

201427004B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

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

平成 24-26 年度 総合研究報告書

(H24-医薬-一般-004)

研究代表者 袴塚 高志

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書 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 袴塚 高志	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
III. 研究成果の刊行物・別刷	17

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

研究代表者 袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

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、無承認無許可医薬品の指導取締りについて（昭和 46 年 6 月 1 日 薬発第 476 号）の別紙「医薬品の範囲に関する基準」（直近の改正：平成 25 年 7 月 10 日の医薬食品局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」（薬食発 0710 第 2 号））に基づき行われる。本研究では、成分本質（原材料）により無承認無許可医薬品と判断されるべき成分本質について、調査と分析、有害性予測を行うとともに、健康食品と称して販売される無承認無許可医薬品について適切に監視できるよう、これまで検出されてきた成分情報を集め、専ら医薬品として化合物レベルで指定できるか検討する。

新規に申請のあった成分本質（原材料）については、RTECS, Chemical Abstracts, 通知に記載されている参考文献等を利用しながら、毒性データ、二次代謝成分や生理活性、麻薬、向精神薬、覚せい剤様作用があるかどうか調査を行った。オオイタドリ地上部、ヨーロッパドウトイントゥール品種、キャラボクの葉、*N*-アセチルシステイン、レモンの葉については、専ら医薬品に指定すべき成分本質であるものと考察した。これらの検討をもとに、「医薬品の成分本質に関するワーキンググループ」の資料準備についても対応した。

継続的に実施しているスクリーニングでは、強壮や痩身を標榜する製品から、未知物質は検出されなかったが、諸外国との情報交換を行った結果、日本で未認可の早漏防止薬である dapoxetine, 同じく未認可の女性用媚薬である flibanserin が、強壮を標榜する健康食品中から検出されたとの情報があり、また、海外市場では依然として新規の ED 治療薬類縁体の検出が報告されているため、これらの迅速分析法を確立した。

天然物関係では、専ら医薬品に指定されているものの、成分情報と基原種の関係が明確でないセンブクカ及び、同属で専ら医薬品に指定されているドモッコウについて遺伝子解析を行い、基原の確認を行った。さらに、センブクカの指標成分としてセスキテルペンラクトンの単離を行うとともに、迅速分析法の開発を行った。また、シャタバリについては、遺伝子分析により、その基原が *Stemona* 属植物であることを示した。さらに、オオイタドリについては、アントラキノン類や resveratrol の迅速定量分析法を開発し、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ついて定量を行った。また、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い、また、組織形態学的検討を行った。さらに、食薬区分が行われていないが、一部地域でお茶葉代わりに利用され、Parkinson 病様病態を示すことが報告されているサワーソップ（バンレイシ科、トゲバンレイシ *Annona muricata*）について成分検討を実施した結果、アポルフイン系アルカロイドが単離され、また、同科植物であるイランイランノキの葉及びバンレイシ（*Annona squamosa*）の葉の成分検討を実施した結果、それぞれ、新規のリグナン化合物及び新規のニトロ基を持つフェノール化合物の配糖体が単離同定された。

本研究は、厚生労働省監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、健康危機管理に直結するものは迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知される。

分担研究者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所薬品部
部長

大塚英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究
科 名誉教授（安田女子大学薬学部教授）

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

無承認無許可医薬品とは、医薬品としての承認や許可が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、このような製品の流通により、様々な健康被害が予想されるため、薬事法により、その製造、販売、授与、広告が禁止される。本研究は、厚労省の監視指導・麻薬対策課（監麻課）との密接な連携の下、これら製品の流通を防ぎ、国民の健康・安全を確保する目的で行われる。前述した通知（平成25年7月10日の医薬食品局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」（薬食発0710第2号））では、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）（専ら医）は、332成分（植物由来236、動物由来21、その他75）ある。本研究では、この検討会のメンバーを中心

として、無承認無許可医薬品の監視・取締りに資する目的で、所謂健康食品中に添加された ED 治療薬類似成分、食欲抑制薬類似成分等の化学物質の構造決定を行い、それらの成分について文献調査、ドッキングスタディ等より、有害性予測を行う。さらに、専ら医指定後の迅速広範囲な取締りに対応できるよう分析法を確立する。さらに、新規に申請のあった成分本質（原材料）についても、国民の健康・安全確保を念頭に調査研究を行う。また、規制の範囲が明確でない成分・本質について、標品を入手し実態調査と組み合わせ、その範囲を確定させる。また、無承認無許可医薬品監視を念頭に、これまで検出された成分情報等を集め、適切に監視・指導が行えるよう、専ら医薬品として化合物レベルで指定できるか検討する。このような研究は、世界的にも国立研究機関と大学との共同研究で実施されているが、各国の法体系に即した研究が必須である。本研究の申請者らは、監麻課が主催する医薬品の成分本質に関する WG の実質的なメンバーであり、この分野での日本の状況を良く理解している。さらに分担研究者は、これまで10数種の ED 治療薬アナログを構造決定し、情報交換を諸外国の担当者と常時行って

いるだけでなく、医薬品監視の拠点である地方衛生研究所とも緊密に交流しており、得られた成果を直ちに国民の健康保護に還元できる立場にある。以上、本研究は、無承認無許可医薬品に関連し、厚生労働行政に直接貢献することを目的としたものである。

B. 研究方法

新規に申請のあった成分本質（原材料）については、まず基原植物の学名、和名、生薬名等について調査するとともに、医薬品としての使用実態を調査した。さらに、RTECS, Chemical Abstract, PubMed, 上記通知に記載されている参考文献等を利用しながら、毒性データ、二次代謝成分や生理活性、麻薬、向精神薬、覚せい剤様作用があるかどうか調査した。これらのデータを総合的に判断して、専ら医薬品に分類すべきであるかどうか検討した。

また、海外において健康食品中から検出の報告があった新規 ED 治療薬類縁体について、LC-PDA-MS 分析を行い、理化学データ及び分析法をまとめた。

さらに、文献情報等が少ない品目について、対象物を入手し、成分分析を行うこととし、アルカロイド等の存在が報告されているドモッコウ等について、含有アルカロイドの精査を行うとともに、市販品の基原種の同定を行った。また、オオイタドリ及びそれに由来する健康食品、及び近縁植物のイタドリを入手した。

また、*Sida* 属植物の有害性評価及び規制の範囲を検討するため、世界各地の植物園より種子交換により *Sida* 属植物 12 検体を導入し、遺伝子情報の整備、葉及び茎を対象とした組織形態学的検討を行った。

