

厚生労働行政推進調査事業費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

政策研究事業

無承認無許可医薬品の調査・分析及び
量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

(H27-医薬-指定-010)

研究代表者 袴塚 高志

平成 30 (2018) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告書		
	無承認無許可医薬品の調査・分析及び量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究		
	袴塚 高志	1
II.	分担研究報告書		
A.	<u>食薬区分判定の申請を受けた成分本質に関する検討</u>		
1.	無承認無許可医薬品の調査・分析及び量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究 「専ら医薬品」の調査に関する研究		
	合田 幸広	15
B.	<u>食薬区分のグレーゾーンに位置する植物体及び化合物に関する検討</u>		
2.	無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究 カツアバの基原植物に関する研究		
	丸山 卓郎	21
3.	無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究 日本国外で流通する何首烏及び関連生薬の基原種調査（2）		
	内山 奈穂子・佐藤 直子	33
4.	無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究 沖縄に産するカキノキ科植物であるリュウキュウガキ (<i>Diospyros maritima</i>) の成分研究		
	大塚 英昭	47
5.	無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究 N-Phenylpropenyltaladafil の LC-PDA-MS 分析について		
	丸山 卓郎	53
C.	<u>量的概念に基づく判定基準に関する検討</u>		
6.	量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究 丸山 卓郎・内山 奈穂子・袴塚 高志・合田 幸広・ 西川 秋佳・小川 久美子	63
7.	無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究 LC-MS を用いた <i>Cassia</i> 属ハネセンナおよびセンナの分析に関する研究		
	内山 奈穂子・辻本 恭	69

D.	<u>専医リスト及び非医リストの植物基原等の見直し</u>	
8.	無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究 非医リストの植物基原等の見直しに関する研究 丸山 卓郎 79
Ⅲ.	研究成果の刊行に関する一覧表 101

無承認無許可医薬品の調査・分析及び量的概念を含む 専ら医薬品の規制に関する研究

研究代表者 袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究要旨

無承認無許可医薬品は、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、これらの流通により、適正な医療機会の喪失等、様々な健康被害が予想される為、医薬品医療機器等法により、その製造、販売、授与、広告が禁止されている。本研究は、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。

まず、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、依頼のあった植物由来1品目、動物由来2品目及び化学的等2品目の本質について文献調査等を行った。その結果、天然物ではゴミシを除き非医薬品成分であるものと考えられた。ゴミシは、含有成分として、gomisin A 及び schizandrin を天然物としては高含量で含んでおり、これらの成分は、中枢神経作用も予想される強い薬理活性を持つことから、医薬品の成分本質ワーキンググループでの議論が重要と考えられた。デスカルボンシルデナフィルは、PDE5の活性発現部に結合し、また実際に阻害活性を持つことから、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、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ところ、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。*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、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た。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。

さらに、韓国で何首烏の代わりに使用されてきた白首烏について、これと形態のよく似た異葉牛皮消の誤用が近年問題となっていることから、韓国市場で流通する白首烏等を収集し、その基原種を成分と遺伝子の両面から調べ実態を調査し、昨年度実施した中国市場流通の製品と比較検討した。生薬購入時に何首烏とラベルされていた検体のうち、中国市場品はすべて生薬名から予想される基原種と遺伝子から推定される基原種が一致したが、韓国市場では *C. auriculatum*（異葉牛皮消の基原種）由来のものが何首烏として取引されていた。また、ひとつのロットに *C. wilfordii*（白首烏の基原種）と *C. auriculatum* 由来のものが混在している事例、上記2種いずれでもない *Cynanchum* 属由来のものが含まれている事例が確認された。

さらに、沖縄に産するカキノキ科植物であるリュウキュウガキ (*Diospyros maritima*) は沖縄本島から先島諸島にわたって自生しており、その果実は毒とされているが、時として、「柿」という名称から、誤食の可能性もあるため、危害を及ぼすであろう成分の検討を行った。その結果、3種のカウレン誘導体といくつかのフラボンの配糖体を単離した。ただし、危害要因成分と予測していたナフトキノン誘導体の単離には至らなかった。

