

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究

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

カツアバの基原植物に関する研究

国内及びアメリカの市場で流通するカツアバ含有食品に含まれる基原種の推定を目的に、核 rDNA の ITS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、多くの検体で複数の遺伝子配列が確認され、判別が困難であった。次に、*Erythroxylum* 属または *Trichilia* 属に特異的な配列をもとに設計したプライマーを用いて、同領域の塩基配列解析を行った。その結果、アメリカ市場品 7 検体中 6 検体で両方の属と推定される塩基配列が見出された。両者はともにカツアバとして、区別なく用いられている可能性があげられる。一方、国内市場品 6 検体については、これらの属と推定される塩基配列は認められなかった。

協力研究者

後藤 佑斗 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 派遣研究員

植物の同定を行うことにより、カツアバ製品の有害性予測を行うこととした。

A. 研究目的

カツアバはブラジルなどで使用される生薬であり、日本国内においては食薬区分上、非医薬品に分類され、強壮などを目的とする健康食品の原料として流通している。カツアバの基原植物は *Erythroxylum catuaba* とされているが、*Trichilia catigua* を基原植物とする場合もあり、これらが混同されている可能性もある。実際、カツアバ製品を分析して、*T. catigua* と *Erythroxylum* 属植物が混在することを確認した報告がなされており¹⁾、我が国の市場品においても基原植物に関する情報が混乱している可能性がある。また、*Erythroxylum* 属にはコカノキ (*E. coca*) をはじめとして、アルカロイドを含有する種が存在しており、これらがカツアバとして製品中に入っていた場合、摂取した人が健康被害を起す恐れがある。そこで本研究では、国内及びアメリカの市場で流通するカツアバ含有食品の塩基配列解析を行い、基原

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用されたカツアバ製品の詳細を Table 1 にまとめた。このうち、A14 は形状がエキスであるため検討から除外した。成分分析用に用いたセンナは、ウチダ和漢薬 (Lot no.:G4P2971) より購入した。ハネセンナは、医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部より頂いた。Sennoside A (SA) 及び sennnoside B (SB) の標品は、和光純薬工業 (Lot no.:WKK2508 (SA), AWJ5455 (SB)) より購入した。

2. 実験方法

2-1. 塩基配列解析

試料のうち、粉末及びカプセルのものはそのまま使用した。葉を刻んだ状態の J4 と J8 に関しては、試料を MM-300 (Qiagen) により粉碎し、粉末試料を得た。これらの粉末約 20 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. また, 同粉末約 20 mg を DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて, genomic DNA を抽出した.

このものを鋳型とし, 植物の核 rDNA 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより, 目的とする核 rDNA ITS 領域を含む DNA 断片を増幅した. プライマーについては, (1) 共通プライマーとして CS1 と pl-L-CA2' を, (2) *Erythroxylum* 属及び *Trichilia* 属に特異的なプライマーを設計して, Ery-ITS-f と Ery-ITS-r, Tri-ITS-f と Tri-ITS-r を用いた. 各プライマーの位置と配列を Fig. 1 に示した.

PCR は, (1) 共通プライマーを用いた増幅については, Maxwell 16 Instrument で抽出した genomic DNA に対して, BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline)-Ampdirect plus (Shimadzu) 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, 50 cycle; 72°C 7 min. (2) 特異的プライマーを用いた増幅については, DNeasy Plant Mini Kit で抽出した genomic DNA に対して, KOD FX Neo DNA Polymerase (Toyobo) を用いて, 以下の温度プログラムにより行われた: 98°C 2 min; 98°C 10 sec, 60°C 30 sec, 68°C 30 sec, 50 cycle; 68°C 4 min.

得られた PCR 産物を Min Elute 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. 塩基配列解析は, fasmac 社の受託解析により行われた. 得られた塩基配列の多重整列解析は, GENETYX の Multiple Alignment により行った.

2-2. センナ由来成分定性分析

分析条件については, 高橋らの報告²⁾を参

考にした.

各試料 1 g を遠沈管に入れ, 70%メタノール 25 mL を加え 30 分間振とうし, 遠心分離後, 上清を回収した. 残留物に 70%メタノール 25 mL を加え, 同様の操作を繰り返した. 全ての上清を合わせ, 70%メタノールで正確に 50 mL に定容した. ただし, ハネセンナ試料に関しては, 粉末量が不足していたため, 試料・溶液量を全て 1/10 にスケールダウンして抽出を行った. 得られた抽出エキスに対して, 以下の条件で分析を行った: 装置, LCMS-2020 (Shimadzu); 注入量, 2 µL; 分析カラム, Inertsil®ODS-3 (150 x 2.1 mm ID, 3 µm, GL Sciences); オープン温度, 40 °C; 移動相, 0.1%ギ酸水 (A) と 0.1%ギ酸アセトニトリル (B) でグラジエント, 18% B (0-2 min hold) → 19% B (2-15 min hold) → 30% B (15-32 min) → 50% B (32-38 min) → 18% B (38.01 min) → Stop (46 min); 流量, 0.300 mL/min; イオン化, ネガティブモード; キャピラリー電圧, 1.45 kV; ネブライザーガス流量, 1.50 L/min; ドライイングガス流量, 15 L/min; ヒートブロック温度, 200°C; MS データ取得, スキャンモード.

