM, RH, PH が検出され、使用部位によらず EM が最も多く含有されていた。イタドリでは、RV, EM, RH, PH が検出されたが、オオイタドリの方が AQ 類の含量が高い傾向が認められた。また、採集地域の比較により、本州産より北海道産の方が AQ 類および RV を多く含有することが明らかとなった。オオイタドリ含有健康食品の定量では、検出された成分のうち EM のみ、すべての健康食品から検出され、RV, EMG, RH は一部の健康食品では検出されなかった。

A. 研究目的

イタドリ *Polygonum cuspidatum* は、マウスの寿命延長作用¹⁾やヒトの抗動脈硬化作用²⁾を有するとされる resveratrol (RV) を含有することから、イタドリを素材としたサプリメント類が米国等で販売されている。

しかし、イタドリは劇薬相当の毒性を有する emodin (EM) を含有することから、我が国にお

いては、食経験を有する若芽のみを非医とし、その他の地上部および地下部は専ら医薬品に分類し、薬事法の下で規制されている。

今般、同属のオオイタドリ *P. sachalinense* についても、RV を含有することから、健康食品としての流通があり (Figure 1), 食薬区分上の取扱いについて、監視指導・麻薬対策課に照会があったところである。オオイタドリについて

も、イタドリと同様の成分組成を有すると考えられるが、若芽の anthraquinone (AQ) 類を調べた報告に乏しい。また、イタドリの食薬区分上の取扱いを定めた当時は、錠剤、カプセル剤の形状を有するものは、医薬品と判断されていたが、現在は、食品の形態として認められているため、濃縮物を錠剤やカプセル剤としたものが流通している。濃縮物の場合、原料植物素材中の毒性物質の含量が微量であったとしても、過剰に摂取する可能性があり、健康被害の発生が危惧される。特に、オオイタドリは比較的多量のシュウ酸化物を含むことが知られているが、10%を超えるシュウ酸化物の含有は劇物相当であり、濃縮物では、この点についても注意が必要である。

以上のことから、オオイタドリ若芽の AQ 類およびシュウ酸化物含量について調べる必要があるが、既報の *Polygonum* 属植物の AQ 類の分析法は、HPLC を用いており分析時間が長く、また、各ピークの特異性にもやや疑問がある³⁾⁻⁵⁾。そこで本研究では、LC/MS を用いたオオイタドリの AQ 類および RV (Figure 2) の迅速定量分析法を作成し、*Polygonum* 属植物由来の生薬 3 種 (コジョウコン、カシュウ、ケンジン)、健康食品 7 製品および各地で採集したオオイタドリおよびイタドリに適用した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に用いた標準品の RV, Aloe-emodin (AE), および Danthron (DA) は東京化成工業株式会社より購入した。Emodin-8-*O*- β -D-glucoside (EMG) および Aloe-emodin-8-*O*- β -D-glucoside

(AEG) は Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. より購入した。EM, Physcion (PH), および Chrysophanol (CH) は Abcam 社より購入した。Rhein (RH) および内標準物質として用いた Ethyl *p*-hydroxybenzoate は和光純薬工業株式会社より購入した。その他の試薬は、1 級、特級、あるいは液体クロマトグラフィー用を用いた。

2. 装置

LC 部に Shimadzu Prominence UFLC システムを配した LCMS-2020 質量分析計 (島津製作所製) を用いた。

3. LC/MS 分析

3-1. 試料調製

標準品、各 1 mg を MeOH で溶解し、保存溶液 10 mL を得た。各保存溶液を用いて段階希釈し、0.2 mg/mL になるように内標準物質を加えた標準品 0.01 ~ 10 μ g/mL を調製し、検量線を作成した。

健康食品および *Polygonum* 属植物については、各 200 mg を 20 mL の MeOH (1-6, 34-40) または蒸留水 (7-33) で 5 回抽出し、濃縮した後 MeOH で再溶解した。これを、適宜希釈し、内標準物質をそれぞれ加えて測定溶液とした。

3-2. LC/MS 分析

以下の測定条件により分析を行った。

LC 条件

カラム : Kinetex 2.6u C18 100A (2.1 \times 150 mm, 2.6 μ m; Phenomenex)

移動相 A 液 : 0.5 % 酢酸水溶液

移動相 B 液：アセトニトリル
グラジエント (A 液/B 液)：70/30 (initial)–30/70
(3 min)–30/70 (10 min)–0/100 (5 min hold)
流速：0.2 mL/min
注入量：1 μ L
カラム恒温槽温度：40 $^{\circ}$ C
検出器：ダイオードアレイ検出器 (スキャン範囲 190–800 nm)

MS 条件

イオン化法：ESI ネガティブモード
ネブライザーガス流量：1.5 L/hr
ドライイングガス流量：10.0 L/hr
インターフェイス電圧：4.5 kV
DL 電圧：0 V
DL 温度：250 $^{\circ}$ C
ヒートブロック温度：200 $^{\circ}$ C
検出器電圧：1.1 kV
SIM モード： m/z 165, 227, 239, 253, 269, 283, 431

C. 研究結果および考察

上記の条件において LC/MS 分析を行った結果、全ての標準品を約 10 分で溶出させることができ、既報の分析法と比較して、分析時間を 3 分の 1 程度に短縮する条件設定が可能となった (Figure 3)。また、標準品 9 種について、それぞれ任意の濃度に調製した標準溶液における内標準物質 Ethyl *p*-hydroxybenzoate に対するピーク面積比から検量線を作成した。RV は 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5 μ g/mL の 7 点、EM は 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 μ g/mL の 5 点、PH は 1, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 μ g/mL の 5 点、DA は 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 μ g/mL の 7

点、CH は 0.75, 1, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 μ g/mL の 6 点、その他の化合物 (AEG, EMG, AE, RH) は、0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 μ g/mL の 5 点で検量線を作成した。

真度および精度は、各検量線の範囲内における 3 または 4 点について、各濃度 7 回ずつ繰り返し測定した結果から評価した。なお、真度は検量線から求めた濃度と標準品の濃度の差として、精度は相対標準偏差として算出した。また、検出限界 (Limit Of Detection ; LOD) および定量限界 (Limit Of Quantitation ; LOQ) は、次式に基づいて、算出した。

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{SD}/S$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/S$$

