

分担研究報告書

分担研究課題 グレーゾーンの植物体に関する研究

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

「紅豆杉」製品及びイチイ(*Taxus cuspidata*)の各部位におけるパクリタキセル(PTX)含量について

研究要旨 近年、我が国において「紅豆杉」と称される健康食品が市場に流通しており、その使用部位は材部であることが確認された。今回、我々は「紅豆杉」製品における PTX 含量を UPLC-UV 分析にて定量を行い、比較として *T. cuspidata* の各部位においても、その含量を調査した。その結果、*T. cuspidata* における各部位の PTX 含量は、樹皮>葉>種子>枝>心材>仮種皮の順であった。また、「紅豆杉」製品とイチイの心材の定量値は、ほぼ同程度であった。これらの結果から、イチイの種子及びコウトウスギの心材を、「非医薬品」から「専ら医薬品」に移行するとともに、植物分類学及び植物形態学上の誤りを修正する改正案を作成した。

協力研究者

吉富太一 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
流動研究員

A. 研究目的

イチイ科イチイ (*Taxus*) 属植物は、北海道から九州地方まで国内に広く分布する針葉樹である。このものは樹皮などにタキサン骨格を有するアルカロイド taxin や paclitaxel (PTX)などを多数含んでおり、中でも PTX は薬機法における毒薬に指定されている。一方で、PTX は癌に対し有効に作用することが 1980 年代に見出され、世界的に研究がなされたことからイチイ属植物において、最も代表的な化合物の一つである。

近年、我が国において「紅豆杉」と称される

健康食品が市場に流通し、リウマチや癌への効果を謳った茶剤が見出されるようになった。コウトウスギは、*Taxus* 属に分類される植物であり、食薬区分リストには、ハクトウスギ (別名ウンナンコウトウスギ) の名で記載され、樹皮、葉が専ら医薬品、心材が非医薬品とされている¹⁾。昨年度、山路らは、形態観察により「紅豆杉」製品に用いられた部位が材部であることを特定した²⁾。このため、同製品に食薬区分上の問題はないが、一方で、同属植物であるイチイ (*Taxus cuspidata*) は、樹皮、葉、心材が専ら医薬品に区分され、果実が非医薬品に分類されている¹⁾。このため、今回の調査で材のみからなると確認された「紅豆杉」製品についても、安全性確保の観点から、PTX の含量を UPLC-UV 分

析により定量した。さらに、心材部の含量比較のため *T. cuspidata* を用いて、部位別（樹皮、葉、心材など）に定量分析を行い、イチイ属植物の食薬区分上の判断のためのデータを取得した。

B. 研究方法

1. 実験材料

PTX の標準品は、Chem-Impex International 社より購入した。日本国内に流通する「紅豆杉」製品は、インターネットより購入した。イチイ (*T. cuspidata*) は北海道、帯広市より採集した。

2. 実験方法

2-1. 試料調製

PTX 10 mg を 2 mL のメスフラスコに量りとり、メタノールで定容した。これをメタノールで段階希釈し、1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL の標準溶液を作成し、検量線用の試料とした。

イチイを樹皮、葉、枝、心材、仮種皮、種子の 6 つの部位に分離し (Fig. 2)、それぞれを乾燥後に粉碎した。各部位ごとに試料(樹皮、葉、枝; それぞれ 300 mg, 心材、仮種皮、種子; それぞれ 600 mg) を量りとり、2 mL または 3 mL のメタノールを加え、30 分間振とう抽出後、遠心分離(12600 g, 3 分間)を行い、上清を回収した。この操作を 4 回繰り返し、得られた抽出エキスを遠心エバポレーターで留去した。残渣に 50% メタノール溶液を 3.5 mL 加え、超音波照射して懸濁後、遠心分離し(12600 g, 3 分間)、上清を回収した。この操作を 3 回繰り返し、回収した全溶液を Sep-Pak plus C18 environmental cartridges 820 mg (Waters) に供した。試料溶液の