C. 研究結果と考察

1. ITS 塩基配列解析

1-1. 共通プライマーを用いた増幅

A14 を除く試料 13 検体について, ITS 領域の配列を解析した. ただし, A9 については未実施, A13, J3 については, PCR 産物を得ることが出来ず, この 3 検体は解析不能だった. 解析の結果を Table 2 に示した. A5, A10, J1 検体は, 国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank:INSD) に登録されている *Trichilia* 属が最も近い配列候補として挙げられた. その他の検体については, カツアバの基原種とされるものとは異なる種の登録配列が候補として挙げられた. なかでも, J2 ではセンナ (*Senna alexandrina*) が, J6 ではマカ

(*Lepidium meyenii*) が候補として挙げられた。このうち、マカに関しては J6 の製品ラベルで表示がされていた。解析したシーケンス配列について、解析が出来たサンプルの 10 検体中 4 検体で、複数種の増幅による複数配列が見られた。

1-2. 特異的プライマーを用いた増幅

① *Erythroxyllum* 属特異的プライマー

A5, A6, A9, A10, A11, A12 の 6 検体で、予想される塩基長の DNA の明瞭な増幅が見られた (Fig. 2)。得られた PCR 産物について塩基配列解析を行った結果、データベース上の *Erythroxyllum* 属植物と相同性の高い配列が確認された。このうち、A5 を除く 5 検体については同一の配列であったため、これらの配列群は 2 つの遺伝子型に大別された。A5 の配列を genotype-1, A5 を除く 5 検体の配列を genotype-2 と表記した。この 2 種類の配列に対して、blast search program による相同性検索を行った結果、*E. amplifolium* (Acc. no.: DQ787423) が最も相同性の高い配列として挙げられた (Fig. 3)。A13 及び J1 ~ J8 の 7 検体に関しては、予想される塩基長の増幅は見られなかった。

② *Trichilia* 属特異的プライマー

A5, A6, A9, A10, A11, A12 の 6 検体で、予想される塩基長を持つ DNA の明瞭な増幅バンドが見られた (Fig. 4)。得られた PCR 産物について塩基配列解析を行った結果、データベース上の *Trichilia* 属植物と相同性の高い配列が確認された。これらの配列群は *Erythroxyllum* 属特異的プライマーの際と同様に、2 つの配列群に大別された。前者には A5, A9, A10, A12 の 4 検体が含まれ、*T. emarginata* (Acc. no.: LN833662) と最も高い相同性を示した (Fig. 5)。一方、後者には A6, A11 の 2 検体が含まれ、*T. lepidota* (Acc. no.: LN833623) と最も高い相同性を示した (Fig. 6)。しかし、得られた

配列と候補配列との間には、前者では 1~8 塩基、後者では 5~7 塩基の違いが見られ、配列の一致する種を特定することは出来なかった。A13 及び J1~J8 の 7 検体に関しては、予想される塩基長の増幅バンドは見られなかった。

2. センナ由来成分定性分析

各試料に関して、検出波長 366 nm の UV クロマトグラムを Fig. 7 に、MS スペクトルを Fig. 8-10 に示した。センナ由来成分の対象となる物質として、以下の 5 成分の有無について調べた：Sennoside A, B (Mw = 862, 以下 SA, SB と表記, SS, HS の両方で存在する), cassiaphenone-B-2-glucoside (Mw = 480, 以下 CP-Glu と表記, SS, HS の両方で存在する), isorhamnetin-3-*O*-gentiobioside (Mw = 640, 以下 IR-Gtb と表記, SS にのみ存在する), tinnevellin-glucoside (Mw = 408, 以下 Tiv-Glc と表記, SS にのみ存在する)。これらのうち、SA, SB の 2 成分に関しては、標準試料を用いた分析によりピーク同定を行ったが、CP-Glu, IR-Gtb, Tiv-Glu の 3 成分に関しては、各成分に相当する分子量の擬似分子イオンピーク [M-H]⁻ をマスクロマトグラムで確認した推定ピークであった。

分析の結果、SS 試料では、SA, SB の 2 成分と、CP-Glu, IR-Gtb, Tiv-Glu の 3 成分と推定されるピークが検出された (Fig. 7-上段, 8)。一方、HS 試料では、SA, SB の 2 成分と、CP-Glu と推定されるピークが検出されたが、IR-Gtb, Tiv-Glc の 2 成分と推定されるピークは検出されなかった (Fig. 7-中段, 9)。そして、J2 試料では、これらの 5 成分のピークは検出されなかった (Fig. 7-下段, 10)。