S は検量線の傾き、 SD は検量線における y 切片の標準偏差を表している。

Table 1 に各標準品における検討結果を示した。

RV は、0.1–5.0 μ g/mL の濃度範囲において、 $R^2 = 0.9997$ と良好な直線性を示した。この時の真度および精度は、4 濃度において、それぞれ $\leq 1.46\%$ 、 $\leq 2.73\%$ と良好な値が得られた。

AEG, EMG, AE, および RH は、0.1–1.0 μ g/mL の濃度範囲において、それぞれ $R^2 = 0.9989, 0.9996, 0.9998, 0.9999$ と良好な直線性を示した。この時の真度は、それぞれ 13.84%, 5.16%, -7.34%, -7.60% (0.1 μ g/mL), -0.59%, 0.84%, -0.59%, -2.98% (0.5 μ g/mL), -0.85%, 1.16%, -0.71%, -2.60% (1.0 μ g/mL) であり、精度は、それぞれ 2.21%, 1.33%, 2.59%, 1.11% (0.1 μ g/mL), 0.73%, 0.58%, 0.62%, 1.33% (0.5 μ g/mL), 0.64%, 0.44%, 0.79%, 0.64% (1.0 μ g/mL) であった。

EM は、0.01 – 0.1 µg/mL の濃度範囲において、 $R^2=0.9997$ の直線性を示した。この時の真度は、-8.92 % (0.01 µg/mL), -0.09 % (0.05 µg/mL), -0.69 % (0.1 µg/mL) であり、精度は、1.74 % (0.01 µg/mL), 1.55 % (0.05 µg/mL), 1.42 % (0.1 µg/mL) であった。

PH は、1.0 – 10.0 µg/mL の濃度範囲において、 $R^2=0.9913$ の直線性を示した。しかし、この時の真度は、-31.16 % (1.0 µg/mL), 4.97 % (5.0 µg/mL), -9.24 % (10.0 µg/mL) であり、精度は、3.47 % (1.0 µg/mL), 1.31 % (5.0 µg/mL), 0.93 % (10.0 µg/mL) であった。低濃度での真度が悪い理由として、PH は他の 8 種の化合物と比較して、検出感度が低く低濃度領域でピークが検出されないこと、それに伴い、検量線において 10.0 µg/mL の値が強く反映されていることが考えられた。

DA および CH は、それぞれ 0.5 – 10.0 µg/mL, 0.75 – 10.0 µg/mL の濃度範囲において、 $R^2 = 0.9992, 0.9991$ と良好な直線性を示し、真度 $\leq -8.95\%$, -7.74% , 精度 $\leq 2.60\%$, 3.10% と良好な値を示した。

本分析法を *Polygonum* 属植物由来の生薬、健康食品および各地で採集したオオイタドリおよびイタドリに適用した (Figures 4, 5 and Tables 2, 3, 4, 5)。その結果、「専ら医薬品」に分類されているコジョウコンおよびカシュウでは、RV, EMG, EM, PH が検出された。一方、未区分のケンジンからは、今回の分析対象とした化合物は検出されなかった。

Table 4 において、オオイタドリの葉および茎 (4, 6) からは、RV, EMG, EM, RH, PH が検出された。一方で、オオイタドリの根 (5) からは、

EMG, EM, RH が検出されたが、RV は定量限界以下であり、PH は検出されなかった。オオイタドリでは、各部位ともに EM が最も多い含量を示した。オオイタドリの葉、根および茎の比較では、葉に最も多くの EM が含有されていた。若芽+茎および若芽のみの場合では、若芽のみの方が EM 含量が多く検出された。若芽は葉の集合のような形状であるため、この結果は妥当と考えられ、葉および茎をそれぞれ分析した結果と一致した。

オオイタドリの採集地域により比較すると、本州で採集 (24 – 26) したものより北海道で採集したものの方が AQ 類の含量が高い傾向にあった。また、本州産のオオイタドリからは RV は検出されなかった。北海道で採集したもののうち、石狩郡当別町にて採集 (19 – 21) したものは全体的に AQ 類および RV の含量が少なかった。

イタドリに関しては、コジョウコンと比較して、若芽や茎などの地上部に含有される AQ 類は、同程度またはそれ以下の含量であった。イタドリの若芽+茎および若芽を比較すると、若芽のみの方が AQ 類の含量は少なかった。このことから、オオイタドリとは逆に、イタドリでは茎や地下部などの方が、葉に比べて AQ 類の含量が高いことが示唆された。さらに、イタドリとオオイタドリの若芽の比較では、オオイタドリ若芽の方が AQ 類の含量が高い傾向にあった。

また、イタドリについても採集地域により比較した結果、オオイタドリと同様に、本州産 (31 – 33) よりも北海道産 (28 – 30) の方が AQ 類および RV を多く含有していた。

一方、健康食品の分析では、検出された成分のうち EM のみ、すべての健康食品から検出されたが、RV, EMG, RH は一部の健康食品では検出されなかった (Table 5). 健康食品 34 – 38 は日本製品であり、オオイタドリ若芽が使用されている。また、39 および 40 は米国製品であり、39 にはオオイタドリの地下部のエキスが、40 はイタドリの地下部のエキスが含有されている。デキストリンなどの賦形剤の含有比率がわからないことと、健康食品と植物での抽出溶媒が異なるため、植物の結果と直接比較することはできないが、値としては概ね植物中の含量より低値であった。

そこで、1 を蒸留水で抽出・濃縮した後、デキストリンを除去するために MeOH で置換した抽出量と、オオイタドリの蒸留水による抽出量を比較した。その結果、1 からは 1 g 当り 516.5 mg, オオイタドリからは、348.0 ± 75.3 mg 抽出され、1 からの方が多くオオイタドリエキスを抽出できた。健康食品 1 に含まれる EM は、本州産オオイタドリ (24 – 26) より 1 桁多く、北海道産オオイタドリ (27) より 1 桁少ない含量であった。しかし、1 には 24 – 27 のオオイタドリが使用されているため、これらの配合により、1 の定量結果と近似すると考えられる。従って、今回測定した健康食品 7 種に使用されているオオイタドリエキスは濃縮されていない事が示唆された。

D. 結論

オオイタドリに含有されるアントラキノン類およびレスベラトロールの迅速定量分析法を開発した。Polygonum 属植物由来の生薬 3

種 (コジョウコン, カシユウ, ケンジン), 健康食品 7 製品および各地で採集したオオイタドリおよびイタドリに、本分析法を適用した。

その結果、コジョウコンおよびカシユウからは、RV, EMG, EM, RH, PH が検出され、ケンジンでは今回の分析対象とした化合物は検出されなかった。一方、オオイタドリからは RV, EMG, EM, RH, PH が検出され、使用部位によらず EM が最も多く含有されていた。イタドリでは、RV, EM, RH, PH が検出されたが、オオイタドリの方が AQ 類の含量が高い傾向が認められた。また、採集地域の比較により、本州産より北海道産の方が AQ 類および RV を多く含有していた。オオイタドリ含有健康食品の定量では、検出された成分のうち EM のみ、すべての健康食品から検出され、RV, EMG, RH は一部の健康食品では検出されなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 在間一将, 丸山卓郎, 合田幸広, 袴塚高志, Polygonum 属植物に含有される resveratrol および anthraquinone 類の LC/MS 分析, 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会, 東京 (2014.5).