さらに摂取により擬似的パーキンソン病を

発症することが報告されているトゲバンレイシと同科植物であるイランイランノキ、トゲバンレイシ及びバンレイシの葉由来成分について検討を行った。

<倫理面への配慮>

本研究では、ヒト由来試料を用いた実験は行なわず、倫理面で大きな支障となる問題はないと考えられる。

C. 結果と考察

C.1 新規に調査依頼があった成分・本質に関する文献調査

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及び化学物質の本質について、文献調査等を行った。このうちオオイタドリ地上部とイタドリは、劇薬相当の LD₅₀ 値を持つ emodin を含むことから、専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した。ヨーロッパブドウ Teinturie 品種は、諸外国で専ら医薬品としての使用実態があることから、専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した。キャラボク (*Taxus cuspidata* var. *nana*) の葉については、処方箋医薬品の主成分である paclitaxel を含むことが知られており、同物質の LD₅₀ 値は、経口、犬で 9 mg/kg と毒薬相当であるため、専ら医薬品に指定すべき成分本質であるものと考察した。レモン (*Citrus limon*) の葉については、アルカロイド含有が 0.12-1.2% という報告が存在した。レモンのようなミカン科の植物では、アントラニル酸由来のアルカロイドや、synephrine 型のアルカロイドが入っている可能性があり、血圧上昇作用や、血管収縮作用等

の活性を持つ可能性が高い。RTECS 検索によると、*m*-synephrine は劇薬基準を超えるデータも示されている。もし、*m*-synephrine 類が入っているとすれば、毒性の強いアルカロイドを含むことになり、専ら医薬品と判断せざるを得ない。一方、synephrine を含むことが判つていても、これまでの食経験からオレンジピールの様に食品として認められているものも存在する。また、同じミカン科の植物由来で、温州ミカンの皮であるチンピヤ、タチバナの葉・果皮について、非医として認めており、植物の類似性を考えると、食薬区分については、今後、十分な議論が必要なものと考えられた。化学物質の *N*-アセチルシステインは、気道粘液溶解剤や中毒解毒薬として、医療用医薬品として使用されており、専ら医薬品としての使用実態があり、また、処方箋医薬品でもある。また、同様の解毒薬で生合成関連成分と考えられるグルタチオンが専ら医薬品であることを考慮すると、本成分も、専ら医薬品に指定すべき成分本質と判断されるべきと考察した。

また、別に、「医薬品の成分本質に関するワーキンググループ」の資料準備についても対応した。

これまで、平成 24 年 7 月 20 日、平成 25 年 1 月 24 日、同 9 月 30 日及び平成 26 年 2 月 21 日に「医薬品の成分本質に関するWG」が開催された。同 WG での議論を元に、平成 25 年 7 月 10 日に、医薬食品局長より「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」（薬食発 0710 第 2 号）が発出され、植物由来物等において、専ら医薬品成分のカバ（全草）から他名のカワカワを削除し、新たに専ら医薬品成分として kawakawa（全草）が指定された。また、その他（化学薬品等）において、ムタプロデナフィル

が専ら医薬品成分に指定された。

C.2 強壯を標榜する健康食品より検出される可能性のある成分の分析法の確立

海外市場では、強壯を標榜する健康食品より、ED 治療薬及びその類似物質とは別に、早漏防止作用や性欲減退改善作用を有する dapoxetine や flibanserin を含有する商品が報告されており、インターネットの普及により、情報、流通のグローバル化が進む現在、海外での有害事例は、多くの場合、日本国内でも発生することが予期されるため、本研究では、これらの成分について、LC-PDA-MS による分析法について検討した。その結果、ウデナフィルの分析法として厚生労働省通知された分析条件において、両化合物とも担体に十分に保持され、シルデナフィルとタダラフィルの中間の保持時間で溶出し、容易に疑似分子イオンピークを提示することが判明した。また、ED 治療薬関連物質と、クロマトグラム上良好に分離することが確認された。

昭和 46 年の薬務局長通知、「無承認無許可医薬品の指導取り締まりについて」における「医薬品の範囲に関する基準」は順次改訂され、監視業務が強化された結果、痩身用製品への医薬品成分の混入は激減し、強壯用製品についても、店頭販売のものから検出されるケースは、少なくなってきた。その一方で、インターネットを介して販売される強壯用製品からは、依然として ED 治療薬及びそれらの類縁体が検出されている。この 3 年、国内市場からの新規 ED 治療薬類縁体の報告は無いものの、海外市場では、依然として、新規の ED 治療薬類縁体の検出が報告されている。現在、当所で行っている痩身用健康食品中の ED 治療薬及び

その類縁体の分析業務は、厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課長通知、「ウデナフィルの分析方法について」（平成 19 年 8 月 22 日、薬食監麻発第 0822010 号）に記載の方法に基づいて行われている。このものは、地方衛研での試験業務等を念頭に、汎用の LC-MS を用いた方法を提示しているが、現在では、より分離能の高い、UPLC が普及しつつあることから、本研究では、UPLC-MS を用いた ED 治療薬及びその類縁体の分析法について、検討を行った。Vardenafil と homosildenafil, hydroxyhongenafil 及び tadalafil と xanthoantrafil は、分子式が同一（それぞれ、MW 488, 389）のため、カラム分離することが必須となるが、UPLC-PDA-MS を用いた方法を検討した結果、いずれの化合物も良好に分離、検出され、化合物群の中で、最も保持時間の長い imidazosagatriazinone でも、5 分以内に溶出され、既存の方法に比べ、分析時間を 1/5 に短縮した分析系の構築が出来た。

また、海外で検出された新規の ED 治療薬類縁体の内、標品の入手が可能であった propoxyphenyl sildenafil 及び hydroxythiovardenafil について、LC-PDA-MS による分析法について検討を行った。その結果、ウデナフィルの分析法として厚生労働省通知された分析条件において、両化合物とも担体に十分に保持され、容易に疑似分子イオンピークを提示することが判明した。また、ED 治療薬関連物質と、クロマトグラム上良好に分離することが確認された。

C.3 専ら医薬品センプクカ及びドモッコウの基原と成分分析

専ら医薬品に指定されているものの、成分情

報と基原種の関係が明確でないセンプクカ及び、同属で専ら医薬品に指定されているドモッコウ *Inula helenium* (土木香, elcampane) について、日本で入手可能な試料について、核 rDNA の ITS 領域について遺伝子解析を行ったところ、センプクカは従来考えられていた *Inula britannica* とは、10 塩基違っており（相同性 93%）、最も近い配列は 3 塩基の違いである *Inula japonica* (*I. britannica* subsp. *japonica*) であった。一方、ドモッコウの ITS 配列は、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) に登録されている *I. helenium* の ITS 配列 4 つのうち、3 つの配列と完全に一致し、残る 1 つの配列とも ITS1, ITS2 領域とも、各 2 塩基の違いで一致した。上記の結果から、本研究で塩基配列解析に供したセンプクカの基原植物は、*I. japonica*、ドモッコウの基原植物は、*I. helenium* であると同定された。