さらに、強壯用健康食品への添加が危惧される ED 治療薬アナログ、*N*-Phenylpropenyltadalafil への対応に備え、同化合物の標準品を購入し、各種機器分析データ及び LC-PDA-MS 分析法をまとめた。

平成 12 年より食薬区分の判断基準から錠剤、カプセル剤が事実上除かれたことを受けて、植物素材の濃縮エキス由来の錠剤、カプセル剤が、健康食品として流通することにより、過剰摂取に起因すると思われる健康被害事例が認められている。このような食経験の延長線上で議論することが困難な濃度まで原材料を濃縮して製造される健康食品の出現に対応して、本研究事業では、その食薬区分の判定に、成分本質そのものの判断に加えて、量的な概念に基づく判定基準を導入できるかどうか検討している。今年度は、食薬区分の判断に量的概念を加えた規制のあり方の検討として、ゲニポシド、ゲニピン、センノシドについて、毒性、既存の関連品目の規制値、副作用情報、有害事象報告を調査し、ゲニポシド、ゲニピンについて、薬用量を基準とした改定案をまとめた。

さらに、センノシドにおける量的概念を加えた規制に関する検討の一環として、センナ茎およびハネセンナ（キャンドルブッシュ、ゴールデンキャンドル）を含む製品中のセンノシドの検出・定量を目的とし UPLC-MS を用いた分析法の検討を行った。日局センナと国産ハネセンナ葉を試料として既報の条件を参考に分析を行ったところ、センノシド B のピークに近い保持時間を持つピークが重なっており、分離が不十分であったため、移動相及びグラジエント条件の検討を行い、センノシド B を単独のピークとして検出する条件を見出した。また、得られた LC-MS データを用いてセンナおよびハネセンナの判別分析を行ったところ、Vicenin-II がセンナ特有の指標成分と成り得る可能性が示された。

昨年度に引き続き、非医リスト中の全品目について、基原植物の和名、学名の調査を行い、その結果に基づき、名称変更、同一植物に由来する複数品目の統合、同一項目に包含されている複数植物の分離作業を行い、暫定の改定リスト案をまとめた。名称変更品目は、148 品目、統合品目は、31 品目、分離品目は、6 品目であった。

研究分担者

合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部長
丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部第一室長
内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部第二室長
大塚 英昭 安田女子大学薬学部教授
西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター長
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所
病理部長

A. 目的

無承認無許可医薬品は、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、これらの流通により、適正な医療機会の喪失等、様々な健康被害の発生が懸念される。また、近年、原材料を高濃度に濃縮して製造する健康食品が見受けられることから、従来の成分本質そのものの判断に加え、量的な概念も含めた医薬品成分の規制の在り方について検討することが必要である。さらに、平成 26 年 6 月 12 日より一般用医薬品のインターネット販売が可能となったことから、それに乗じた質の悪

い健康食品の流通量の増加も懸念されている。

このような状況において本研究では、通常のルートを通じて新規に申請のあった成分本質（原材料）については、基原植物、医薬品としての使用実態、含有成分、毒性データ、麻薬・向精神薬・覚せい剤様作用等を調査し、また、市場で流通するグレーゾーンの植物体及び化合物については、さらに含有成分の単離同定、薬理活性の予測等を行い、専ら医薬品に分類すべきであるか検討し、無承認無許可医薬品の監視・取締りを念頭に、必要であれば分析法等を開発する。一方、食経験の延長線上で議論することが困難な濃度まで原材料を濃縮して製造される健康食品に関して、その食薬区分の判定に、成分本質そのものの判断に加えて、いかにして量的な概念に基づく判定基準を導入するか検討する。また、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト（専医リスト）」及び「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）リスト（非医リスト）」について、原材料の基原や使用部位、名称、別名を中心として見直しを行う。