D. 考察

検討を通して、A13, J3 の 2 検体に関しては、PCR による増幅を得ることが出来なかった。この原因として、鋳型となる十分な DNA 量が

抽出できていなかった可能性, または DNA の損傷により増幅が起こりにくかった可能性, もしくは検体中に PCR 酵素の阻害物質が含まれていた可能性などが考えられた。

共通プライマーを用いた増幅において, 複数の検体で複数配列が見られた原因として, 製品中の複数の植物種の DNA を増幅している可能性が考えられた。この結果から, 他の検体でも実際には複数の植物種が存在しており, その中から増幅しやすい種の配列が増幅した結果が示されているだけなのではないかと考え, 特異的プライマーを設計し, これらを用いた増幅を行った。

特異的プライマーを用いた増幅の結果, A13 を除くアメリカ市場品 6 検体から *Erythroxylum* 属, *Trichilia* 属両方の属の登録配列が候補に挙げられたことから, 製品中にはこれら両方の属の植物が入っていることが示唆された。この結果から, 材料あるいは加工の段階において, これら 2 つの種は区別なく扱われており, 一緒に製品中に加えられている可能性が考えられた。また, *Erythroxylum* 属の植物の存在が示唆されたことから, 製品中にアルカロイドが含まれている可能性があり, これに関しては LC などを用いた成分分析を行う必要があると思われた。なお, 本検討では製品から増幅されたシークエンス配列においては, *Erythroxylum catuaba* や *Trichilia catigua* の登録配列と一致する検体は見られなかった。ただし, *E. catuaba* に関してはデータベース上にこの種の配列の登録がなかったため, 遺伝子からこの種を特定することは出来なかった。

一方で, 国内市場品からはどちらの属の配列も増幅を得ることが出来なかったことに関しては, 製品表示と内容物が不一致である可能性が示唆され, さらに成分分析を行って確認する必要がある。

J2 試料から得られた配列より推定されたセ

ンナに関して, 成分定性分析を行ったところ, SS と HS の市販品 2 種に関しては, 高橋らの報告の通り IR-Gtb と Tiv-Glc の 2 成分と推定されるピークの有無で判別できたものの, 試料からは今回指標とした成分は検出されなかった。この結果から, 試料中のセンナ含有量が微量のため, 成分分析の検出感度を下回っていた可能性が考えられた。

E. 結論

本研究で行った分析の結果, アメリカ市場のカツアバ含有食品では, *Erythroxylum* 属及び *Trichilia* 属の両方の植物が使用されているものが多い可能性が示唆された。一方で, 国内のそれらでは, どちらの植物も使用されていないものが多い可能性が示唆された。今回の結果に関しては, 検体によっては遺伝子損傷などにより標的としていた配列の増幅が出来なかった可能性もあり, 今後は, 成分分析を行ってアルカロイドの含有などについて確認する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

後藤佑斗ら, 国内及びアメリカ市場で流通するカツアバ製品の基原種について, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年, 3 月, 金沢

参考文献

- 1) Kletter C. Morphological, Chemical and Functional Analysis of *Catuaba* Preparations. *Planta Med.*, 70, 993-1000 (2004).
- 2) Takahashi M. Discrimination of *Cassia* plants in health tea. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19 (2), 149-154 (2012).

Table 1 Details of commercial *Catuaba* products used in this study.

No.	形状	表示された原材料	原産国	内容量	一日摂取量
A5	樹皮粉末	カツアバ (<i>Juniperus brasiliensis</i>)	-	454 g	-
A6	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	750 mg x 100粒	1~2粒
A9	樹皮粉末	カツアバ (<i>Trichilia catigua</i>)	ブラジル	28 g	-
A10	樹皮粉末	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	ブラジル	-	-
A11	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	100 mg x 200粒	2~3粒
A12	樹皮粉末	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	25 g	-
A13	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Trichilia catigua</i>)	ブラジル	465 mg x 60粒	-
A14	チンキ剤	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	400 mL	-
J1	樹皮粉末	カツアバ	ブラジル北部	50 g	0.5 g~1 g x 1~2回
J2	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	465 mg x 100粒	2粒
J3	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ	-	320 mg x 180粒	3~5粒
J4	ティーバッグ	有機カツアバ カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>), ムイラプアマ (<i>Ptychopetalum olacoides</i>), マカ (<i>Lepidium spp.</i>), ハマビシ (<i>Tribulus terrestris</i>), チョウセンニンジン (<i>Panax ginseng</i>), イカリソウ (<i>Epimedium spp.</i>) など	パラグアイ	2 g x 20包	-
J6	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ	-	650 mg x 60粒	2粒
J8	リーフ	有機カツアバ	パラグアイ	60 g	-