次に、センプクカの指標成分単離を目的に日本市場品 (*Inula japonica*) より、セスキテルペンラクトンの単離を行い、5 種の既知セスキテルペンラクトン (8-*epi*-ivangustin, 6-*O*-(2-methylbutyloyl)britannilactone, 6-*O*-isobutyloylbritannilactone, britannilactone, 1-*O*-acetylbritannilactone, 及び 1 種の未知化合物 (未同定) を単離した。次にこれらの化合物を標品として、コアシェルカラムを利用して LC/MS 分析を行った。その結果、既報の分析法に比べ、分析時間を 3 分の 1 程度まで短縮する条件を設定することが可能であった。次いで、本法を用いて、日本及び米国市場で流通するセンプクカ製品の分析を行った結果、日本市場の 2 製品は、同じプロファイルを示したが、米国市場品とは、や

や異なったパターンを示した。この要因としては、米国市場品の基原植物が異なっている (*Inula britannica* である可能性が考えられる)、あるいは、エキス粉末であることから、加工過程での成分変化などが考えられた。一方、*I. helenium* を基原とする elecampane (土木香、ドモッコウ) は、全く異なった成分パターンを示した。また、センブリ由来のセスキテルペンラクトンで、強い細胞毒性及びアポトーシス誘導活性が報告されている neobritannilactone B 及びそのアセチル化体は、認められなかった。

次に、前述した基原の明確な生薬ドモッコウ (*I. helenium* の根) について、食薬区分の妥当性確認のために成分探索を行ったところ、1 種の新規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。セスキテルペンアルカロイドについては、絶対構造を決定するため、既知化合物である isohelenin に L-プロリンまたは D-プロリンをそれぞれ反応させ、生成物との各種機器データを単離物と比較し、最終的に、L-プロリンとの反応生成物である

(R)-1-(((3S, 3aR, 4aR, 8aR, 9aR)-5-methylene-2-oxododecahydronaphtho[2, 3-b]furan-3-yl)methyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid と決定した。本生薬は、アルカロイドを含有し、また単離されたセスキテルペンラクトン類も様々な生理活性を有することから、引き続き食薬区分上 “専ら医薬品” として対応することが適切であるものと考えられた。

C.4 東南アジア市場に流通するシャタバリの基原植物種

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 asparagine A の単離が報告されているが、我々による、これまでの研究から、*A. racemosus* から asparagine A は検出されないことが明らかになっている。従って、これまでの単離の報告は、asparagine 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ている。本研究では、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大学関係者を通じて入手し、平成 23 年度に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。

C.5 オオイタドリ中のアントラキノン類およびレスベラトロールの定量分析

イタドリ *Polygonum cuspidatum* は、寿命延長作用や抗動脈硬化作用を有するとされるレスベラトロールを含有し、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エ

モジン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、薬事法の下で規制している。今般、健康食品として流通するオオイタドリ *P. sachalinense* の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ことから、オオイタドリのアントラキノン類含量について調べる必要がある。しかし、既報の *Polygonum* 属植物のアントラキノン類の分析法は、HPLC によるため分析時間が長く、また、各ピークの特異性にもやや疑問があるため、本研究では、LC/MS を用いたオオイタドリの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の開発を検討した。その結果、レスベラトロール及び8種のアントラキノン類の標準品を約 10 分以内に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。また、それぞれの標準品における真度及び精度は概ね良好であった。

本分析法を用い、オオイタドリ中のアントラキノン類およびレスベラトロールの定量を行った。オオイタドリの葉および茎からは、resveratrol (RV), emodin-8-*O*- β -D-glucoside (EMG), emodin (EM), rhein (RH), physcion (PH) が検出された。一方で、オオイタドリの根からは、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したものは全体的に AQ 類および RV の含量が少なかった。

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。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。

C.6 遺伝子情報に基づく *Sida* 属植物の基原種解析

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ところ、世界の植物園において、*Sida* 属植物の同定は、混乱していることが明らかになった。そこで、同植物の食薬区分の検討に際しては、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こととされ、組織形態学的検討を行った。*Sida* 属植物の利用部位として最も多用される葉について、いかなる時期の採集品でも観察可能な固定的な組織形態学的特徴を見出す目的で、葉における毛茸について観察した。*S. cordifolia* 及び *S. rhombifolia* ではアオイ科植物に特有な星状毛が観察され、その分布量と密度、構成する剛毛の本数、1 箇所から

叢生する剛毛の本数において種間差は多少認められたが、同一種内では季節の変動をほとんど示さなかった。一方、*S. hermaphrodita* では同じ個体に由来する葉でも星状毛の分布が認められない株や、葉の腺毛に多様さがあるなど、変異が大きいことが明らかになった。とっくり状の腺毛は、*S. cordifolia* および *S. rhombifolia* で認められ、その分布量において季節的消長が認められた。すなわち盛夏以降、向軸面ではこの形態の腺毛が観察されず、背軸面でも減少傾向にあった。ただし背軸面では分布量は減るが、すべて脱落、消失することはなく一定の割合で残存していた。以上より、*Sida* 属植物の葉を組織形態学的に鑑別する場合はサンプリング部位として葉の背軸面の表面視による、とっくり状の腺毛の観察、検出が有用であることが示された。同時にアオイ科植物特有の星状毛を併せて見出すことにより、植物乾燥品もしくは葉由来の商品が流通した際に、当該試料がアオイ科 *Sida* 属植物由来と同定しうる可能性が示唆された。

また、茎の組織形態学的検討を行ったところ、*S. cordifolia* マルバキンゴジカの基部において、最外層は周皮からなるが、まれに表皮が残存し、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 が認められた。また、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しており、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た。さらに、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 になり、二次師部の師部繊維は 3 細胞列のものが多く、最大 8 細胞列を形成していた。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 。髄は柔細胞からなり、時に厚壁化していた。

一方、*S. cordifolia* の枝元においては、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、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た。師部の最外層には pericyclic fibers が認められるものの、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り、一次放射組織も形成途上で 1 細胞列のものが認められた。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。

S. rhombifolia キンゴジカの基部において、最外層は周皮からなるが、まれに表皮が残存し、周皮を形成するコルク層は 7~10 層で、師部の最外層には pericyclic fibers が認められた。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し、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た。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、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、最大 13 細胞列を形成していた。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 。髄は柔細胞からなり、時に厚壁化していた。