「「専ら医薬品」の調査に関する研究」では、無承認無許可医薬品の調査と分析、有害性評価に関する研究の他の分担研究と連携しながら、文献調査等を行い、医薬生活衛生局監視指導・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・検討を行った。

「「カツアバの基原植物に関する研究」は、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り、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こす恐れがあることから、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ものである。

「「日本国外で流通する何首烏及び関連生薬の基原種調査」は、近年、白首烏配合の健康食品が主に更年期障害を改善する目的で、韓国国内で多く流通し、2015年4月、食品医薬品安全処 (KFDA) が韓国市場に流通する白首烏配合製品を調査した結果、65%の製品に白首烏と形態のよく似た異葉牛皮消が違法に使用されていることが明らかとなったことを受け、現在のところ、日本に医薬品として流通しているのは何首烏のみであり、白首烏及び異葉牛皮消の誤用は報告されていないが、今後、日本でも白首烏配合の健康食品が流通する可能性は高く、それに伴い白首烏の流通が盛んになれば何首烏と誤用される危険性も高まるため、日本国外で何首烏、白首烏、異葉牛皮消として流通する生薬の基原植物種について、成分と遺伝子の両面から実態を調査したものである。昨年度までの研究で、中国で何首烏、白首烏、異葉牛皮消として流通する生薬の基原種調査を行い、中国で流通している白首烏と異葉牛皮消の基原種が韓国で定められているものと異なることを明らかにしたが、本年度は、韓国市場で流通する白首烏等を収集し、その基原種を成分と遺伝子の両面から調べ実態を調査した。

「「沖縄に産するカキノキ科植物であるリュウキュウガキ (*Diospyros maritima*) の成分研究」は、沖縄に産するリュウキュウガキの果実は毒とされているが、時として、「柿」という名称から、誤食の可能性もあるため、毒性を示す成分の検討を行ったものである。

「「N-Phenylpropenyltadalafil の LC-PDA-MS 分析について」は、近年では、国内の市場品から新規の ED 治療薬類縁体の同定は報告されていないが、海外では、依然、様々な新規化合物が報告されており、また、最近では、健康食品に混入されるだけでなく、正規品を装った偽造品による健康被害も発生していることから、海外において新規に流通事例が報告された化

合物群を含有する健康食品が流通した場合に備え、それらの内、*N*-Phenylpropenyltdalafil の標準品を入手し、各種機器分析データ及び LC-PDA-MS 分析法をまとめたものである。

「量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究」では、平成 12 年より食薬区分の判断基準から錠剤、カプセル剤が事実上除かれたことを受けて、植物素材の濃縮エキス由来の錠剤、カプセル剤が、健康食品として流通することにより、過剰摂取に起因すると思われる健康被害事例が認められていることを受けて、食薬区分の判断基準に、含有成分の量的な概念を加えた規制の必要性が指摘されており、毒性情報、規制の際に考慮すべき他の公定規格など、及び医薬品としての副作用情報の調査を行った上で、ゲニポシド、ゲニピンについては、薬用量を基準とした規制案をまとめた。

「LC-MS を用いた Cassia 属ハネセンナおよびセンノシドの分析に関する研究」では、センノシドにおける量的概念を加えた規制に関する検討の一環として、センノシドを含むハネセンナ（キャンドルブッシュ）及びセンナを対象として、LC-MS を用いたセンノシドおよびその類縁化合物の定量分析を目的とした条件検討を行った。

「非医リストの植物基原等の見直しに関する研究」は、専医リストについては、本研究班の前身である「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性及び安全性等の評価に関する研究」（平成 15 年～平成 17 年度）において見直しが行われているが、非医リストについては、長く見直しがなされていないことを受けて、非医リスト見直しの一環として、基原植物の学名、和名を調査し、同一植物素材に由来するにも関わらず、生薬名と植物名などで、別項目として扱われている品目や別植物でありながら、同一項目にまとめられている品目について、整理を行ったものである。