2) 在間一将, 丸山卓郎, 林茂樹, 菱田敦之, 川原信夫, 高上馬希重, 合田幸広, 袴塚高志, LC/MS による Polygonum 属植物に含有されるアントラキノン類およびレスベラトロールの定量分析, 日本生薬学会第 61 回年会, 福岡 (2014.9).

参考文献

- 1) Baur J. A., Pearson K. J., Prince N. L., Jamieson H. A., Lerin C., Kalra A., Prabhu W., Allard J. S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P. J., Poosala S., Becker K. G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K. W., Spencer R. G., Lakatta E. G., Le Couteur D., Shaw R. J., Navas P., Puiqserver P., Ingram D. K., de Cabo R., Sinclair D. A. *Nature*, **444**, 337-342 (2006).
- 2) Wong R. H., Howe P. R., Buckley J. D., Coates A. M., Kunz I., Berry N. M. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **21**, 851-856 (2011).
- 3) Avula B., Joshi V. C., Wang Y. H., Khan I. A. *J. AOAC Int.* **90**, 1532-1538 (2007).
- 4) Yi T., Leung K. S., Lu G. H., Zhang H., Chan K. *Phytochem. Anal.* **18**, 181-187 (2007).
- 5) Yi T., Zhang H., Cai Z. *Phytochem. Anal.* **18**, 387-392 (2007).

Table 1. Calibration curves, LOD, LOQ, accuracy, and precision of nine constituents of *P. sachalinense* detected by MS (n = 7)

Compounds	Monitoring ion (m/z) ^a	Retention time (min) ^b	Linear range (μg/mL)	Regression equation	R ²	LOD (μg/mL) ^c	LOQ (μg/mL) ^d	Concentration (μg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)
RV	227	4.6	0.1 – 5.0	y = 0.00810x - 0.0000306	0.9999	0.015	0.045	0.1	1.45	2.73
								0.5	1.14	0.72
								1.0	1.46	1.09
								5.0	-0.72	0.36
AEG	431	2.6	0.1 – 1.0	y = 0.00849x - 0.000144	0.9989	0.021	0.064	0.1	13.84	2.21
								0.5	-0.59	0.73
								1.0	-0.85	0.64
								0.1	5.16	1.33
EMG	431	4.8	0.1 – 1.0	y = 0.0246x + 0.0000234	0.9996	0.014	0.042	0.5	0.84	0.58
								1.0	1.16	0.44
								0.1	-7.34	2.59
								0.5	-0.59	0.62
AE	269	6.4	0.1 – 1.0	y = 0.00855x + 0.000139	0.9998	0.013	0.040	1.0	-0.71	0.79
								0.01	-8.92	1.74
								0.05	-0.09	1.55
								0.1	-0.69	1.42
EM	269	7.4	0.01 – 0.1	y = 0.127x + 0.000290	0.9997	0.0016	0.0051	0.1	-7.60	1.11
								0.5	-2.98	1.33
								1.0	-2.60	0.64
								1.0	-31.16	3.47
RH	283	6.5	0.1 – 1.0	y = 0.0193x + 0.000204	0.9999	0.011	0.034	5.0	4.97	1.31
								10.0	-9.24	0.93
								0.5	0.51	2.12
								1.0	-4.24	2.60
PH	283	10	1 – 10.0	y = 0.000529x + 0.000203	0.9913	0.34	1.04	5.0	-2.92	2.51
								10.0	-8.95	2.09
								1.0	-2.45	3.10
								5.0	-0.97	1.37
DA	239	7.9	0.5 – 10.0	y = 0.00217x - 0.000208	0.9992	0.16	0.47	10.0	-7.74	1.40
								1.0	-2.45	3.10
								5.0	-0.97	1.37
								10.0	-7.74	1.40
CH	253	9.1	0.75 – 10.0	y = 0.00124x + 0.0000385	0.9991	0.28	0.84	5.0	-0.97	1.37
								10.0	-7.74	1.40
								1.0	-2.45	3.10
								5.0	-0.97	1.37

^a The monitoring ion of internal standard is m/z 165.

^b The retention time of internal standard is 5.5 min.

^c LOD = 3.3 × SD/S S : the slope of the calibration curves

^d LOQ = 10 × SD/S S : the standard variation of the y-intercept of the calibration curves

Table 2. A list of crude extract from *Polygonum spp.* and shoots of *P. sachalinense* and *P. cuspidatum*

Sample no.	Source plant	Locality	Collection date	Sample no.	Source plant	Locality	Collection date
1	<i>P. cuspidatum</i>	on the market		17	<i>P. sachalinense</i>	北海道名寄市	2014.5
2	<i>P. multiflorum</i>	on the market		18	<i>P. sachalinense</i>	北海道名寄市	2014.5
3	<i>P. bistorta</i>	on the market		19	<i>P. sachalinense</i>	北海道石狩郡当別町	2014.5
4	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2013.7	20	<i>P. sachalinense</i>	北海道石狩郡当別町	2014.5
5	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2013.7	21	<i>P. sachalinense</i>	北海道石狩郡当別町	2014.5
6	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2013.7	22	<i>P. sachalinense</i>	北海道天塩郡遠別町	2014.6
7	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2014.4	23	<i>P. sachalinense</i>	北海道天塩郡遠別町	2014.6
8	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2014.4	24	<i>P. sachalinense</i>	新潟県糸魚川市	2014.5
9	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2014.4	25	<i>P. sachalinense</i>	新潟県村上市	2014.4
10	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2014.4	26	<i>P. sachalinense</i>	山形県鶴岡市	2014.5
11	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2014.4	27	<i>P. sachalinense</i>	北海道上川郡下川町	2014.5
12	<i>P. sachalinense</i>	北海道帯広市	2014.4	28	<i>P. cuspidatum</i>	北海道名寄市	2014.5
13	<i>P. sachalinense</i>	北海道名寄市	2014.5	29	<i>P. cuspidatum</i>	北海道名寄市	2014.5
14	<i>P. sachalinense</i>	北海道名寄市	2014.5	30	<i>P. cuspidatum</i>	北海道名寄市	2014.5
15	<i>P. sachalinense</i>	北海道名寄市	2014.5	31	<i>P. cuspidatum</i>	秋田県由利本荘市	2014.春
16	<i>P. sachalinense</i>	北海道名寄市	2014.5	32	<i>P. cuspidatum</i>	山形県	2014.春
				33	<i>P. cuspidatum</i>	山形県鶴岡市	2014.春