溶出後、メタノール 10 mL を用いてカラムに保持した成分を溶出した。この溶液は遠心エバポレーターで完全に留去した。留去後の残渣にメタノールを少量加え、1 mL のメスフラスコに移して定容し、0.45 µm のメンブレンフィルターでろ過したものを分析試料とした。また「紅豆杉」製品も同様に前処理カラムで処理したものを分析に使用した。

「紅豆杉」製品の茶剤エキスの調製は、製品のティーパック 3 袋 (1 袋中の内容物は約 2 g) に対し、1 L のミリ Q 水を加え、沸騰するまで加熱した。沸騰後、5 分間煎じ、室温付近まで冷却後、凍結乾燥により溶媒を留去した。残渣に 50% メタノールを少量加え、100 mL のメスフラスコに移して定容し、0.45 µm のメンブレンフィルターでろ過したものを分析試料とした。

2-2. UPLC-PDA-MS 分析

LC 条件

装置 : Ultimate 3000 HPLC (ThermoFisher Scientific), カラム : Cortecs C18 (2.1×150 mm, 1.6 µm; Waters), 移動相 A 液 : 0.1% ギ酸水, 移動相 B 液 : 0.1% ギ酸入りアセトニトリル, グラジエント (A 液/B 液) : 57/43 (0 min) - 56/44 (4 min) - 56/44 (11.5 min) - 0/100 (11.51 min) - 0/100 (18 min) - 57/43 (18.01 min) - 57/43 (26 min), 流速 : 0.3 mL/min, カラム恒温槽温度 : 40°C, 注入量 : 2 µL, 検出器 : ダイオードアレイ検出器 (モニター波長 227 nm)

MS 条件

装置 : LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific), イオン化法 : ESI ポジティブモード, sheath gas :

42 L/hr, aux gas : 25 L/hr, sweep gas : 3 L/hr, キャピラリー温度 : 300°C, 質量電荷比範囲 : 100-1000.

C. 研究結果

1. LC 条件の検討

まず, PTX の LC 条件の検討を行った. PTX は 3 つの芳香環を含む 6/8/6 員環からなるタキサン型ジテルペンであり, 非常に疎水性の高い化合物である³⁾(Fig. 1). 従って, 最初の移動相 B 比率を 43% に設定し, 溶出時間の短縮を図るとともに, UPLC 用カラムを使用し, PTX と各試料中の夾雑成分との分離を試みた. その結果, 「紅豆杉」製品及びイチイの各部位由来の試料から Sep-Pak による前処理により調製した試料溶液について, PTX と夾雑成分は, ベースライン分離した (Fig. 3).

2. PTX 抽出条件の検討

続いて, PTX 抽出条件の検討を行った. 抽出は, イチイ全体 (部位別に分離する前の試料) の粉碎試料 100 mg に対し, メタノール 1 mL を加え 30 分間, 振とう抽出することにより行った. 遠心分離後, 上澄み液を 2 mL メスフラスコに回収し, メタノールで定容したものを分析試料とした. 残渣を同様の方法で抽出後, 再度分析し, 残存率を算出した. この操作をピークが検出されなくなるまで繰り返した. その結果, 5 回目の抽出でピークは検出されなくなったことから, 抽出回数は 4 回と決定した (Table 1).

3. 分析法のバリデーション

次に, PTX の標準品と試料を用いて, 分析法

のバリデーションを行った. まず, 標準品により 1.0 µg/mL から 500 µg/mL の範囲で検量線を作成した. その結果, 重相関係数 (R^2) は 0.9999 以上となり非常に良好な直線性が得られた (Fig. 4). 標準品の併行精度は 6 回の繰り返し分析の相対標準偏差 (RSD%) により評価し, 10.0 µg/mL から 500 µg/mL の各濃度において 1.5% 以下を達成した (Table 2). それ以下の濃度域に関しては, 2.3-3.5% の範囲で推移した (Table 2). 次に, 試料中の PTX とそのピークに最も近接した夾雑成分から, 分離度を算出した. その結果, 全試料において, 分離度 1.5 以上を達成した (Table 3). 特異性については, PTX の標準品と各試料のスペクトルの類似度から評価した. その結果, 類似度は, 全検体において 1000 近い数値を示し, ピーク純度が非常に高いことから, いずれも特異性は高いと判断した. 続いて, 添加回収試験を行い, 定量値の真度を評価した. 今回, 添加回収試験は, 比較的 PTX 含量の低かった「紅豆杉」製品に対して行った. その結果, 独立して 3 回行った回収試験はいずれも 98.7~100.1% の回収率を示したことから, 非常に高い真度が得られると判断した (Table 4).