B. 研究方法

B-1. 食薬区分判定の申請を受けた成分本質に関する検討

「専ら医薬品の調査に関する研究」として、主に以下の①～⑩の調査項目について検討した。

- ①名称、他名等、部位等、備考
- ②学名、基原植物和名等、生薬名、英名等
- ③医薬品としての使用実態があるか
- ④毒性データ
- ⑤アルカロイド、毒性タンパク、毒薬劇薬指定成分等を含むか
- ⑥麻薬、向精神薬及び覚醒剤様作用があるもの（類似化合物も含む）及びその原料植物であるか
- ⑦主要な二次代謝産物等
- ⑧主要な生理活性
- ⑨その他注意すべき点
- ⑩指定医薬品または要指示医薬品に相当する成分を含むか

本調査では、原著論文以外に、主に以下の参考文献を使用している。

- 1：日本薬局方（17 局）
- 2：日本薬局方外生薬規格 2015
- 3：（新訂）和漢薬、医歯薬出版（赤松金芳）
- 4：中薬大辞典、小学館
- 5：The Complete German Commission E Monographs Therapeutic Guide to Herbal Medicines, The American Botanical Council (Com E)
- 6：Botanical Safety Handbook, American Herbal Products Association
- 7：Dictionary of Plant Toxins, Jeffery B. Harborne FRS, Herbert Baxter, Willey
- 8：WHO Monographs on Selected Medicinal Plants
- 9：ブラジル産 薬用植物事典（橋本悟郎）
- 10：和漢薬百科図鑑（難波恒雄）
- 11：原色牧野和漢薬草大図鑑、北隆館
- 12：（原色）牧野植物大図鑑：北隆館

- 13：日本の野生植物，平凡社
- 14：園芸植物大辞典，小学館
- 15：世界の植物，朝日新聞社
- 16：中国薬典 2015

B-2. 食薬区分のグレーゾーンに位置する植物体及び化合物に関する検討

「カツアバの基原植物に関する研究」として、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ついて分析を行った。塩基配列解析においては、粉末及びカプセルのものはそのまま使用し、葉を刻んだ状態のものは、ミキサーにより粉碎してから使用した。これらの粉末より、自動核酸抽出装置あるいは DNeasy Plant Mini Kit を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。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。得られた PCR 産物を Min Elute PCR Purification Kit 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。得られた塩基配列の多重配列解析は、GENETYX の Multiple Alignment により行った。

また、「日本国外で流通する何首鳥及び関連生薬の基原種調査」として、韓国市場で流通する白首鳥等を収集し、その基原種を成分と遺伝子の両面から調べ実態を調査し、中国市場流通の製品と比較検討した。本研究に使用した何首鳥、白首鳥および異葉牛皮消（耳葉牛皮消）は、韓国ソウル市京東市場（薬令市場）内の生薬店にて購入した。また、本研究のために、*C. wilfordii* Hemsley 及び *C. auriculatum* Royle ex Wight の植物標本の一部を、高知県立牧野植物園及び国立科学博物館筑波実験植物園から提供いただいた。*C. wilfordii* Hemsley を九州の2箇所から採集した。また、*P. multiflorum* Thunberg は武田薬品工業株式会社京都薬用植物園及び日本新薬株式会社山科植物資料館から DNA 解析用試料として提供をうけた。

高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）による成分分析では、HPTLC Silica gel 60 F254 Glass plate (20×10 cm) を用い、検出は、紫外線 (UV) 照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液（局方に準拠して調製）により行った。