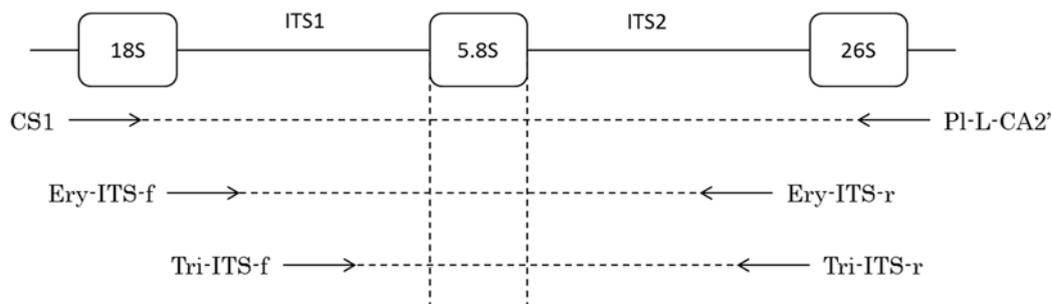
A : アメリカ市場品, J : 国内市場品

- : 記載なし

Table 2 The result of ITS sequence (universal primer).

Sample	Sequence candidate	Accession
A5	<i>Trichilia cipo</i>	FJ037837.1
A6	<i>Coriandrum sativum</i>	* KM051454.1
A9	Not Test	
A10	<i>Trichilia emarginata</i>	* LN833662.1
A11	<i>Coriandrum sativum</i>	* KM051454.1
A12	<i>Matayba elaeagnoides</i>	* KF420986.1
A13	No Amplicon	
J1	<i>Trichilia lepidota</i>	LN833623.1
J2	<i>Senna alexandrina</i>	KF815491.1
J3	No Amplicon	
J4	<i>Psidium cattleianum</i>	KM064972.1
J6	<i>Lepidium meyenii</i>	JX908826.1
J8	<i>Psidium cattleianum</i>	KM064972.1

*: multipul sequences



5'-Primer	Sequence (5'-3')	3'-Primer	Sequence (5'-3')
CS1	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	pl-L-CA2'	GTA GTC CCG CCT GAC CTG
Ery-ITS-f	ACG ACC CGT GAA TAA GTT GTC C	Ery-ITS-r	CCG CAA GCA ATT AGT CTC A
Tri-ITS-f	GCC AAG GAA AAT TTA ACG AGA	Tri-ITS-r	TCG AGA GGC ATG TTA CAC C