4. 各試料の定量値

次に, 各試料の定量値を求めたところ, その含量は樹皮 > 葉 > 種子 > 枝 > 心材 > 仮種皮の順であった (Table 5). 「紅豆杉」製品との定量値の比較では, 心材とほぼ同じ定量値を示した. また, 「紅豆杉」製品は茶用飲料として用いられることから, 茶剤の PTX 含量も調査した. その結果, PTX は極微量ながら含まれていることが確認された.

D. 考察

PTXの分析法は、既に数多くの分野で報告されており、近年、LC-UVだけでなく薬物動態などの微量分析に対応するためLC-MS/MSを用いたものも主流となっている⁴⁾。今回、我々は試料のメタノール抽出エキスを逆相系固相抽出カラムにより前処理を行い、更にUPLCによる高分離な分析系を構築した。これは、試料中の高～中程度の極性を有する夾雑成分を排除するとともに、カラムの劣化による保持時間や圧力変動を防ぐことを目的とした。また、検出は、PTXの検出感度と定量時の安定化を考慮し、UV 227 nmを選択した。

分析のバリデーションについては、標準品と試料の両面から評価し、検量線の直線性、併行精度、分離度、特異性、回収率いずれも良好な結果を示した。これは最適な前処理の設定と高分離能なUPLCにより分析系を構築した結果と考えられた。

*T. cuspidata*の各部位における定量値は樹皮>葉>種子>枝>心材>仮種皮の順に高いことが明らかになった (Table 5)。タキサン骨格を有するアルカロイドはイチイ属植物の各部位から報告されているが、種子を覆う仮種皮部分には含まれていないとされていたが、今回の測定では微量含まれていることが分かった^{5), 6)}。ただし、イチイの仮種皮部は古くから食経験があることから、食薬区分上の扱いは、現行通り、非医薬品で良いと考える。一方、種子における含量は、樹皮や葉と同程度含まれていることが確認されたことから、専ら医薬品へ移行するのが適切である (Table 5)。また、現在の食薬区分

リストでは、種子及び仮種皮に相当する部分を「果実」と表記していると思われるが、イチイは裸子植物であり、子房を持たないことから、真正果実は存在しない。このため、現在の「果実」の表現は、「仮種皮」と「種子」に改める必要がある。以上のことから、イチイの食薬区分上の扱いは、種子を専ら医薬品 (Table 6-A)に移行し、仮種皮を非医薬品 (Table 6-B)に留めるべきと考える。

次に、「紅豆杉」製品とイチイの各部位におけるPTXの定量値を比較した。その結果、イチイの心材部分と「紅豆杉」製品は、ほぼ同程度の定量値を示し、両者に大きな差は確認されなかった (Table 5)。今回、我々は一連の分析において、「紅豆杉」製品の使用部位を材部と特定し¹⁾、遺伝子鑑別から、基原種を *T. wallichiana* var. *wallichiana* と同定した⁷⁾。従って、イチイの材部と「紅豆杉」製品の定量値が同程度なのは妥当な結果と考えられた。

今回分析した「紅豆杉」製品は茶用飲料として用いられることから、茶剤中のPTX含量も調査した。Fig. 5に茶剤の各クロマトグラムを示した。その結果、*m/z* 854.3におけるMSクロマトグラム以外は、ほぼ検出できておらず、拡大したクロマトグラムでも trace 量であった。また、作成した検量線に基づいて検出限界と定量限界を求めたところ、検出限界は0.1 µg/mL、定量限界は0.3 µg/mLであった。この定量限界から茶剤1 L中におけるPTX含量は、30 µg未満と算出された。PTXの毒性は、LD₅₀が12 mg/kg (mouse, 静脈投与^{8), 9)})であることなどを考慮すると、本製品の摂取により、直ちに健康被害が発生する可能性は低いと考えられるが、PTXは