C.7 バンレイシ科植物の成分分析と活性

バンレイシ科植物であるトゲバンレイシは Soursop とよばれ、その葉を一部カリブ海沿

岸地方で茶として飲用している。時としてこの葉の茶としての飲用が非典型的 Parkinson 病的症状を呈することとの関連が示唆されている一方、インターネット上では健康食品としての販売も確認されている。そこで、本植物の葉の成分の検討を行った。その結果、新規アポルフイン系アルカロイド及び、既知アルカロイド (*S*)-norcorydine, (*R*)-anonaine, (*R*)-4'-methylcoclaurine, (*R*)-*O*, *O*-dimethylcoclaurine を単離同定した。また、annoionols A-C と命名した新規メガスティグマン及び annoionoside と命名したその配糖体を得た。今回単離したアルカロイド類は、全て tetrahydrobenzylisoquinoline (TBQ) 骨格を有しているが、TBQ は Parkinson 病の発症で脳内に増加すると言われている。また、(*R*)-anonaine には褐色細胞腫由来の PC12 のチロシン水酸化酵素を阻害して dopamine の産生を抑制する活性が知られており、別に今回の研究からヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に対しても阻害活性があることが判明している。これらの結果を考え合わせると、今回トゲバンレイシ葉から単離したアルカロイド類が、同植物の突発性 Parkinson 病様症状発症に何らかの関連がある可能性が高いと考える。また、本品は、このように有害なアルカロイド類を含むため、専ら医薬品として規制すべきものと考察する。

一方、同科植物であるイランイランノキ (*Cananga odorata* var. *odorata*) の葉について、擬似的 Parkinson 病を引き起こす成分等の検索を行った。その結果、3 種の新規リグナン化合物及び、7 種の既知化合物を単離同定した。TBQ は、イランイランノキの葉のメタノール抽出物を酢酸エチル及びブタノールで分配したうちのブタノール画分から同様の化合物は単離さ

れなかった。

さらに、同科植物であるバンレイシ (*Annona squamosa*) の葉について、擬似的 Parkinson 病を引き起こす成分等の検索を行った。その結果、ニトロ基を持つフェノール化合物の配糖体として 2 種の新規化合物、及び、10 種の既知化合物が単離同定されたが、バンレイシの葉のメタノール抽出物を酢酸エチル及びブタノールで分配したうちのブタノール画分を成分検索の対象としたが、この画分からは TBQ は単離されなかった。

D. 結論

本研究は、厚生労働省の基準（医薬品の範囲に関する基準）に直接対応した研究である。新規に「専ら医薬品」であるかどうか判断が求められた品目について、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」のための調査を遂行するとともに、既存の専ら医薬品リスト並びに、非医薬品リストの様々な項目について、同課の依頼に基づき検討を行った。本研究の成果は、厚生労働省において食薬区分の見直しを検討するための厚生労働行政上重要な基礎資料となるものであり、平成 13 年 3 月 27 日付医薬発第 243 号厚生労働省医薬局長通知で、「リストについては、科学的な検証に基づき定期的に見直しを行うこととし、概ね一年程度の期間毎に追加、訂正、削除等を行うこととする」とした、現行の「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」の見直し作業に貢献するものである。

また、海外で強壯を標榜する健康食品から検出が確認されている dapoxetine 及び flibanserin の分析法について確立し、インタ

ーネットを介して販売される強壯用製品から依然として検出される ED 治療薬及びそれらの類縁体について、既存の方法に比べて 1/5 に分析時間を短縮した分析法を確立した。さらに、強壯用健康食品への添加が危惧される新規 ED 治療薬アナログ propoxyphenyl sildenafil 及び hydroxythioildenafil について各種機器分析データ及び分析法をまとめた。

さらに、食薬区分の判断のメルクマールとなる成分として、ドモッコウから、新規セスキテルペンアルカロイド、トゲバンレイシから、新規アポルフィン系アルカロイド、イランイランノキの葉より新規リグナン化合物、そして、バンレイシの葉よりニトロ基を持つフェノール化合物配糖体を単離構造決定した。また、オオイタドリに含有されるアントラキノン類の分析において、LC/MS を用い、HPLC による既報の分析法と比較して、分析時間を 3 分の 1 程度に短縮する分析法を確立し、オオイタドリに含有されるアントラキノン類の定量分析を行った。その結果、オオイタドリには、使用部位によらずエモジンが最も多く含有され、また、本州産より北海道産の方がアントラキノン類を多く含有していた。オオイタドリ含有健康食品において、エモジンの含量は材料植物における含量を比較して極めて低かったが、産地の違い等によりオオイタドリのエモジン含量には著しい多様性があることから、安全性確保のためには、原材料の選別、あるいは、原材料の時点での成分分析が極めて重要であると考えられた。

また、規制の範囲を確認する目的で、日本で流通するセンブクカは、*I. britannica* でなく、*I. japonica* であることを確認し、米国流通品とは、種が異なる可能性があることを示した。

さらに、バングラディッシュ市場品として日本の大学研究者が入手したシャタバリは、*Asparagus racemosus* ではなく、*Stemona* 属植物であることを示した。*Sida* 属植物では、世界の植物園においても、種の同定について混乱が起きていることが確認され、*Sida* 属植物の組織形態学的な鑑別について検討したところ、葉及び茎を観察の対象とすることにより、鑑別の確度を上げる可能性が示された。

これらの研究成果は、厚生労働省における「医薬品の成分本質に関するワーキンググループ」での議論に反映され、平成 25 年 7 月 10 日に、医薬食品局長より「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」（薬食発 0710 第 2 号）が発出された。

以上、本研究は、厚生労働省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、厚生労働省の健康危機管理に直結するものは、迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知された。また、食薬区分の判断等、様々な形で施策に反映されている。

E. 健康危機情報

トゲバンレイシ葉には、パーキンソン病類似症状を誘発する可能性の高いアルカロイド類が含まれており、クラビオラ等の名称で販売されている健康食品には注意を要する。

F. 研究発表等

論文発表等

- 1) Matsushige, A., Kotake, Y., Matsunami, K., Otsuka, H., Ohta, S., Takeda, Y., Annonamine, a new aporphine alkaloid