Table 3. A list of food supplement containing *P. sachalinense* and *P. cuspidatum*

Sample no.	Ingredient	Form	Recommended daily intake (g)
34	デキストリン, オオイタドリ若芽エキス	powder	0.24
35	鮭軟骨抽出物(コンドロイチン硫酸含有), メチルスルフォニルメタン (MSM), フィッシュコラーゲンペプチド, デキストリン, 乾燥酵母, 筋骨草エキス末, オオイタドリエキス末 , グルコサミン(微生物由来), 貝カルシウム, 結晶セルロース, 微粒酸加ケイ素, ステアリン酸Ca, 甘味料(ネオテーム), ヒアルロン酸(原材料の一部にゼラチンを含む)	tablet	3.6
36	オオイタドリ若芽エキス末 (デキストリン, オオイタドリ若芽エキス), 乳糖, コーンスターチ, デキストリン, クマザサ粉末, 鮫軟骨抽出物(コンドロイチン含有), 発酵グルコサミン, ステアリン酸カルシウム, 糊料(メチルセルロース), ヒアルロン酸	tablet	2.4
37	オオイタドリ若芽エキス末 (デキストリン, オオイタドリ若芽エキス), 紫菊花末, 筋骨草エキス末(デキストリン, 筋骨草エキス), 乳糖, グルコサミン, セルロース, ステアリン酸カルシウム, 糊料(メチルセルロース), V.B ₂ , セラック	tablet	2.5
38	還元麦芽糖水飴, オオイタドリ若芽エキス末 (デキストリン, オオイタドリ若芽エキス), グルコサミン, 結晶セルロース, 二酸化ケイ素, ステアリン酸カルシウム	tablet	2.8
39	ビタミン類(V.A, V.C, V.D, V.E, V.K, V.B ₁ , V.B ₂ , ナイアシン, V.B ₆ , 葉酸, V.B ₁₂ , ビオチン, パントテン酸), ミネラル類(Ca, Fe, I, Mg, Zn, Se, Cu, Mn, Cr, Mo, Na, K), 重酒石酸コリン, ケイヒエキス, スイートチェリー果実, 緑茶葉エキス, ぶどう種子エキス, ザクロ果実エキス, オオイタドリ根/根茎エキス (レスベラトロール50%含有), プロココリー花, キャベツ葉, トマト果実, ニンジン根, コラード若葉, からし菜, ケール葉, ほうれん草葉, ショウガ根茎エキス, イノシトール, クランベリー果実(有機酸[キナ酸, リンゴ酸, クエン酸]30%標準化), チェストツリーベリーエキス(アグヌシド0.5%標準化), 4倍濃縮ビルベリーエキスなど	tablet	6.3 ^a
40	V.A, V.C, V.E, セイヨウニワトコベリーエキス, ぶどう種子エキス(ポリフェノール[プロアントシアニジン含有]95%標準化), ローブッシュブルーベリー, ウコン根茎エキス(クルクミノイド90%標準化), オーガニックアサイ, α-リポ酸, ケルセチン, イタドリ根/根茎 (レスベラトロール50%含有)エキスなど	capsule	1.7 ^a