毒薬であり、濃縮エキス製品の販売の可能性や多量摂取の危険性、イチイの食薬区分上の扱いとの整合性を考えると、材部も専ら医薬品に移行すべきものとする。ただし、茶剤については、トウシンソウの例に倣い、除外処置を検討する余地はあるものと思われる。

なお、現行の食薬区分リストでは、「ハクトウスギ」の別名が「ウンナンコウトウスギ」とされているが、ハクトウスギは、*Pseudotaxus chienii* を指し¹⁰⁾、コウトウスギとは、属レベルで異なる植物であることから、両者は、別品目として記載されるべきである。以上のことから、コウトウスギ、ハクトウスギの食薬区分上の扱いは、以下の通り改正することを提案する。専ら医薬品リストは、ハクトウスギとコウトウスギに分けた上で、コウトウスギの別名に、ウンナンコウトウスギを記載し、部位に心材を含める (Table 7-A)。一方、非医薬品リストは、ハクトウスギの別名からウンナンコウトウスギを削除し、さらに備考欄にコウトウスギの樹皮、葉、心材は、医薬品相当であることを記載し、ハクトウスギとコウトウスギが別の区分であることを明確にする。

E. 結論

イチイ *T. cuspidata* の各部位について、PTX の定量を行ったところ、含量は樹皮>葉>種子>枝>心材>仮種皮の順であることが明らかとなった。

また、「紅豆杉」製品とイチイの心材の定量値は、ほぼ同程度であった。これらの結果から、イチイの種子及びコウトウスギの心材を、「非医薬品」から「専ら医薬品」に移行するととも

に、植物分類学及び植物形態学上の誤りを修正する改正案を作成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 吉富太一, 山路誠一, 徳本廣子, 袴塚高志, 丸山卓郎, 健康食品として販売されるコウトウスギ製品の基原植物, 使用部位, paclitaxel 含量について, 第5回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019年9月, 東京).
- 2) 吉富太一, 山路誠一, 徳本廣子, 袴塚高志, 丸山卓郎, イチイ *Taxus cuspidata* の部位別パクリタキセル含量と健康食品として販売されるコウトウスギ製品中の含量比較について, 日本薬学会第140年会 (2020年3月, 京都).

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局長, 薬生発 0322 第2号, 医薬品の範囲に関する基準の一部改正について, 平成31年3月22日.
- 2) 山路誠一, 高橋直熙, 丸山卓郎, 厚生労働行政推進調査事業費補助金分担研究報告書「専ら医薬品」たる成分本質の判断のための調査・分析及びその判断基準・範囲の整備に関する研究, イチイ属植物由来植物製品の鑑別に関する研究. 2019, pp. 25-30.
- 3) Madhu S. S, Sudip K. D, Nandita G. D. *ISRN Pharmacology*, 2012, **2012**, 623139.
- 4) Baldrey S. F., Brodie R. R., Morris G. R., Jenkins

- E. H., Brookes S. T. *Chromatographia*, 2002, **55**, 187-192
- 5) Christina R Wilson, John-Michael S, Stephen B. H. *Toxicol*, 2001, **39**, 175-185.
- 6) Adrian A, Tomasz R. *Phytochem. Anal.*, 2017, **28**, 448-453.
- 7) 丸山卓郎, 厚生労働行政推進調査事業費補助金分担研究報告書 「専ら医薬品」たる成分本質の判断のための調査・分析及びその判断基準・範囲の整備に関する研究, 遺伝子情報による「紅豆杉」製品の基原植物の同定について, 2020.
- 8) Athenex 社 Paclitaxel Injection Safety Data Sheet, 2017.
- 9) Hospira 社 Paclitaxel Injection Safety Data Sheet, 2016.
- 10) eFloras (2008). Published on the Internet <http://www.efloras.org> [accessed 2 April 2020] Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA.