- from the leaves of *Annona muricata*. Chem. Pharm. Bull. **60**, 257-259 (2012).
- 2) Matsushige, A., Matsunami, K. Kotake, Y., Otsuka, H., Ohta, S., Three new megastigmanes from the leaves of *Annona muricata*. J. Nat. Med. **66**, 284-291 (2012).
 - 3) 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. **26**, 783-786 (2012).
 - 4) Wakana, D., Maruyama, T., Kamakura, H., Sugimura, K., Iida, O., Kanai, T., Yamaji, S., Kimura, T., Chao-Ying, L. and Goda, Y., Surveying studies on the botanical source of the herbal materials sold as *Sida* products based on the genetic and the microscopic features. Jpn. J. Food Chem. Safety, **19**, 111-118 (2012).
 - 5) Goda, Y., Quality assurance of natural products, Miscellaneous thoughts from the fact that Shatavari does not contain alkaloid asparagamines. Foods & Food Ingredients Journal of Japan, **217**, 380-381 (2012).
 - 6) 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).
 - 7) Zaima, K., Saisho, K., Maruyama, T. and Goda, Y.: LC-PDA-MS analysis of dapoxetine and flibanserin. Jpn. J. Food Chem. Safety, **20**, 119-123 (2013).
 - 8) Wakana, D., Kawahara, N. and Goda, Y.: Two new pyrrolidine alkaloids, codonopsinol C and codonopiloside A, isolated from *Codonopsis pilosula*. Chem. Pharm. Bull., **61**, 1315-1317 (2013).
 - 9) Kawakami, S., Toyoda, H., Matsunami, K., Otsuka, H., Shinzato, T., Takeda, Y., Kawahata, M., and Yamaguchi, K.: Eight new diterpenoids and two new nor-diterpenoids from stems of *Croton cascarilloides*. Chem. Pharm. Bull., **61**, 411-418 (2013).
 - 10) Maruyama, T., Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y.: Botanical origin of dietary supplements labeled as "kwao keur", a folk medicine from Thailand, J. Nat. Med., **68**, 220-224 (2014).
 - 11) Goda, Y.: Analysis and identification of illegal constituents in health food products implicitly advertizing tonic or slimming effect in the National Institute of Health Sciences in Japan. Yakugaku Zasshi, **134**, 197-202 (2014).
 - 12) Zaima, K., Wakana, D., Demizu, Y., Kumeta, Y., Kamakura, H., Maruyama, T., Kurihara, M. and Goda, Y.: Isoheleproline, A New Amino Acid-Sesquiterpene Adduct, from *Inula helenium*. J. Nat. Med., **68**, 432-435 (2014).

- 13) 合田幸広：健康食品の品質に関する話題。
日本食品安全協会年報， 9， 55-62 (2014).
- 14) 合田幸広：機能性表示制度で求める品質保証。Food Style 21， 18(11)， 8-9 (2014).
- 15) 合田幸広：食品の新たな機能性表示制度が薬業界に与える影響，成否の鍵はエビデンス，エビデンス公開，品質保証，Drug Magazine， 58(1)， 20-24 (2015).
- 16) 合田幸広，食薬区分と無承認無許可医薬品，漢方薬・生薬認定薬剤師講座テキスト，第4版，日本薬剤師研修センター， in press (2015).
- 学会発表等
- 1) 合田幸広，「ニセ薬と指定薬物の話，痩身や強壮などを標榜する健康食品や違法薬物からの医薬品成分等の分析と同定」，名古屋市立大学薬学部講義 (2012. 6， 東京).
- 2) 最所和宏，花尻 (木倉) 瑠理，合田幸広，「平成 15～23 年度における強壮用健康食品買い上げ調査において検出された無承認無許可医薬品」，日本食品化学学会第 18 回学術大会・総会 (2012. 6， 函館).
- 3) 若菜大悟，出水庸介，鎌倉浩之，栗原正明，奥田晴宏，合田幸広，「強壮を標榜する健康食品から単離されたプロドラッグタイプの ED 治療薬類似物質 mutaprodenafil の構造」，日本食品化学学会第 18 回学術大会・総会 (2012. 6， 函館).
- 4) 浦山豊弘，肥塚加奈江，赤木正章，山本淳，鎌倉浩之，合田幸広，「健康食品からの医薬品成分検出事例について」，第 58 回中国地区公衆衛生学会 (2012. 8， 岡山).
- 5) 菅谷京子，角野文代，黒崎かな子，鎌倉浩之，合田幸広，「健康食品から医薬品成分類似物質を検出した事例について」，第 50 回栃木県公衆衛生学会 (2012. 9， 宇都宮).
- 6) 合田幸広，「食薬区分と違法ドラッグ」，漢方薬・生薬認定薬剤師研修会 (2012. 9， 東京).
- 7) 在間一将，若菜大悟，糸田幸恵，鎌倉浩之，袴塚高志，合田幸広，足立理絵子，神谷 洋，川崎武志，「センブリ由来セスキテルペンラクトンの分析法の開発と基原植物について」，日本生薬学会第 59 回年会 (2012. 9， 木更津).
- 8) 合田幸広，「食薬区分と生薬」，東京農工大学工学部生命工学科講義 (2012. 10， 東京).
- 9) 合田幸広，「「健康食品」の分析から判る品質に関する課題」，第 27 回健康食品フォーラム (2012. 10， 東京).
- 10) Goda, Y., "Borderline of pharmaceuticals to foods (non-pharmaceuticals) in Japan", The 1st International Conference on Pharma and Food (2012. 11, Shizuoka).
- 11) 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. 3， 横浜).
- 12) 大崎愛弓，小宮山哲平，小沢正晃，Samir Ksadhu, Ahmed Firoj, 糸田幸恵，袴塚高志，合田幸広，影近弘之，石橋正己，「シヤ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. 3， 横浜).
- 13) 米本 愛，玉川恵香，山路誠一，伏谷真二，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. 3， 横浜).