塩基配列解析では、粉末にした生薬試料より DNeasy Plant Mini Kit 及び QIAcube を用いて DNA を抽出した。核 rDNA の Internal transcribed spacer region (以下 ITS 領域)、葉緑体 DNA *trnL-trnF* intergenic spacer (以下 *trnL-trnF* 領域)、同じく葉緑体 DNA *trnH-psbA* intergenic spacer region (以下 *trnH-psbA* 領域) に特異的なプライマーを用い、PCR 反応を行った。PCR 反応により得られた増幅産物は、MiniElute PCR Purification Kit を用いて精製し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。これら配列について、BLAST 相同性検索及び種の同定された植物標本や植物体由来の遺伝子配列との比較により、基原種を推定した。

さらに、「沖縄に産するカキノキ科植物であるリュウキュウガキ (*Diospyros maritima*) の成分研究」として、先島諸島八重山郡竹富町で採集したリュウキュウガキ (*D. maritima*) の葉を材料に成分分析を行った。採集試料を MeOH で抽出し、濃縮残渣を水に懸濁して、EtOAc で分配して EtOAc 可溶画分と水可溶画分を得た。水画分はさらに 1-BuOH と分配して 1-BuOH 画分を得た。1-BuOH 画分を Diaion HP-20, silica gel カラムクロマトグラフィーで精製して化合物を単離し、核磁気共鳴スペクトルを中心とする、機器分析によってその構造を明らかとした。

また、「*N*-Phenylpropenyltadalafil の LC-PDA-MS 分析について」では、*N*-Phenylpropenyltadalafil の標準品は、TLC Pharmachem 社より購入し、ED 治療薬及びその類縁体を含有する健康食品は、当研究部の試験業務により、当該化合物を含有することが既に確認されていた 3 製品を用いた。ED 治療薬及びその類縁体を含有する健康食品は、1%ギ酸

溶液/アセトニトリル (1/4) を加え, 10 分間振とう抽出を行い, 遠心分離した上清を用いた. 各製品由来の抽出液に, 標準溶液 A を 30 μ L スパイクしたものを分析用試料とした. これらを対象として, LC-PDA-MS 分析の条件について検討した.

B-3 量的概念に基づく判定基準に関する検討

「量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究」として, ゲニポシド, ゲニピン, センノシドについて, 毒性, 既存の関連品目の規制値, 副作用情報, 有害事象報告を調査した. 毒性情報調査は, RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances) 及び Botanical Safety Handbook などによった. 副作用情報は, 医薬品医療機器総合機構が提供する医薬品副作用データベースを利用した. その他の情報は, 以下の公定書, 書籍を参照するとともに, 必要に応じて, Google Scholar による関連文献情報の検索を行った.

- ・ 第 17 改正日本薬局方
- ・ 日本薬局方外医薬品規格 2002 (局外規)
- ・ 日本薬局方外生薬規格 2015 (局外生規)
- ・ 食品添加物公定書第 8 版
- ・ 医薬部外品原料規格 2006
- ・ 日本医薬品情報センター編, 一般用医薬品集 2017
- ・ 日本医薬品情報センター編, 医療用医薬品集 2017
- ・ 第 24 回生薬に関する懇談会『山梔子』講演要旨集
- ・ 局方医薬品承認申請の手引

また, 「LC-MS を用いた *Cassia* 属ハネセンナおよびセンナの分析に関する研究」では, 実験材料として, 栽培品のハネセンナ *Cassia alata* は国立研究開発法人医薬基盤・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供与された植物体の一部 (花, 植物体上部の主茎と葉, 植物体中部の主茎と側枝およ

び側枝の葉, 植物体下部の主茎) を使用した. 市販の日局センナ (5 種), 栽培品のハネセンナ葉 (2 種), について, ミキサーにて粉碎し, 得られた粉末試料を 70% MeOH に懸濁し, 超音波処理 (10 min) の後遠心分離し, 上清を分離して試料溶液とした. LC-MS 分析には Q Exactive Quadrupole-Orbitrap ハイブリッド型質量分析計を使用し, 測定データをメタボローム解析ソフトウェア Progenesis QI ver. 1.0 で処理し, ピークの検出 (ピーク強度, 保持時間 (RT), 質量数 (m/z)), アライメントを行い, EzInfo でデータマトリクスを作成を行った. このデータマトリクスを SIMCA Ver. 14 を用いて判別分析を行った.