Table 1 Peak area and residual rate of PTX in the extract of whole *T. cuspidata*.

	面積値	残存率 (%)
1回目	143598	-
2回目	31441	17.962
3回目	8491	4.626
4回目	3231	1.730
5回目	-	-

残存率(%) = 残留物抽出液中の PTX ピーク面積 / (試料抽出液中の PTX ピーク面積 + 残留物抽出液中の PTX ピーク面積) x 100

Table 2 Relative standard deviation (RSD%) by repeated analysis of PTX standard

標準品濃度 (μg/mL)	面積	RSD%	標準品濃度 (μg/mL)	面積	RSD%
1_001	10594	3.54	50_001	442654	0.63
1_002	10216		50_002	446412	
1_003	11020		50_003	446865	
1_004	11129		50_004	444774	
1_005	10124		50_005	439180	
1_006	10490		50_006	441043	
2.5_001	23757	3.08	100_001	878571	0.60
2.5_002	23006		100_002	873960	
2.5_003	23922		100_003	864681	
2.5_004	22147		100_004	877781	
2.5_005	23882		100_005	881202	
2.5_006	24325		100_006	874701	
5_001	45896	2.31	250_001	2194772	0.55
5_002	45499		250_002	2166784	
5_003	45297		250_003	2202259	
5_004	43461		250_004	2202104	
5_005	45928		250_005	2188072	
5_006	43549		250_006	2194905	
10_001	89022	1.14	500_001	4383589	0.49
10_002	90258		500_002	4366932	
10_003	88982		500_003	4366743	
10_004	89639		500_004	4401981	
10_005	87462		500_005	4370717	
10_006	90590		500_006	4330430	
25_001	225912	0.67			
25_002	222978				
25_003	223606				
25_004	227429				
25_005	225911				
25_006	225672				

Table 3 Resolution of samples in UV chromatogram at 227 nm.

検体	分離度
イチイ(全体)	1.85
製品	1.55
樹皮	1.90
葉	1.89
枝	1.85
心材	1.77
仮皮種	1.86
種子	1.81

Table 4 Recoveries (%) of PTX spiked to 「紅豆杉」 products

回収率(%)	
1回目	100.1
2回目	98.7
3回目	98.7

回収率(%) = (PTX 添加試料のピーク面積 - PTX 未添加試料のピーク面積) / PTX 標準品の面積 x 100

Table 5 Concentrations of PTX in the samples

検体名	μg/g	mean±SD	検体名	μg/g	mean±SD
イチイ全体_1	167.26		枝_1	93.11	
イチイ全体_2	164.07	165.485±1.324	枝_2	91.26	92.842±1.198
イチイ全体_3	165.13		枝_3	94.16	
製品_1	14.19		心材_1	13.44	
製品_2	14.35	14.240±0.076	心材_2	13.11	13.495±0.339
製品_3	14.19		心材_3	13.93	
樹皮_1	248.57		仮種皮_1	3.89	
樹皮_2	245.16	246.933±1.394	仮種皮_2	3.83	3.822±0.058
樹皮_3	247.07		仮種皮_3	3.75	
葉_1	226.53		種子_1	214.91	
葉_2	221.89	225.170±2.329	種子_2	210.60	211.489±2.511
葉_3	227.09		種子_3	208.96	