- 14) 玉川恵香, 米本 愛, 山路誠一, 伏谷真二, 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. 3, 横浜).
- 15) 合田幸広, 「国立衛研における瘦身や強壯を標榜する健康食品中の医薬品成分の分析と同定」, 日本薬学会第 133 年会 (2013. 3, 横浜).
- 16) 勝井美果, 杉本 幸子, 松浪 勝義, 大塚英昭 イランイランノキ (*Cananga odorata* var. *odorata*) の新規リグナン誘導体研究 日本薬学会第 133 年会, 札幌 (2013. 3).
- 17) Saisho, K., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y.: “Survey of the emergence of erectile dysfunction medicines and their related compounds adulterated to health food products in Japan for the last decade” 51th Annual meeting of International Association of Forensic Toxicologists Funchal, Madeira Is., Portugal (2013. 9).
- 18) 在間一将, 最所和宏, 丸山卓郎, 合田幸広, Dapoxetine および Flibanserin の LC-PDA-MS 分析, 日本食品化学学会第 19 回総会学術大会, 名古屋 (2013. 8).
- 19) 合田幸広, 食薬区分と違法ドラッグ, 漢方薬・生薬認定薬剤師研修会, 東京 (2013. 9).
- 20) 合田幸広, 食薬区分と生薬, 東京農工大学工学部生命工学科講義, 東京 (2013. 11).
- 21) 合田幸広, 分析から判る, 健康食品の品質に関する課題, 生薬分析討論会, 大阪 (2013. 11).
- 22) 合田幸広, 分析から判る健康食品の品質の問題点, 健康ジャーナルセミナー, 東京 (2014. 2).
- 23) 浅沼舞, 山路誠一, 伏谷真二, 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, 熊本 (2014. 3).
- 24) 合田幸広, 生活に即した薬学「レギュラトリーサイエンス」の実践, 健康食品の品質とニセ薬の話を中心に, 星薬科大学早期体験学習講義, 東京 (2014. 4).
- 25) 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).
- 26) 合田幸広, 健康食品の品質に関する課題, 健康食品企業に望むこと, 健食原料・素材・OEM展 2014, 東京 (2014. 5).
- 27) 合田幸広, 健康食品を巡る問題について, 日本食品安全協会教員研修会, 東京 (2014. 7).
- 28) 合田幸広, 食薬区分と違法ドラッグ, 漢方薬・生薬認定薬剤師研修会, 東京 (2014. 9).
- 29) 合田幸広, 健康食品の新たな機能性表示と健康食品の品質, ヘルスライフビジネス講演会, 東京 (2014. 9).
- 30) 合田幸広, 新しい機能性表示と健康食品の品質, 日本食品化学新聞社講演会, 東京 (2014. 9).
- 31) 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).
- 32) 合田幸広, 健康食品の新しい機能性表示と品質に関する課題, 茨城県薬剤師会検査セ

- ンター研修会, 水戸 (2014. 10).
- 33) 合田幸広, 新しい機能性表示と健康食品の品質, 日本食品化学学会第 30 回食品化学シンポジウム, 大阪 (2014. 10).
 - 34) 合田幸広, 新しい機能性表示と健康食品の品質に関する課題, 参議院議員内学習会, 東京 (2014. 10).
 - 35) 合田幸広, 新しい機能性表示と健康食品の品質に関する課題, 日本食品工業倶楽部講演会, 東京 (2014. 11).
 - 36) 新谷彰教, 山下弘実, 塩見美乃, 前原加奈, 松山のぞみ, 稲垣昌宣, 大塚英昭 熱帯産植物バンレイシ (*Annona squamosa*) 葉部の成分研究 第 53 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 広島 (2014. 11).
 - 37) 合田幸広, 食薬区分と生薬, 東京農工大学工学部生命工学科講義, 東京 (2014. 12).
 - 38) 合田幸広, 危険ドラッグと NMR を用いた構造決定, 東京大学・日本電子産学連携第 40 回 NMR ユーザーズミーティング, 東京 (2014. 12).
 - 39) 合田幸広, 健康食品の新しい機能性表示と品質に関する課題, 表示・起源分析技術研究懇談会第 12 回講演会, 東京 (2015. 1).
 - 40) 合田幸広, 健康食品の問題点と新たな機能性表示制度に係る食品メーカーへの提言, 新食品会第 4 回例会, 東京 (2015. 3).
 - 41) 榎 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, 神戸 (2015. 3).
- 報道発表等
- 1) 平成 23 年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について (2012 年 6 月 22 日) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課 <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002dk5t.html>
 - 2) 平成 24 年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について (2013 年 10 月 22 日) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課 <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000027121.html>
 - 3) 健康食品 品質は大丈夫?, 朝日新聞朝刊, 2014 年 5 月 29 日
 - 4) 機能性表示を行う上で考慮すべき, 現在の健康食品の抱える問題点, NHK 総合テレビ「おはよう日本」, 2014 年 7 月 19 日
 - 5) 健康食品表示「目に効く」OK (解説スペシャル), 読売新聞朝刊, 2014 年 8 月 2 日
 - 6) 新制度検討会委員に聞く (夏季特別インタビュー), ヘルスライフビジネス, 2014 年 8 月 15 日
 - 7) 健康食品でシンポ, 薬事日報, 2014 年 10 月 27 日
 - 8) ニュースな科学, 日本経済新聞朝刊, 2014 年 12 月 12 日

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Matsushige, A.他	Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of <i>Annona muricata</i>	Chem. Pharm. Bull.	60	257-259	2012
Matsushige, A.他	Three new megastigmanes from the leaves of <i>Annona muricata</i>	J. Nat. Med.	66	284-291	2012
Abbaskhan, A.他	Biological activities of Indian celery, <i>Seseli diffusum</i> (Roxb. ex Sm.) Sant. & Wagh	Phytother. Res.	26	783-786	2012
Wakana, D.他	Surveying studies on the botanical source of the herbal materials sold as the <i>Sida</i> products based on the genetic and the microscopic features なお、本論文は、同誌編集委員会より2012年優秀論文に選定された。	Jpn. J. Food Chem. Safety	19	111-118	2012
Goda, Y.	Quality assurance of natural products, Miscellaneous thoughts from the fact that Shatavari does not contain alkaloid asparagamines	Foods & Food Ingredients Journal of Japan	217	380-381	2012
Zaima, K.他	LC-PDA-MS analysis of dapoxetine and flibanserin	Jpn. J. Food Chem. Safety	20	119-123	2013
Kumeta, Y.他	Chemical analysis reveals botanical origin of shatavari products and confirms of absence of alkaloid asparagamine A in <i>Asparagus racemosus</i>	J. Nat. Med.	67	168-173	2013
Wakana, D.他	Two new pyrrolidine alkaloids, codonopsinol C and codonopiloside A, isolated from <i>Codonopsis pilosula</i>	Chem. Pharm. Bull.	61	1315-1317	2013
Kawakami, S.他	Eight new diterpenoids and two new nor-diterpenoids from stems of <i>Croton cascarilloides</i>	Chem. Pharm. Bull.	61	411-418	2013
Maruyama, T.他	Botanical origin of dietary supplements labeled as “Kwao Keur”, a folk medicine from Thailand	J. Nat. Med.	68	220-224	2014
Zaima, K.他	Isoheleproline: a new amino acid-sesquiterpene adduct from <i>Inula helenium</i>	J. Nat. Med.	68	432-435	2014

総説

Goda, Y.	Analysis and identification of illegal constituents in health food products implicitly advertizing tonic or slimming effect in the National Institute of Health Sciences in Japan.	Yakugaku Zasshi	134	197-202	2014
合田 幸広	健康食品の品質に関する話題	日本食品安全協会年報	9	55-62	2014
合田 幸広	機能性表示制度で求める品質保証	Food Style 21	18(11)	8-9	2014
合田 幸広	食品の新たな機能性表示制度が薬業界に与える影響、成否の鍵は「エビデンス」「エビデンス公開」「品質保証」	Drug Magazine	58(1)	20-24	2015
合田 幸広	食薬区分と無承認無許可医薬品	漢方薬・生薬認定薬剤師講座テキスト	第4版	in press	2015