Table 4. Contents of nine constituents in *Polygonum* plants

Samples	使用部位	Content (mg/g) ^a								
		RV	AEG	EMG	AE	EM	RH	PH	DA	CH
1	根	1.07 ± 0.0027	N.D. ^b	1.17 ± 0.011	N.D.	0.925 ± 0.0098	0.376 ± 0.0032	0.350 ± 0.034	N.D.	N.D.
2	根	0.00379 ± 0.00017	N.D.	1.91 ± 0.021	N.D.	0.238 ± 0.018	0.0117 ± 0.00017	0.0535 ± 0.0019	N.D.	N.D.
3	根茎	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	葉	0.330 ± 0.00058	N.D.	0.280 ± 0.00021	N.D.	1.88 ± 0.063	0.00143 ± 0.0000082	0.552 ± 0.0013	N.D.	N.D.
5	根	LOQ以下	N.D.	0.0593 ± 0.00046	N.D.	0.0353 ± 0.0010	0.00646 ± 0.00015	N.D.	N.D.	N.D.
6	莖	0.0244 ± 0.000076	N.D.	0.403 ± 0.0037	N.D.	0.310 ± 0.0036	0.0980 ± 0.00080	0.178 ± 0.0053	N.D.	N.D.
7	若芽+莖	1.47 ± 0.016	N.D.	0.0288 ± 0.00037	N.D.	6.43 ± 0.17	0.164 ± 0.0027	0.911 ± 0.052	N.D.	N.D.
8	若芽+莖	2.95 ± 0.033	N.D.	0.0396 ± 0.00064	N.D.	13.4 ± 0.28	0.148 ± 0.0073	2.57 ± 0.20	N.D.	N.D.
9	若芽+莖	2.62 ± 0.022	N.D.	0.0208 ± 0.00064	N.D.	11.7 ± 1.5	0.112 ± 0.0014	1.88 ± 0.052	N.D.	N.D.
10	若芽+莖	2.69 ± 0.019	N.D.	0.0645 ± 0.0018	N.D.	17.8 ± 3.3	0.185 ± 0.0017	4.18 ± 0.13	N.D.	N.D.
11	若芽+莖	2.27 ± 0.019	N.D.	0.0344 ± 0.00033	N.D.	16.1 ± 1.8	0.154 ± 0.0013	2.50 ± 0.14	N.D.	N.D.
12	若芽+莖	0.0620 ± 0.00054	N.D.	0.0116 ± 0.00025	N.D.	0.471 ± 0.0040	0.0309 ± 0.00039	0.246 ± 0.0011	N.D.	N.D.
13	若芽+莖	0.383 ± 0.0087	N.D.	0.0130 ± 0.00030	N.D.	1.46 ± 0.0071	0.0695 ± 0.00051	0.684 ± 0.020	N.D.	N.D.
14	若芽	0.623 ± 0.0045	N.D.	0.0161 ± 0.00025	N.D.	4.49 ± 0.43	0.151 ± 0.0024	1.56 ± 0.0069	N.D.	N.D.
15	若芽+莖	0.601 ± 0.0036	N.D.	0.0118 ± 0.00018	N.D.	1.28 ± 0.025	0.0516 ± 0.00039	0.318 ± 0.045	N.D.	N.D.
16	若芽	0.705 ± 0.012	N.D.	0.0127 ± 0.00022	N.D.	2.04 ± 0.0097	0.316 ± 0.0048	0.515 ± 0.048	N.D.	N.D.
17	若芽+莖	0.529 ± 0.0081	N.D.	0.0131 ± 0.00053	N.D.	1.61 ± 0.018	0.0615 ± 0.0012	0.435 ± 0.11	N.D.	N.D.
18	若芽	0.820 ± 0.0056	N.D.	0.0203 ± 0.00021	N.D.	3.02 ± 0.0044	0.168 ± 0.0018	0.848 ± 0.0080	N.D.	N.D.
19	若芽+莖	0.0204 ± 0.0031	N.D.	LOQ以下	N.D.	0.0390 ± 0.0029	0.00847 ± 0.000051	0.0336 ± 0.010	N.D.	N.D.
20	若芽	0.0227 ± 0.0040	N.D.	LOQ以下	N.D.	0.0867 ± 0.011	0.00241 ± 0.000082	0.0293 ± 0.011	N.D.	N.D.
21	若芽	0.0258 ± 0.0014	N.D.	LOQ以下	N.D.	0.227 ± 0.051	0.00422 ± 0.00012	0.0897 ± 0.024	N.D.	N.D.
22	若芽+莖	0.0875 ± 0.0037	N.D.	0.00424 ± 0.0010	N.D.	1.19 ± 0.046	0.0300 ± 0.00057	0.386 ± 0.11	N.D.	N.D.
23	若芽	0.726 ± 0.045	N.D.	0.0157 ± 0.0012	N.D.	1.77 ± 0.012	0.00781 ± 0.00027	1.046 ± 0.20	N.D.	N.D.
24	若芽+莖	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.00302 ± 0.000085	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25	若芽+莖	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.00338 ± 0.000052	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
26	若芽+莖	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000936 ± 0.000017	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
27	若芽+莖	0.0598 ± 0.00095	N.D.	N.D.	N.D.	0.111 ± 0.0023	LOQ以下	N.D.	N.D.	N.D.
28	若芽+莖	0.258 ± 0.0025	N.D.	LOQ以下	N.D.	0.241 ± 0.0013	0.00856 ± 0.000062	0.0518 ± 0.0021	N.D.	N.D.
29	若芽+莖	0.0305 ± 0.00027	N.D.	LOQ以下	N.D.	0.0456 ± 0.00077	LOQ以下	N.D.	N.D.	N.D.
30	若芽+莖	0.0487 ± 0.0014	N.D.	LOQ以下	N.D.	0.0653 ± 0.0011	LOQ以下	N.D.	N.D.	N.D.
31	若芽	0.00387 ± 0.000041	N.D.	N.D.	N.D.	0.00706 ± 0.00017	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
32	若芽	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.000377 ± 0.0000077	0.00337 ± 0.00031	N.D.	N.D.	N.D.
33	若芽+莖	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	LOQ以下	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^a Values are the mean ± SD (n = 3)

^b Not detected

Table 5. Contents of nine constituents in food supplement

Samples	使用部位	Content (mg/g) ^a								
		RV	AEG	EMG	AE	EM	RH	PH	DA	CH
34	若芽	0.0285 ± 0.000068	N.D. ^b	0.0916 ± 0.0010	N.D.	0.0267 ± 0.00029	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
35	若芽	N.D.	N.D.	0.00606 ± 0.00019	N.D.	0.00113 ± 0.000037	0.0181 ± 0.0012	N.D.	N.D.	N.D.
36	若芽	0.0144 ± 0.00037	N.D.	0.00524 ± 0.00023	N.D.	0.0134 ± 0.00031	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
37	若芽	0.00394 ± 0.0002	N.D.	0.00467 ± 0.00014	N.D.	0.00707 ± 0.00013	0.0841 ± 0.0012	N.D.	N.D.	N.D.
38	若芽	0.00631 ± 0.00030	N.D.	0.0498 ± 0.00089	N.D.	0.00453 ± 0.000090	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
39	根	0.321 ± 0.016	N.D.	N.D.	N.D.	0.0411 ± 0.00078	0.00664 ± 0.000079	N.D.	N.D.	N.D.
40	根	24.6 ± 0.53	N.D.	0.0466 ± 0.00057	N.D.	1.15 ± 0.018	0.134 ± 0.00079	N.D.	N.D.	N.D.

^a Values are the mean ± SD (n = 3)

^b Not detected

Table 6. Quantity to be taken in a day in food supplement

samples	Content (mg/day)								
	RV	AEG	EMG	AE	EM	RH	PH	DA	CH
34	0.00684	N.D. ^a	0.021984	N.D.	0.006408	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
35	N.D.	N.D.	0.021816	N.D.	0.004068	0.06516	N.D.	N.D.	N.D.
36	0.03456	N.D.	0.012576	N.D.	0.03216	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
37	0.00985	N.D.	0.011675	N.D.	0.017675	0.21025	N.D.	N.D.	N.D.
38	0.017605	N.D.	0.138942	N.D.	0.012639	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
39	2.01267	N.D.	N.D.	N.D.	0.257697	0.041633	N.D.	N.D.	N.D.
40	41.328	N.D.	0.078288	N.D.	1.932	0.22512	N.D.	N.D.	N.D.