Table 6 イチイの食薬区分リスト改正案

A. 「専ら医薬品」リスト

現在

名称	他名等	部位等	備考
イチイ	アララギ	枝・心材・葉	果実は「非医」

改正案

名称	他名等	部位等	備考
イチイ	アララギ	枝・心材・葉・種子	仮種皮は「非医」

B. 「非医薬品」リスト

現在

名称	他名等	部位等	備考
イチイ	アララギ	果実	枝・心材・葉は「医」

改正案

名称	他名等	部位等	備考
イチイ	アララギ	仮種皮	枝・心材・葉・種子は「医」

Table 7 ハクトウスギの食薬区分リスト改正案

A. 「専ら医薬品」リスト

現在

名 称	他 名 等	部 位 等	備 考
ハクトウスギ	ウンナンコウトウスギ	樹皮・葉	心材は「非医」

改正案

名 称	他 名 等	部 位 等	備 考
コウトウスギ	ウンナンコウトウスギ	樹皮・葉・心材	
ハクトウスギ		樹皮・葉	心材は「非医」

B. 「非医薬品」リスト

現在

名 称	他 名 等	部 位 等	備 考
ハクトウスギ	ウンナンコウトウスギ	心材	樹皮・葉は「医」

改正案

名 称	他 名 等	部 位 等	備 考
ハクトウスギ		心材	樹皮・葉は「医」 コウトウスギの樹皮・葉・心材は「医」

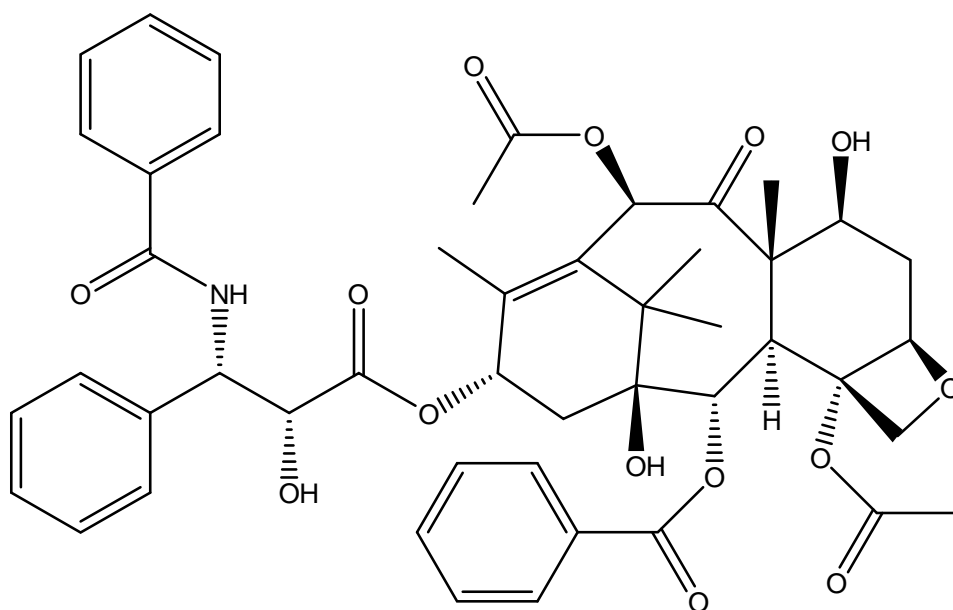


Fig. 1 The structure of paclitaxel (PTX)



假種皮 (aril)
https://inakasensei.com/wp-content/uploads/2017/09/s-yew-185279_640.jpg



種子 (seed)
http://cache.cart-imgs.fc2.com/user_img/jumokutane/14_1_49.jpg



樹皮 (bark)



葉 (leaflet)



枝 (branch)



心材 (heartwood)

Fig. 2 Each part of *T. cuspidata*.