新聞報道

健康食品 品質は大丈夫？	朝日新聞朝刊	5月29日	2014
機能性表示を行う上で考慮すべき、現在の健康食品の抱える問題点	NHK総合テレビ 「おはよう日本」	7月19日	2014
健康食品表示「目に効く」OK(解説スペシャル)	読売新聞朝刊	8月2日	2014
新制度検討会委員に聞く(夏期特別インタビュー)	ヘルスライフビジ ネス	8月15日	2014
健康食品でシンポ	薬事日報	10月27日	2014
ニュースな科学	日本経済新聞 朝刊	12月12日	2014

Annonamine, a New Aporphine Alkaloid from the Leaves of *Annona muricata*

Ayano Matsushige,^a Yaichiro Kotake,^a Katsuyoshi Matsunami,^b Hideaki Otsuka,^{*b} Shigeru Ohta,^a and Yoshio Takeda^c

^aDepartment of Xenobiotic Metabolism and Molecular Toxicology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University; ^bDepartment of Pharmacognosy, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University; 1–2–3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734–8553, Japan; and ^cFaculty of Pharmacy, Yasuda Women's University; 6–13–1 Yasuhigashi, Asaminami-ku, Hiroshima 731–0153, Japan.

Received September 7, 2011; accepted December 4, 2011; published online December 12, 2011

Atypical Parkinsonism in the Caribbean Island Guadeloupe is thought to be associated with the consumption of plants of the Annonaceae family, especially *Annona muricata* (sour sop). In this study, a new aporphine alkaloid named annonamine (1) was isolated from the leaves of *A. muricata* L. together with four known benzyloquinoline alkaloids (2–5). The structures of the isolated compounds were elucidated by the spectroscopic method.

Key words *Annona muricata*; Annonaceae; aporphine; alkaloid; annonamine

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder. Over ten genes have been identified as causes of familial PD so far.¹⁾ However, in the case of idiopathic PD (accounting for over 90% of PD cases), endogenous and/or exogenous environmental factors are believed to be crucial for the onset of symptoms.^{2,3)} In 1999, Caparros-Lefebvre *et al.* suggested the high prevalence of atypical Parkinsonism in the Caribbean Island Guadeloupe was linked with consumption of Annonaceous fruits and herbal tea prepared from *Annona muricata* and *A. squamosa*.⁴⁾ In 2005, Höglinger *et al.* described the neurotoxic effects of annonacin, the most abundant acetogenin in *A. muricata*, which inhibited the complex I of the mitochondrial respiratory chain.⁵⁾ On the other hand, we have previously identified 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ) alkaloids as one of the endogenous neurotoxins that could induce PD in an animal model.⁶⁾ In this study, we have phytochemically investigated the leaves of the title plant in detail to characterize the chemical constituents especially on alkaloids, because the leaves of *A. muricata* are used as tea for cardiotonics and it has been known that *A. muricata* produced benzyloquinoline type alkaloids.^{7,8)} The present study describes the isolation and structural elucidation of a new aporphine alkaloid, annonamine (1) together with four known alkaloids (2–5). The neurotoxicities of these compounds (1–5) were also investigated against human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y.

Air-dried leaves of *A. muricata* were extracted with MeOH three times by maceration. The combined MeOH extract was evaporated and partitioned with *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc and 1-BuOH successively to give *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc and 1-BuOH-soluble fractions, respectively. CHCl₃ and EtOAc-soluble fractions were combined because of the similarity of TLC pattern. The residue of 1-BuOH-soluble fraction and the combined mixture of CHCl₃ and EtOAc-soluble fractions were subjected to various kinds of column chromatography (CC) to yield five alkaloids (1–5) (Fig. 1).

Annonamine (1) was obtained as a colorless amorphous powder and the high-resolution electrospray-ionization time-of-flight mass spectroscopy (HR-ESI-TOF-MS) provided the positive-ion peak at *m/z*=296.1644, which was corresponding

to C₁₉H₂₂NO₂. The IR absorption at 3360 cm⁻¹ indicated the presence of hydroxy group. In the ¹³C-NMR spectrum, 12 *sp*² carbon signals were ascribable to two aromatic rings. The substitution manners of each ring were determined by a coupling pattern analysis of five aromatic protons, of which a singlet aromatic proton (δ_{H} 6.78), and four *ortho*- and *meta*-coupled protons (δ_{H} 8.32, 7.40, 7.37, 7.31) suggested the presence of penta-, and *ortho*-disubstituted aromatic rings, respectively (Table 1). Three downfield-shifted singlet methyl groups (δ_{H} 3.62 on δ_{C} 60.8, δ_{H} 3.42 on δ_{C} 54.2, and δ_{H} 3.08 on δ_{C} 43.8) were attributable to the *O*-methyl, *O*- or *N*-methyl, and *N*-methyl groups, respectively. In the heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) spectrum, δ_{H} 3.42 and δ_{H} 3.08 were correlated with each other, which indicated the both methyl groups (δ_{H} 3.42 on δ_{C} 54.2 and δ_{H} 3.08 on δ_{C} 43.8) were connected to the same hetero atom, *i.e.* nitrogen (Fig. 2). In addition, these two methyl groups were also correlated with both δ_{C} 70.8 and δ_{C} 62.8, which unveiled the presence of a quaternary amine in its structure (Fig. 2). The other methoxy group (δ_{C} 60.8) must be located on C-1, because of the relatively downfield-shifted chemical shift value caused by a steric effect of *ortho*-disubstitution. The contiguities of the remaining two methylenes (δ_{C} 62.8, 24.7), and a methylene and a methine (δ_{C} 70.8, 30.9) groups were also elucidated