Fig. 1 Primer map for PCR

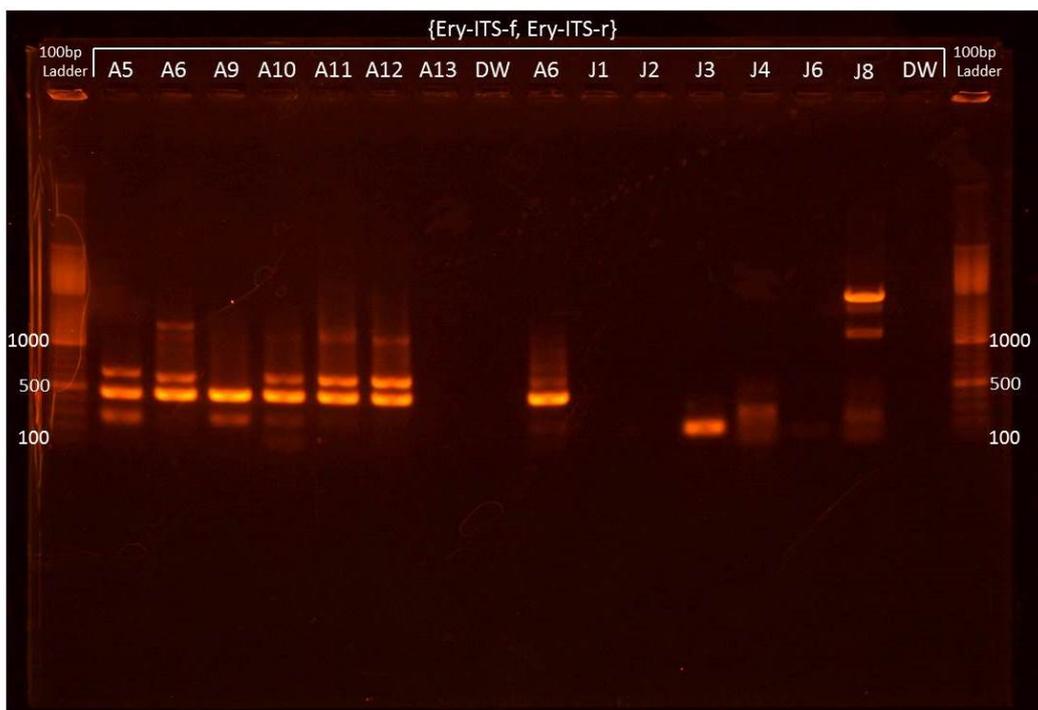


Fig. 2 Electropherogram on species specific PCR for *Erythroxyllum* plants

Genotype-1	1	-----TCGCCCGGAGGCCTCGCCCGYGCTGG	26
Genotype-2	1	CTCGGATAGAAGAGGGGGCCCGGGGTGAGAAAT..R.....C.....	60
<i>E. amplifolium</i>	1	CTCGGAAA-AAGAGGGGGCCCGGGGTGAGAAAT.TT..T...C...A...T....	59
Genotype-1	27	CAACGGCGCGGTTYC-CCAACCAACCTCGGCGCGAGGAGCGCCAAGGAATATGATAACGA	85
Genotype-2	61AA.....A.....Y.....	120
<i>E. amplifolium</i>	60	G.....G.....GAA.....AA.....	119
Genotype-1	86	ACGGGCCCGCGATCGTCGCCCGGGAACGGGAGGTGGACGGGTGTCGGTGCCCTGCTTCA	145
Genotype-2	121K.....Y.....	180
<i>E. amplifolium</i>	120T.....C.....C.....	179
Genotype-1	146	TTACTAATTGAAACGACTCTCGGCAACGGATAATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT	205
Genotype-2	181G.....	240
<i>E. amplifolium</i>	180G.....	239
Genotype-1	206	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTCTTTGAACG	265
Genotype-2	241	300
<i>E. amplifolium</i>	240	299
Genotype-1	266	CAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTCGGCCGAGGGCACGTCTAGCTGGGTGTCACGCAGCGTCG	325
Genotype-2	301	360
<i>E. amplifolium</i>	300-	358
Genotype-1	326	CCCCCTCTCATCAGCCTGATCCTAGGAGWCAGAGGAGGGGGCGGAACCTGGCCTCCCG	384
Genotype-2	361	419
<i>E. amplifolium</i>	359T.....G.....-	416

※*E. amplifolium* の配列は、データベースから得た (Acc. no.:DQ787423).

Fig. 3 ITS sequence alignment of *Erythroxyllum*



Fig. 4 Electropherogram on species specific PCR for *Trichilia* plants

<i>T. emarginata</i>	1	ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCC	60
A5	1	60
A9	1	60
A10	1	60
A12	1	60
<i>T. emarginata</i>	61	CCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGGCCTGCCTGGGTGTCACGCATTGTTGCCCCCAAACC	120
A5	61	120
A9	61M.WY.	120
A10	61M.Y.	120
A12	61	120
<i>T. emarginata</i>	121	CCCTCTTGGGGAATAGCTGGTCCGGCGAAAAATGGCCTCCCGTGCCTCCAGCTCGCGGT	180
A5	121M.....	180
A9	121R.....M.....	180
A10	121K.....A...R...Y.....C.....	180
A12	121C.....	180
<i>T. emarginata</i>	181	TGGCTCAAATCTGAGTCTTTCGGCGACCGTGCCGCGACGATCGGT	225
A5	181	225
A9	181Y.....	225
A10	181Y.....	225
A12	181C.....	225

※*T. emarginata* の配列は、データベースから得た (Acc. no.:LN833662).