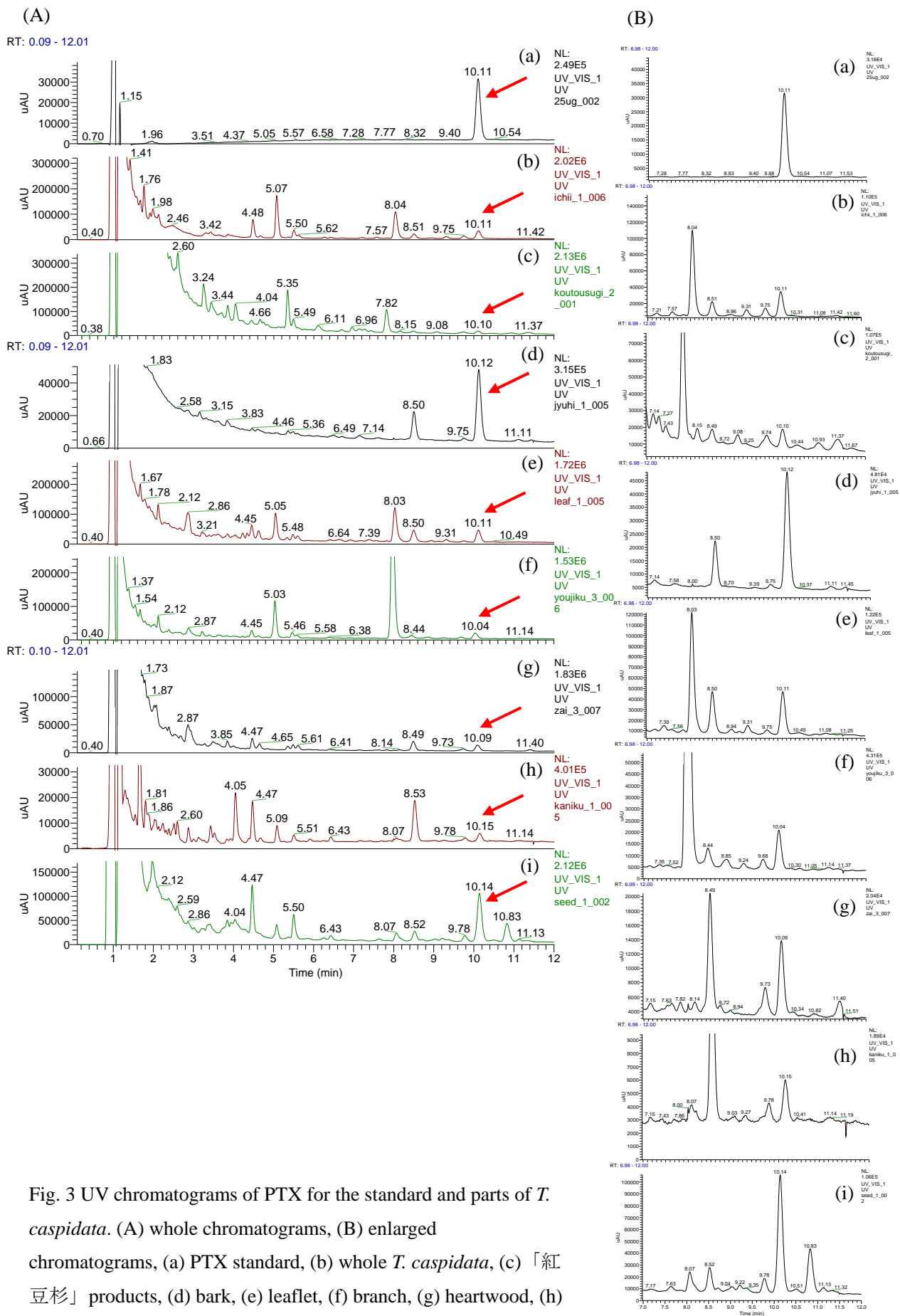


Fig. 3 UV chromatograms of PTX for the standard and parts of *T. caspidata*. (A) whole chromatograms, (B) enlarged chromatograms, (a) PTX standard, (b) whole *T. caspidata*, (c) 「紅豆杉」 products, (d) bark, (e) leaflet, (f) branch, (g) heartwood, (h) aril, (i) seed