^a Not detected

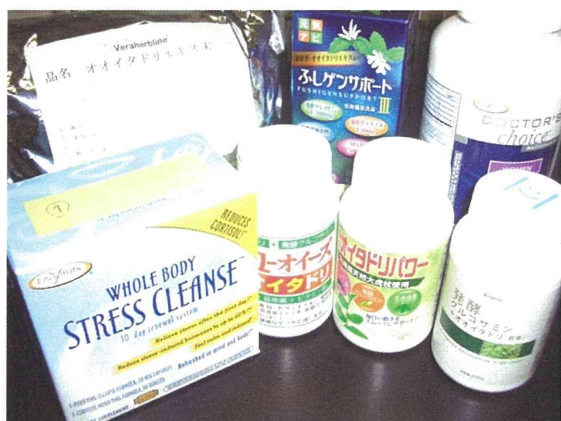


Figure 1. A picture of food supplements which contain *P. sachalinense*.

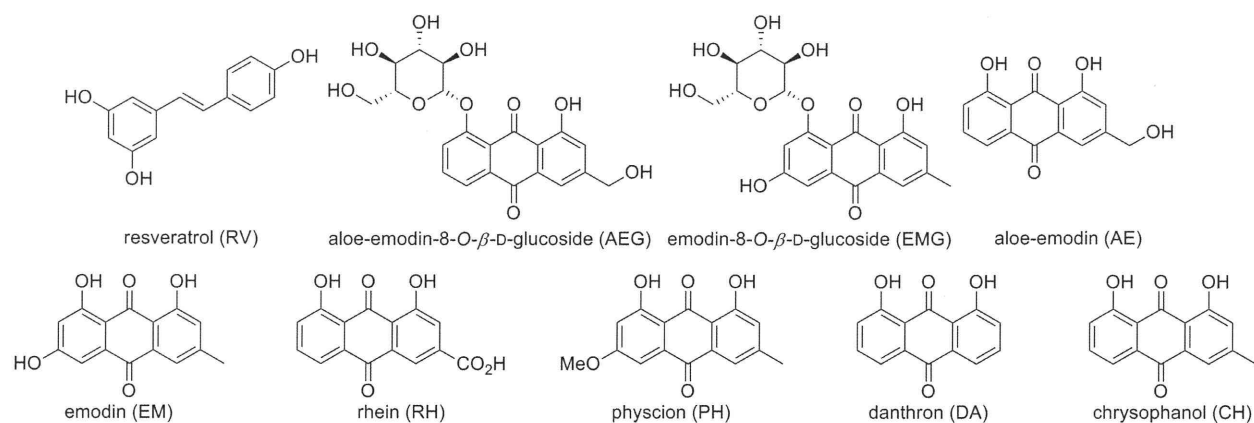


Figure 2. Structures of standard compounds 1 – 9

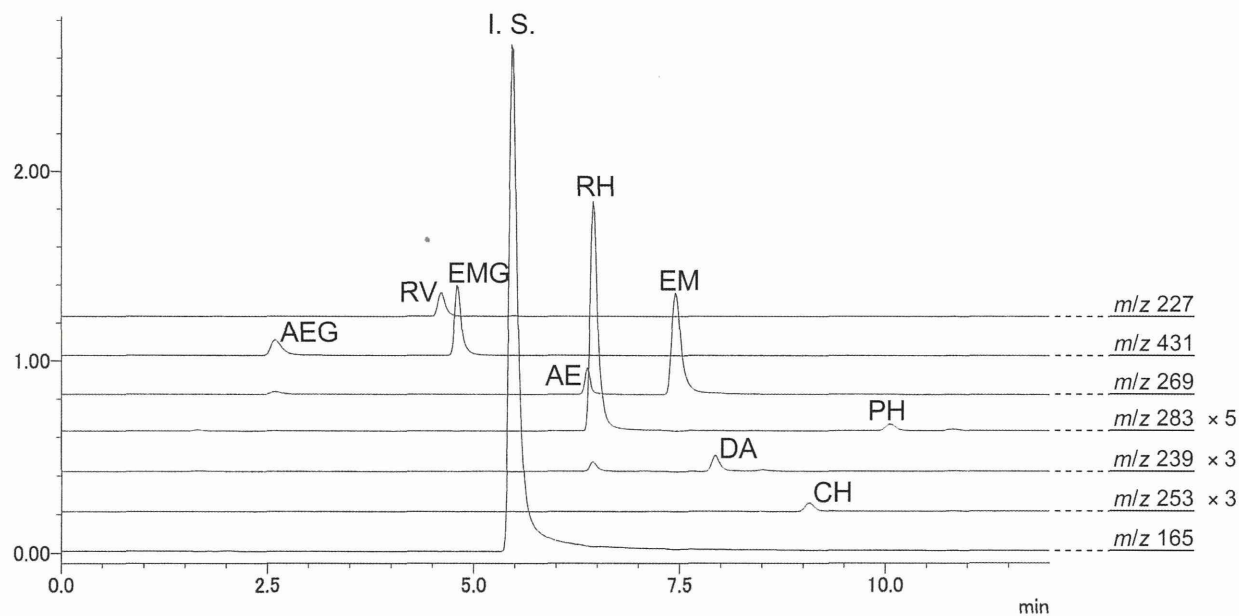


Figure 3. Mass chromatograms of **nine** standard compounds on LC/MS analysis



Figure 4. The used part of *P. sachalinense*

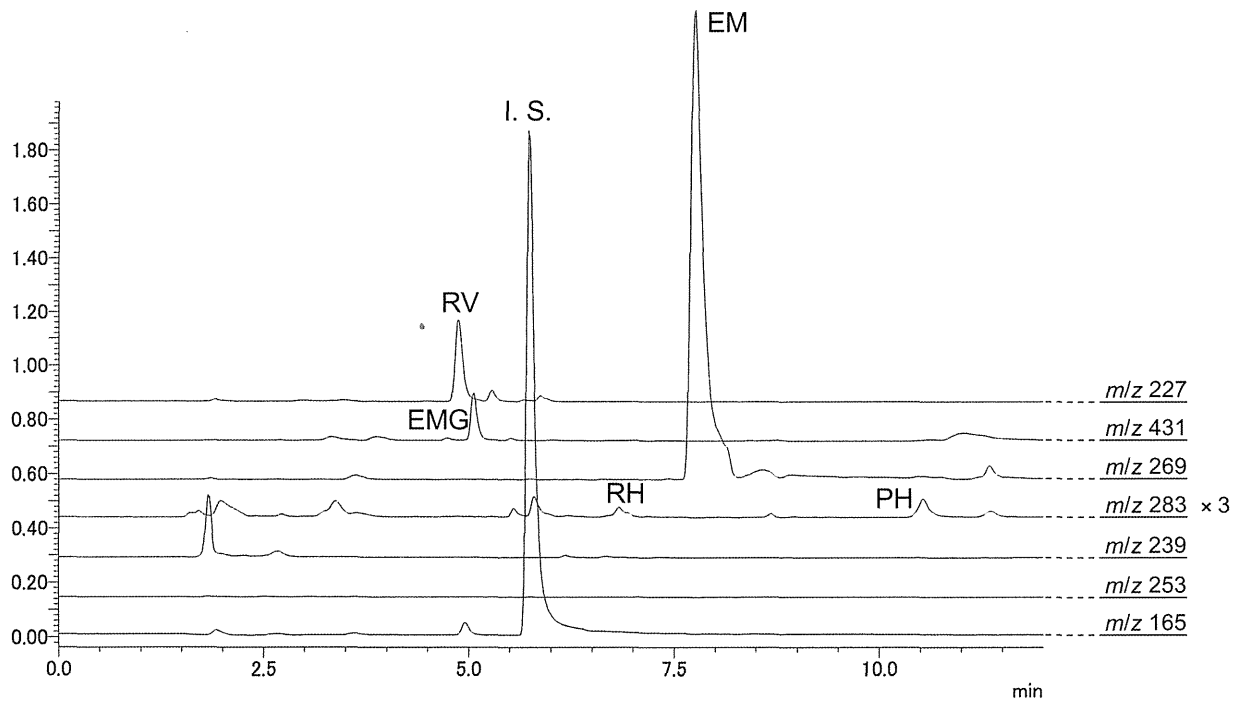


Figure 5. Mass chromatograms of leaves of *P. sachalinense* on LC/MS analysis

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

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長 丸山 卓郎

Sida 属植物の組織形態学的研究(2)～茎について～

協力研究者 日本薬科大学 漢方薬学分野 山路 誠一

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、海外から導入し国内栽培した *Sida* 属植物各種における茎の組織形態的特徴について検討した。その結果 *Sida* 属植物の茎では、若い枝先において葉で観察された星状毛や球状の腺毛が認められたが、横切面における師部組織の種間差は大きくないことが明らかになった。すなわち、同属植物の組織形態学的な鑑別には、前回報告した葉の表面に分布する腺毛の観察との併用が有用であることが示唆された。

協力研究者

若菜大悟 星薬科大学 助教（前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

川原信夫 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター長

杉村康司 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究部研究サブリーダー

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

が多いため、含有成分の抽出利用を考えた場合、重量基準で取引することが想定される。また、台湾の台中市では *Sida* 属の茎由来と思われる民間薬『賜米草』が流通していた(図 1)。このような事情及び商品が流通する現実に鑑み、茎もまた葉とともに組織形態的な鑑別方法の確立が必要と考えられた。

そこで前回、葉の腺毛観察に供した種子島研究部導入の上記 2 種の *Sida* 属植物の茎を用い、その組織形態を観察した。

B. 研究方法