Fig. 5 ITS sequence alignment: *Trichilia* - 1

```

T. lepidota  1  ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCC  60
A6           1  .....  60
A11          1  .....  60

T. lepidota  61  CCAAGCCGTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTTGCCCCCACATC  120
A6           61  .....  120
A11          61  .....Y...  120

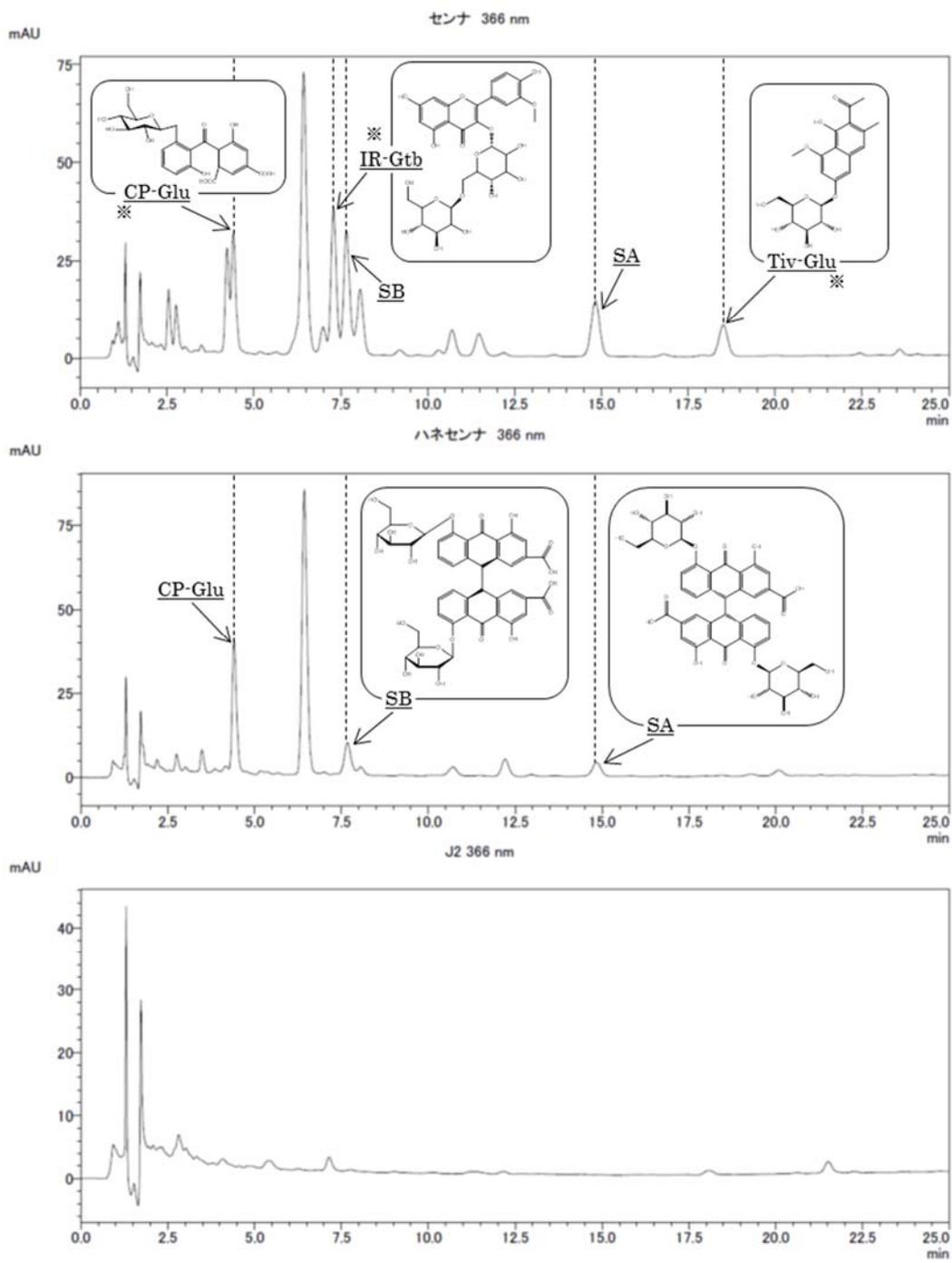
T. lepidota 121  CCCCTCTTGGCGGATGTTTGGACGGGCGGAAACTGGCCTCCCGTGCCTCCAGCTCGCGG  180