B-4 専医リスト及び非医リストの植物基原等の見直し

「非医リストの植物基原等の見直しに関する研究」では, 平成 28 年 10 月 12 日 薬生発 1012 第 1 号, 厚生労働省医薬・生活衛生局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締について」の別添として例示されている「医薬品的効能効果を標榜しない限り医薬品と判断しない成分本質 (原材料) リスト (非医リスト)」について, 原材料の基原種の和名及び学名を調査した. 平成 13 年 3 月 27 日付の「専ら医薬品リスト」発出時の主要メンバーである佐竹元吉博士 (元国立医薬品食品衛生研究所生薬部長) らが編集した「健康・機能的食品の基原植物事典」に記載の基原種を基に, 学名については,

- 1) The Plant List (<http://www.theplantlist.org/>),
- 2) International Plant Name Index (<http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearch.page.do>),
- 3) YList (<http://ylist.info/index.html>) を用いて現在通用している学名を調べた. 和名については, 同書籍の記載及び上記調査で明らかになった学名を基に, YList を用いて調査した.

改定リストの作成に当たっては、現在のリストでは、名称が、生薬名のものと植物名のものが混在していることから、植物和名を名称とすることで統一を図った。ただし、複数の基原植物を持つ生薬を、別項目として扱うのは、利便性の点で難があるため、そのような品目は、生薬名を名称とし、他名に、全ての基原植物を列記した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び実験動物を使用しておらず、該当する事由はない。

C. 結果・考察

C-1. 食薬区分判定の申請を受けた成分本質に関する検討

「専ら医薬品」の調査に関する研究」において、フコシルラクトースは、人類の初乳に含まれている成分で、EFSAからも新規食品成分として認められており、経口での LD50 値も 5000mg/kg 以上であり、また医薬品成分としての使用も現在のところ特になく考えられるので、非医薬品成分と考えられた。なお、名称は、正確に 2'-O-フコシルラクトースとすべきものと考察した。

ヒドロキシアパタイトは魚骨等に含まれる成分で、今回はホタテ貝殻由来のものと考えられた。本物質は、経口での安全性が高いことが示されており、非医薬品成分と考えら得た。ただし、基原の差でX線回折のデータが微妙に異なり、また熱処理の有無によっても、化学組成が変化することから、基原の定義が重要であるものと考察した。

ゴミシは、チョウセンゴミシの果実で、日本薬局方に収載されており、医療用 5 処方、一般用 17 処方に使用される重要生薬であり、日本では伝統的に医薬品と考えられ、専ら医薬品に指定されている。また BSH において医薬品との相互作用（特に肝臓代謝）が多数報告されており、また肝炎治療薬 Biphenyldimetyl-

dicarboxylate(BDD)の発見の経緯となった生薬でもある。一方で、韓国では食経験が豊富とされている。含有成分的には、リグナンの gomisin A と schzandrin が著名で、それぞれが 0.2-0.3%及び 0.4-0.6%と、天然物としては高含量で含まれていると報告がある。RTECS で gomisin A を検索すると、経口、マウスで、それぞれ LD50 値 777mg/kg, 1448mg/kg となっており、特に前者は劇薬基準 (300mg/kg) の 2.5 倍の値を示し、かなり危険な化合物と考えられる。また、これらの成分について、多くの一般薬理試験が実施された結果、効果として、睡眠、全身活動の低下、体温低下がみられている。また、中枢試験で、ヘキサバルビタールナトリウム催眠延長作用が LD50 値の 1/40 で発現し、持続性の運動抑制作用から、中枢抑制作用、あるいはトランクライザー様作用があると報告されている。これらの結果を考えると、日本で専ら医薬品としての使用実態だけでなく、薬理活性的にも、処方箋薬相当の成分を含むと判断出来る可能性があるものと考えられる。また、機能性として示されている論文は、動物実験ではあるが、肝保護作用、抗高血圧作用、血糖降下作用、心臓保護作用など、処方箋薬相当の効果を目指したものである。従って、本品については、医薬品の成分本質ワーキンググループでの議論が重要と考えられた。