1. 実験材料(表 1)

比較はマルバキンゴジカ *S. cordifolia*, キンゴジカ *S. rhombifolia* について行った。これらは 2011 年から 2013 年にかけて(独)医薬基盤種子島研究部において栽培されていたもので、2013 年産については 8 月から 10 月までの 3 か月間のうち良好に成長していた枝先の下部を用い

A. 研究目的

前回、*Sida* 属植物のうち中国やインドで薬用種とされるキンゴジカ (*Sida*) 属植物キンゴジカ *Sida rhombifolia* L. 及びマルバキンゴジカ *S. cordifolia* L. は、葉の背軸面の表面視におけるとっくり状腺毛が特徴的であり、鑑別に有用であることを報告した^{1,2)}。*Sida* 属は亜低木になる種

試料は表 1 にまとめた。

2. 実験方法

2-1. 組織形態の観察

試料は全草採取品については十分に成長した茎の根元付近、および枝元採取品は葉を採取した枝先の基部（頂端から 4~6 節目を基本とする。以下、枝元と称する）とした。試料は冷蔵下で水に 6~8 時間程度浸漬後、定法にて凍結マイクロトームにより横切片を作成、観察した。この試料はオードジャベル液にて漂白し中和水洗の後、グリセリンまたは親水性樹脂製基剤（大道産業 Mount-quick aqueous）にて包埋した。包埋した切片は光学顕微鏡（オリンパス BH-2）下にて観察した。観察部位は茎の基部付近および前回採取した標本の枝元部分とした。枝元部分では腺毛と星状毛の有無を観察したほか、茎では二次師部における放射組織および師部細胞群の構成細胞列数、木部の最大道管径について計測した。

C. 研究結果

各種の比較検討結果は表 2 にまとめ、台中市場の『賜米草』の組織形態を図 1 に示したほか、比較植物の鏡検写真を図 2~3 に示した。

1. *S. cordifolia* マルバキンゴジカ（表 2, 図 2）

基部：最外層は周皮からなるが、まれに表皮が残存する。周皮を形成するコルク層は 6~8 層。師部の最外層には pericyclic fibers が認められる。二次師部は一次放射組織で大きく区切られ大きな三角形を形成する。一次放射組織の柔細胞群には、シュウ酸カルシウムと思われる集晶が認められる。一次放射組織で挟まれた二次師部組織内には 1~3 細胞の柔細胞列からなる二次放射組織が認められ、この柔細胞はしばし

ば接線方向に伸長し 11~25 μm になる。二次師部の師部繊維は 3 細胞列のものが多く、最大 8 細胞列を形成する。二次木部は木部繊維ならびに通道組織からなり、最大道管径は 30~50 μm 。髓は柔細胞からなり、時に厚壁化する。

枝元：最外層は表皮からなるが一部で癒傷組織または後の周皮に発達すると思われるコルク組織の形成が認められる。表皮には球状の腺細胞を持つ腺毛と葉で認められたものと同様の星状毛が少量認められる。師部の最外層には pericyclic fibers が認められる一方で、二次師部形成は形成途上で、師部繊維が 0~2 層にとどまり、1~3 列の繊維細胞群からなる。一次放射組織も形成途上で 1 細胞列のものが認められる。木部の道管も基部に比べてやや径が小さく 21~50 μm であった。