A6           121  .....R....W...W.....R...Y.....M.....  180
A11          121  .....A....W.....A.....  180

T. lepidota 181  TTGGCCCAAATCTGAGTCTTTCGGCGACCGTGCCGCGACGATCGGT  226
A6           181  .....T.....  226
A11          181  .....T.....  226

```

※*T. lepidota* の配列は、データベースから得た (Acc. no.:LN833623).

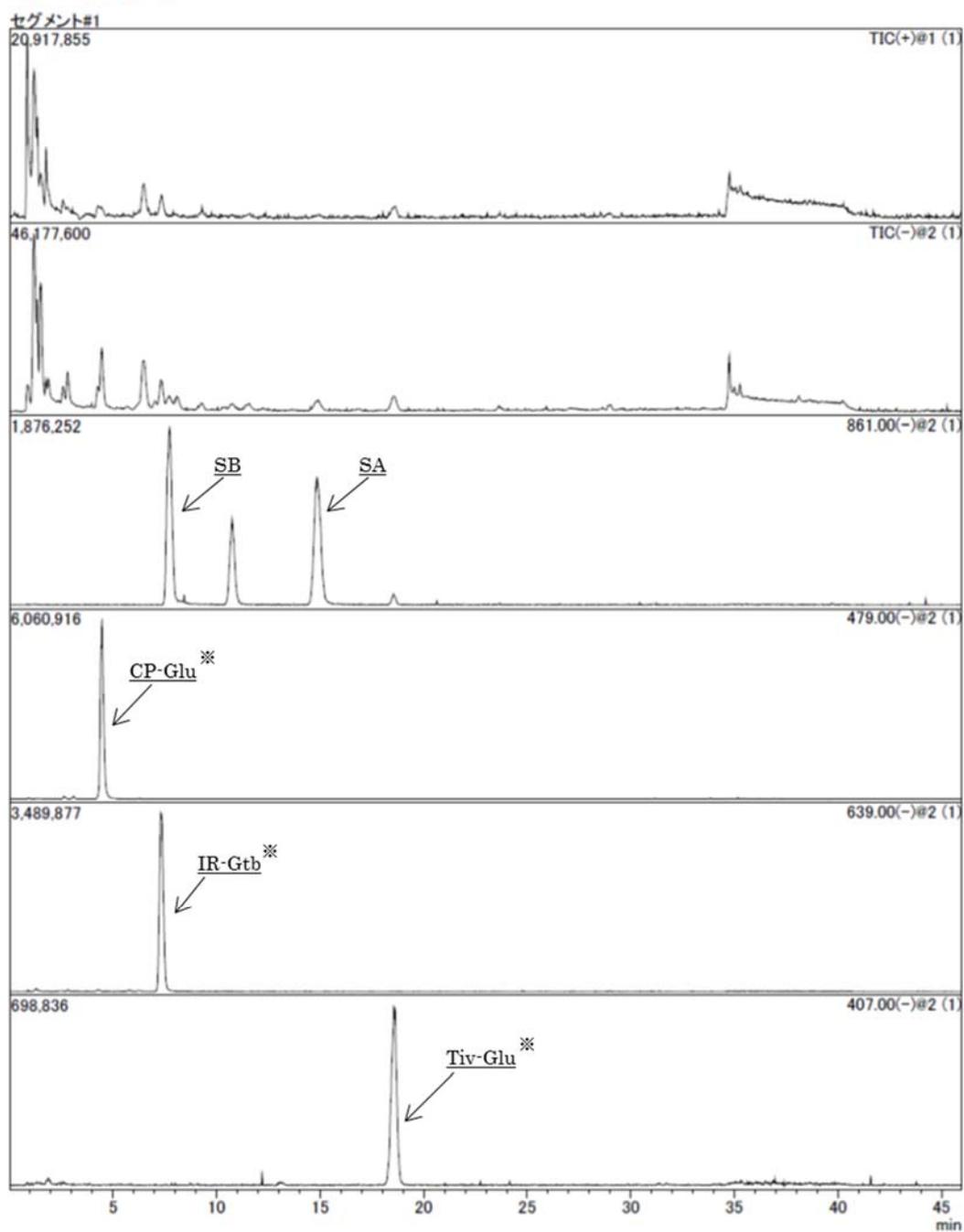
Fig. 6 ITS sequence alignment of *Trichilia* - 2