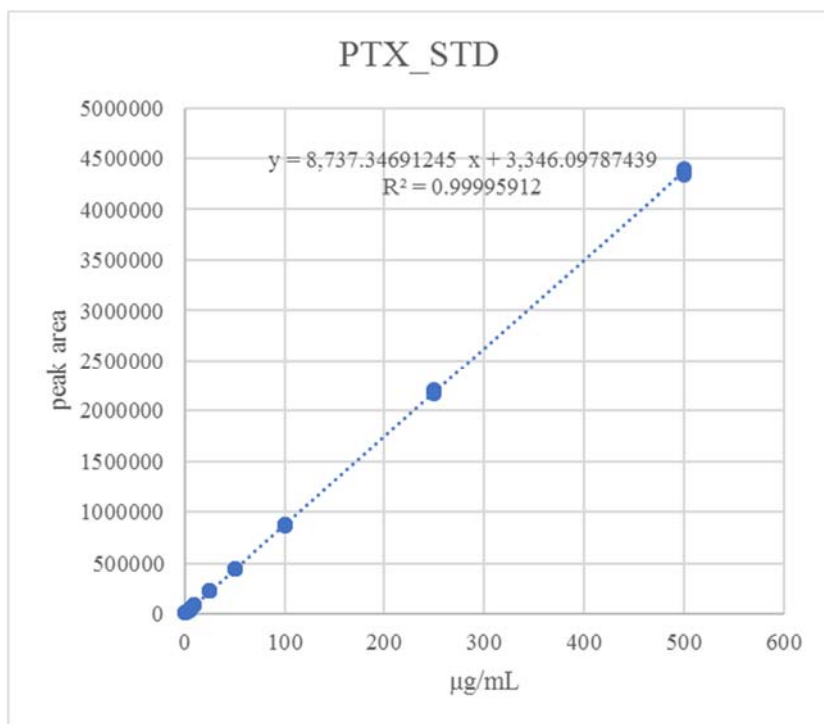


Fig. 4 Calibration curve of PTX standard

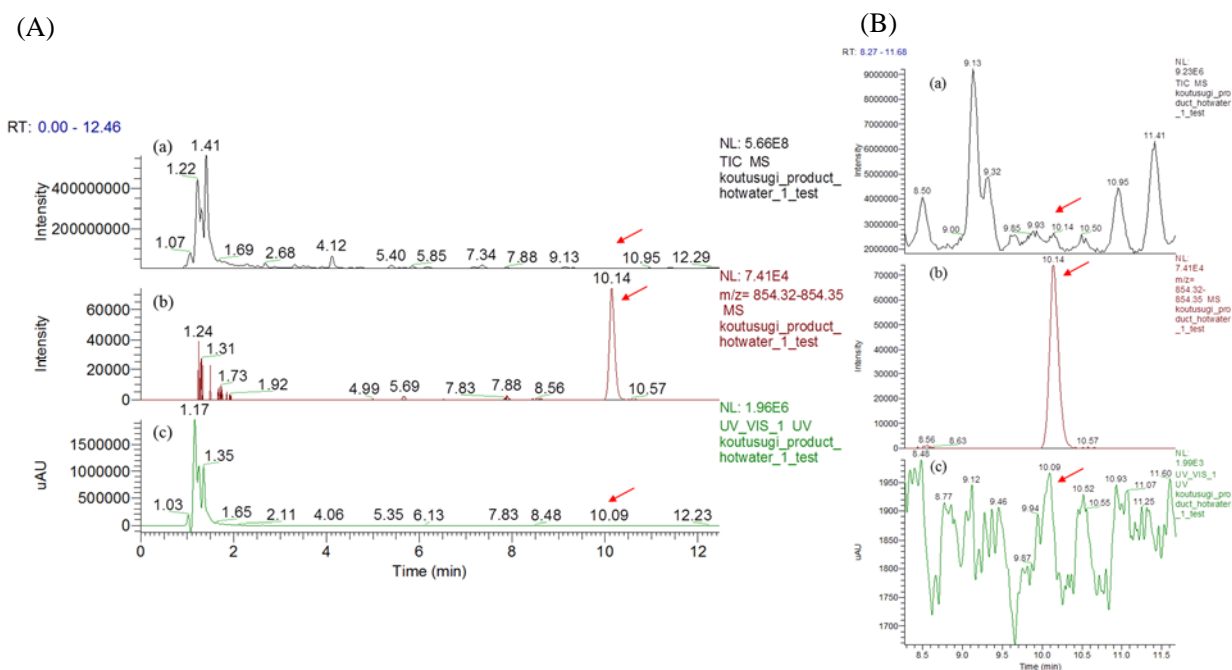


Fig. 5 Chromatograms of PTX in the teabags. (A) whole chromatograms, (B) enlarged chromatograms, (a) TIC chromatogram, (b) MS chromatogram of m/z 854.32-854.35, (c) UV chromatogram at 227 nm.