2. *S. rhombifolia* キンゴジカ（表 2, 図 3）

基部：最外層は周皮からなるが、まれに表皮が残存する。周皮を形成するコルク層は 7~10 層。師部の最外層には pericyclic fibers が認められる。二次師部は一次放射組織で大きく区切られ大きな三角形を形成する。一次放射組織の柔細胞群には、シュウ酸カルシウムと思われる集晶が認められる。一次放射組織で挟まれた二次師部組織内には 1~3 細胞の柔細胞列からなる二次放射組織が認められる。二次師部の繊維群は 1 群あたり 4~6 細胞列以上のものが多く、*S. cordifolia* の繊維群に比べて大きな塊として観察される。最大 13 細胞列を形成する。二次木部は木部繊維ならびに通道組織からなり、最大道管径は 32~51 μm 。髓は柔細胞からなり、時に厚壁化する。

枝元：最外層は表皮からなるが一部で癒傷組織または後の周皮に発達すると思われるコルク組織の形成が認められる。表皮には球状の腺

細胞を持つ腺毛と葉で認められたものと同様の星状毛が少量認められる。師部の最外層には pericyclic fibers が認められる一方で、二次師部形成は形成途上で、師部繊維が 1~2 層にとどまり、1~5 列の繊維細胞群からなる。一次放射組織も形成途上で 1 細胞列のものが認められるが、接線方向径 7~24 μm で *S. cordifolia* に比べ小さい傾向にあった。木部の道管は基部に比べてやや径が小さく 30~41 μm であった。

D. 考察

今回検討した *Sida* 属植物各種における茎の組織形態的特徴は次のとおりであった。すなわち、枝元とした茎の先端付近においては、比較したいずれの種でも表皮が残存していたほか、葉で観察されたアオイ科植物特有の星状毛ならびに球状の腺細胞をもつ腺毛が観察された。一方、基部では周皮の形成にともなって表皮の大半が脱落し、星状毛、腺毛のいずれの毛茸も観察されなかった。

今回比較した *S. cordifolia* 及び *S. rhombifolia* の茎の横切面では、茎の基部及び枝元部分のいずれでも、二次師部における放射組織と師部繊維群の列数、及びこれらの繊維群に挟まれた放射組織柔細胞の接線方向径に一定程度の差違が認められたものの、数値的に重なる部分も少なくないことから完全な区別には至らなかった。以上により、茎の組織形態を比較検討する場合は先端部分の横切面観察と、これまでに前報までに行った葉の表面視を併せて行う必要があると考えられた。

なお、著者らが蒐集した台湾の民間薬『賜米草（別名：黄花稔）』については、DNA における ITS 領域における塩基配列のデータベースとの比較検討の結果では *S. acuta* との高い相同性

が見出されている。今後はこの *S. acuta* ならびに *S. cordata* 等、東アジア各国に分布することが報告される種を中心に、標本資料を入手のうえ更なる検討をはかりたい。

E. 結論

Sida 属植物の茎の比較組織形態学的検討の結果、茎の観察に際してはサンプリング部位を基部ならびに先端部にわたって広く取り、成長初期で表面に分布する毛茸の観察が可能な枝元部分、及び茎として十分に成長した基部の双方の組織形態を観察する必要性が示唆された。さらに、より *Sida* 属植物としての鑑別の確度を高めるために、葉の表面視観察と併用することが望ましい。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 榊 真由, 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, 川原信夫, 李 昭瑩, *Sida* 属植物の組織形態学的研究(6), 日本薬学会第 135 年会, 27PB-am150S, 2015 年 3 月, 神戸.

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) 浅沼舞, 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, 李昭瑩, *Sida* 属植物の組織形態学
的研究 (5), 日本薬学会第 134 年会, 280-am13,
2014 年 3 月, 熊本

2) 若菜大悟, 丸山卓郎, 鎌倉浩之, 杉村康司,

飯田 修, 金井哲朗, 山路誠一, 木村孟淳,
合田幸広, DNA 配列解析及び形態観察に基
づく *Sida* 属植物製品の実態調査, 日食化誌,
19(2), 111-118 (2012).

表 1 試料リスト

Sida cordifolia L. Japanese name: マルバキンゴジカ

試料番号: U53-4; 導入元: Botanischer Garten des Institutes für Botanik
der Karl-Franzens-Universität Graz, AUSTRIA

試料番号: V64-1; 導入元: Grunapark essen, GERMANY

試料番号: X21-1; 導入元: Universität Potsdam Botanischer Garten
GERMANY

Sida rhombifolia L. Japanese name: キンゴジカ

試料番号: V26,27; 導入元: Botanischer Garten der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel, GERMANY

試料番号: V67-2; 導入元: Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants,
CHINA

試料番号: V74-2; 導入元: Universität Potsdam Botanischer Garten,
GERMANY

栽培地: (独) 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

表 2

Sida cordifolia および *S. rhombifolia* の茎における組織形態学的特徴

植物名	<i>Sida cordifolia</i>					
	試料番号	U53-4	U53-4②	V64-1	X21	
サンプリング位置	基部	枝元	枝元	枝元	枝元	
毛 茸	—	+	+	+	+	
腺毛のタイプ	(周皮形成)	球状	球状	spherical**		
星 状 毛		+	+	+		
二次師部						
放射組織を構成する 柔細胞の列数*	1-2-3	1-1-3	1-1-1	1-1-1		
二次放射組織柔細胞の 接線方向径(μm)*	18-20-25	11-13-18	10-13-19	8-11-15		
師部繊維群の列数*	1-3-8	1-3-5	<i>n. d.</i>	1-2-3		
二次木部						
最大道管径(μm)*	39-43-50	30-42-45	21-23-24	36-42-50		
植物名	<i>S. rhombifolia</i>					
	試料番号	V26-4	V26-4	V27-6	V27-6	V67-2
サンプリング位置	基部	枝元	基部	枝元	枝元	枝元
毛 茸	—	+	—	+	+	+
腺毛のタイプ	(周皮形成)	球状	(周皮形成)	球状**	球状	球状
星 状 毛		+		+	+	+
二次師部						
放射組織を構成する 柔細胞の列数*	1-1-3	1-1-2	1-1-2	1-1-2	1-1-2	1-1-2
二次放射組織柔細胞の 接線方向径(μm)*	7-11-18	10-13-15	11-17-20	9-14-24	10-13-16	11-15-19
師部繊維群の列数*	1-6-13	1-3-4	2-7-10	1-3-5	2-4-5	1-1-2
二次木部						
最大道管径(μm)*	32-43-51	32-35-38	42-45-48	32-35-38	30-32-35	32-34-41

* 表中のデータは最小—中央値—最大値の順

** 一部でコルクが発生する