※ : putative

Fig. 7 UV Chromatogram

<クロマトグラム>



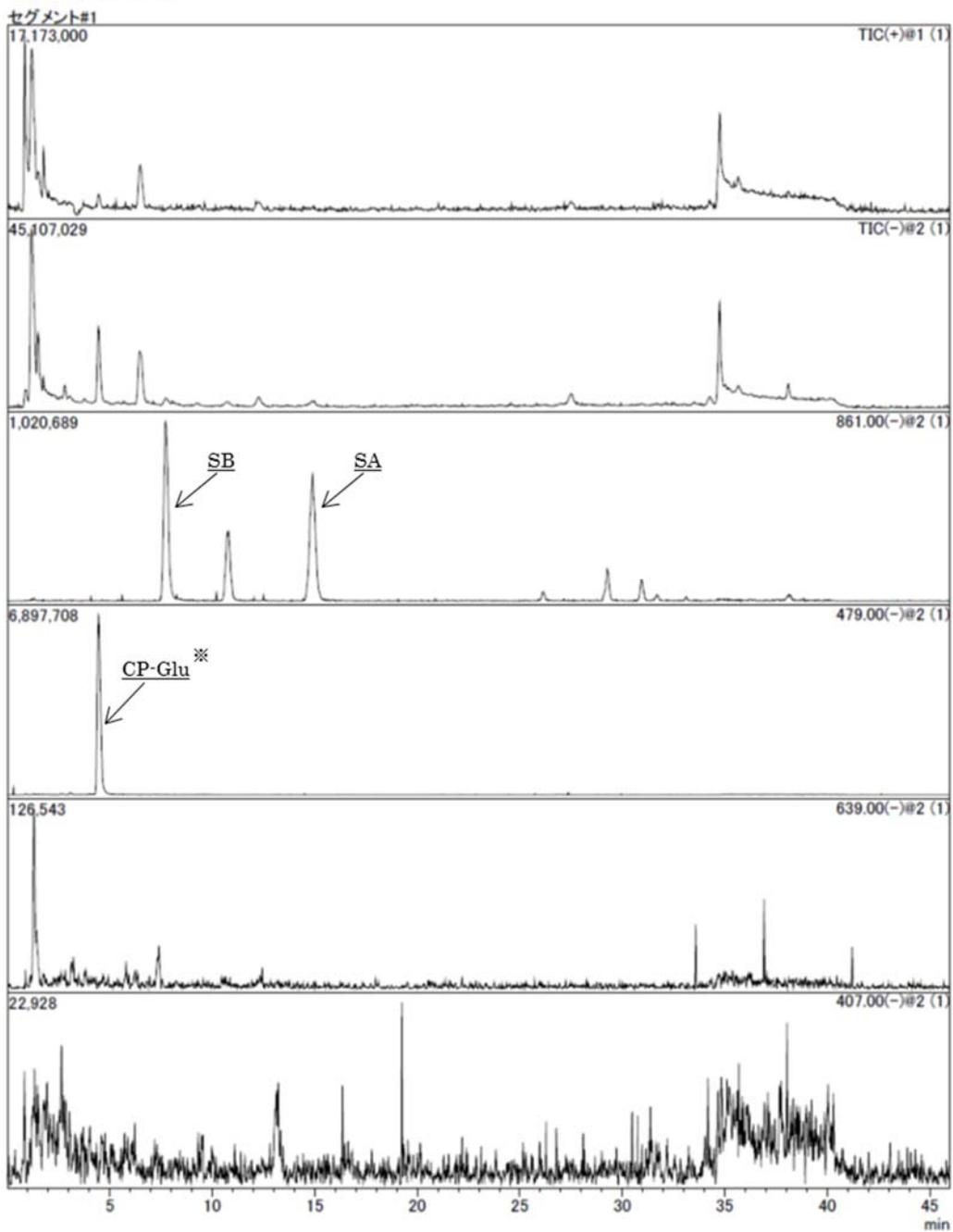
※ : putative

Fig. 8 MS Spectrum (1) *S. alexandrina* Sample Extract

サンプルID : ハネセンナ抽出液.lcd 分析日時 : 2017/10/04 9:36:18

データファイル

〈クロマトグラム〉



※ : putative

Fig. 9 MS Spectrum (2) *S. alata* Sample Extract

サンプルID : J2抽出液.lcd 分析日時 : 2017/10/04 10:22:50

＜クロマトグラム＞

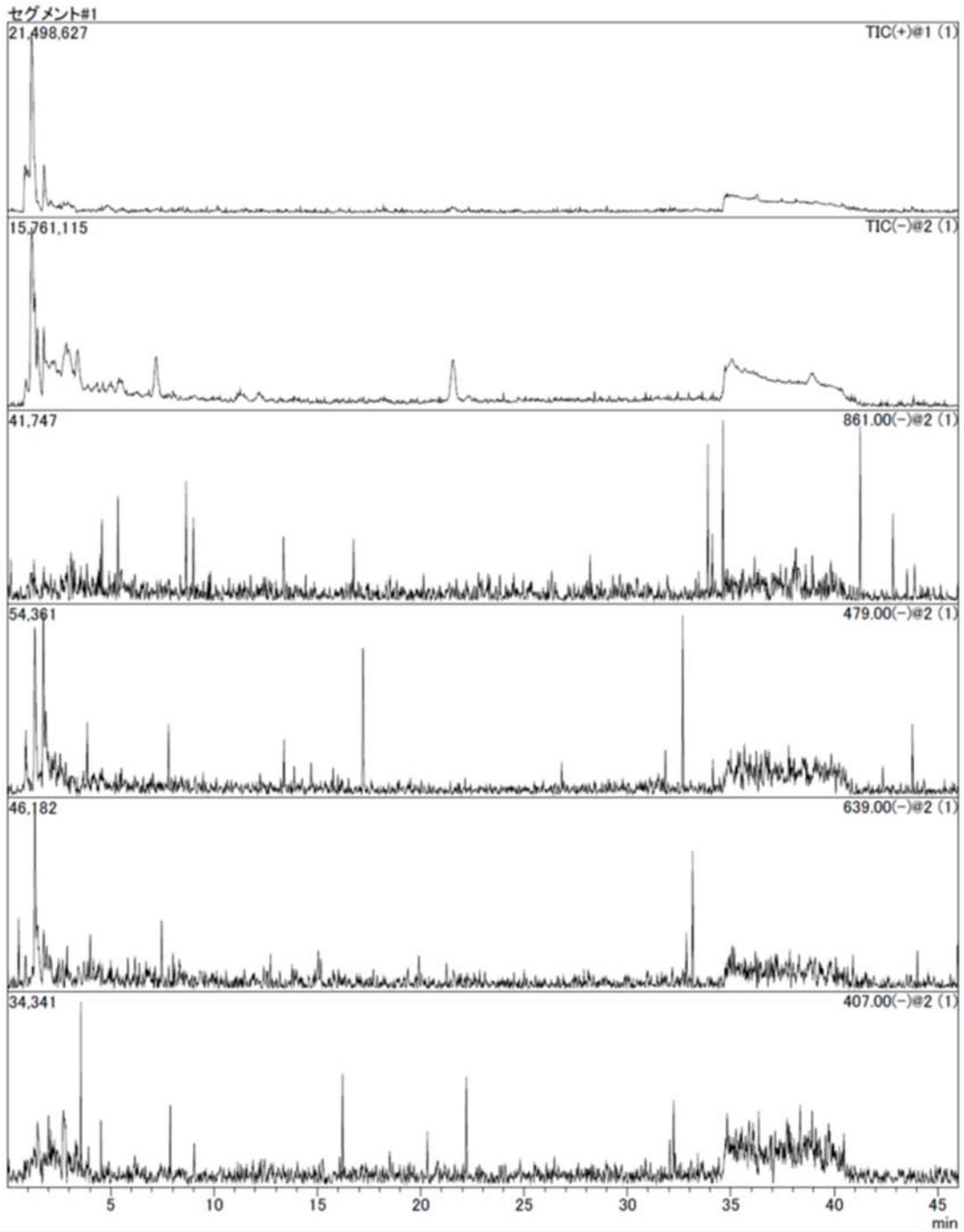


Fig. 10 MS Spectrum (3) J2 Sample Extract