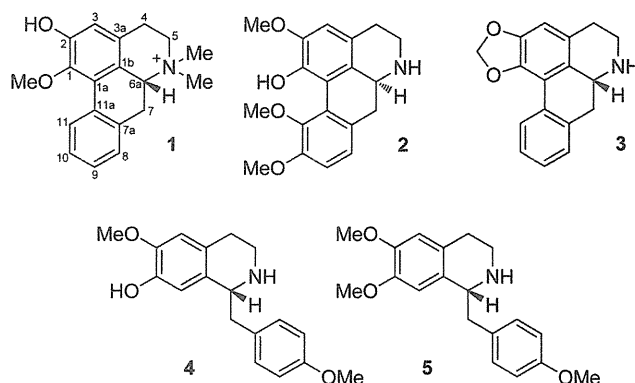


Fig. 1. Structures of the Isolated Alkaloids

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: hotsuka@hiroshima-u.ac.jp

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR Data for **1**

	C	H
1	146.9	—
1a	128.6	—
1b	120.2	—
2	152.9	—
3	116.5	6.78 s
3a	126.2	—
4	24.7	α^* 3.02 m β^* 3.34 m
5	62.8	α^* 3.79 ddd (13, 7, 1) β^* 3.73 td (13, 5)
6a	70.8	4.56 dd (14, 4)
7	30.9	α^* 3.05 m β^* 3.37 m
7a	133.5	—
8	129.4	7.40 d (7)
9	129.5	7.31 td (7, 1)
10	129.2	7.37 brt (8)
11	129.1	8.32 dd (8, 1)
11a	132.5	—
O-Me	60.8	3.62 (3H, s)
N ⁺ -Me α^*	43.8	3.08 (3H, s)
N ⁺ -Me β^*	54.2	3.42 (3H, s)

Measured in CD_3OD . δ in ppm. *The orientations were determined by phase-sensitive nuclear Overhauser exchange spectroscopic analysis.

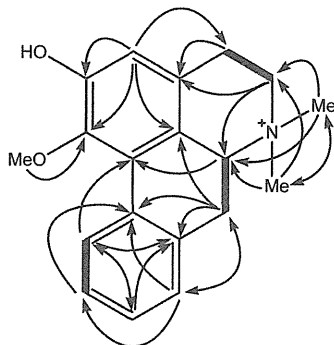


Fig. 2. Important Correlations on COSY (Bold Lines) and HMBC (Arrows)

by double-quantum-filtered ^1H - ^1H correlation spectroscopy (COSY) and hetero-nuclear multiple quantum coherence spectra (Fig. 2). The planer structure was elucidated as shown in Fig. 2 by the detailed analysis of 2D-NMR spectra. Finally, the absolute stereochemistry of C-6a was determined to be *R* by the circular dichroism (CD) spectrum.⁹ Thus, the structure of **1** was elucidated as (*R*)-2-hydroxy-1-methoxy-6,6-dimethyl-5,6,6a,7-tetrahydro-4*H*-dibenzo[*de,g*]quinolin-6-ium.

PD is a common neurodegenerative disorder marked by progressive loss of melanized, catecholamine producing neurons in the midbrain (substantia nigra) and brain stem (locus ceruleus). Therefore, we next evaluated the neurotoxicity against the human neuroblastoma SH-SY5Y which is a well-characterized catecholaminergic cell line often used as a neuronal model in PD research. Among the tested compounds (**1**–**5**), compound **3** was the most active (IC_{50} for **1**: 195.8 ± 17.0 , **2**: 186.6 ± 29.4 , **3**: 34.6 ± 3.5 , **4**: 97.1 ± 11.2 , **5**: $202.9 \pm 9.9 \mu\text{M}$).

In this study, we have successfully isolated a new aporphine alkaloid together with four known benzyloisoquinoline alkaloids from the leaves of *A. muricata*. It is noteworthy that anonaine (**3**) has been reported to inhibit dopamine biosynthesis at $0.05 \mu\text{M}$ by mainly reducing tyrosine hydroxylase activity in rat stable pheochromocytoma cells, PC12.¹⁰ In this study, we presented the moderate neurotoxicity of **3** against SH-SY5Y. Thus, anonaine (**3**) might affect the development of the idiopathic atypical Parkinson's disease in the Caribbean Island Guadeloupe by inhibiting the dopamine biosynthesis at lower dose and by the neurotoxicity at higher dose. We are now planning to investigate the detailed biological function of these alkaloids on the several protein molecules concerning for the development of Parkinson's disease.

Experimental

General Experimental Procedures Silica gel CC was performed on silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany), and reversed-phase [octadecyl silica gel (ODS)] open CC (RPCC) on Cosmosil 75C₁₈-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) ($\Phi=4$ cm, $L=20$ cm). HPLC was performed on ODS (Cosmosil; Nacalai Tesque, Japan; $\Phi=10$ mm, $L=250$ mm), and the eluate was monitored with a refractive index monitor.

Optical rotations were measured on a JASCO P-1030 polarimeter. IR spectrum was measured on a Horiba FT-710 Fourier transform infrared spectrophotometer. UV spectrum was obtained on a JASCO V-520 UV/Vis spectrometer. NMR spectra were taken on a JEOL ECA 600 spectrometer at 600 MHz for ^1H and 150 MHz for ^{13}C , respectively, with tetramethylsilane as an internal standard. Positive-ion HR-ESI-TOF-MS was recorded on an Applied Biosystem QSTAR XL spectrometer. CD spectra were obtained on a JASCO J-720 spectropolarimeter. VersaMax (Molecular Devices, Sunnydale, CA, U.S.A.) was used as a microplate reader.

Plant Material Leaves of *A. muricata* were collected in Okinawa, Japan, in November, 2004, and a voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University (No. 04-a.m.-Okinawa-1105).

Extraction and Isolation The air-dried leaves of *A. muricata* (520 g) were extracted with MeOH (2 L) three times by maceration. The MeOH extracts were combined and evaporated to dryness to afford a viscous gummy material (78.2 g). This residue was suspended in 1.5 L of H_2O and extracted with equal volume of *n*-hexane, CHCl_3 , EtOAc and 1-BuOH successively to afford 13.4, 34.9, 1.1 and 5.0 g of the residues, respectively. The remaining H_2O layer was concentrated to furnish an H_2O -soluble fraction (23.9 g). The 1-BuOH soluble fraction (5.0 g) was applied to a silica gel CC ($\Phi=2.5$ cm, $L=50$ cm) using a stepwise gradient elution with increasing amounts of MeOH in CHCl_3 [CHCl_3 (1 L), CHCl_3 -MeOH (20:1, 750 mL), (10:1, 750 mL), (5:1, 750 mL), and (3:1, 750 mL)], (CHCl_3 :MeOH: H_2O =15:6:1, 750 mL), and (MeOH, 750 mL). The residue (1.13 g) of the CHCl_3 :MeOH: H_2O =15:6:1 eluate obtained on silica gel CC was subsequently purified by HPLC (ODS) with 20% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ trifluoroacetic acid (TFA) to afford **1** (25.8 mg) from the peak at 20.2 min (flow rate: 3.0 mL/min).

The combined residue of CHCl_3 and EtOAc soluble fractions (36.0 g) was applied to a silica gel CC ($\Phi=5.8$ cm, $L=38$ cm) using a stepwise gradient elution with increasing amounts of