化学物質では、β-アラニンについて調査依頼があったが、本品は、魚肉や鳥胸肉といった筋肉に豊富に含まれ、食経験が十分にあり、特に問題となる毒性も見られず、EFSA でも安全性への懸念はもたらさないと結論づけられており、また医薬品としての使用実態がないことから、非医であるものと考察した。

一方で、ED 治療薬であるシルデナフィル類縁物質であるデスカルボンシルデナフィルは、PDE5 の活性発現部に結合し、また実際に阻害活性を持つこと、さらに処方箋薬であるシルデナフィル様の作用を意図して合成されたものと考えられることから、専ら医薬品に指定すべき

成分本質と判断されると考察した。

これらの情報は、平成 30 年 2 月 19 日に開催された食薬 WG における基礎資料となった。

C-2. 食薬区分のグレーゾーンに位置する植物体及び化合物に関する検討

「カツアバの基原植物に関する研究」では、13 検体について植物の核 rDNA 領域に保存性の高い配列に設計された共通プライマーを用いた PCR 増幅を行ったところ、3 検体は、国際塩基配列データベースに登録されている *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。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。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。

Erythroxyllum 属特異的プライマーを用いた増幅では、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。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。一方、国内市場の 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。

Trichilia 属特異的プライマーを用いた増幅では、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。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。一方、国内市場の 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。

特異的プライマーを用いた増幅の結果、アメリカ市場品 6 検体から *Erythroxyllum* 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、*Erythroxyllum* 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る。

「日本国外で流通する何首烏及び関連生薬の基原種調査」では、韓国市場で入手した何首烏及び白首烏とラベルされた計 7 ロットについて、高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による成分分析、及び遺伝子配列解析に供し、昨年度分析した中国市場品の分析結果と比較検討した。

生薬購入時に何首烏とラベルされていた検体のうち、中国市場品はすべて生薬名から予想される基原種と遺伝子から推定される基原種が一致した。一方韓国市場では *C. auriculatum* 由来のものが何首烏として取引されていた。日本薬局方「カシュウ」の確認試験項目で規定されている確認成分はスチルベン配糖体であり、主波長 366 nm の紫外線照射をした際に R_f 値 0.3 付近にみられる青白色のスポットだが、本研究の HPTLC 分析では *C. wilfordii* や *C. auriculatum* 由来と推定される生薬には本スポットは認められなかった。このことから、日本において、基原種の異なる種が局方医薬品として流通する何首烏と誤用される可能性は低いと考えられた。

異葉牛皮消の基原種である *C. auriculatum* 由来のものが白首烏として扱われていることが、本研究でも確認された。本研究で調べた白

首烏とラベルされた生薬のほとんどが *C. auriculatum* 由来のものであった。白首烏の基原植物を公に定義しているのは韓国のみであり、中国の薬局方である中国薬典には白首烏、異葉牛皮消ともに収載されていない。中国で扱われる生薬を記載している中薬大辞典には両生薬に関する記述があるが、白首烏 [bai-shou-wu] の基原植物は *C. auriculatum* Royle ex Wight とされており、韓国で白首烏の基原植物とされる *C. wilfordii* の根は隔山消 [ge-shan-xiao] と記されていた。さらに、白首烏の別名として隔山消が、隔山消の別名として白首烏が挙げられており、両生薬の区別が曖昧であることが推察されたうえ、どちらかといえは *C. auriculatum* の根が白首烏として認識されているように思われた。中国から報告された白首烏を題材とした科学論文でも、*C. auriculatum* と *C. wilfordii* の両方が bai-shou-wu (白首烏) の基原として記述されていた。このような背景が、白首烏とラベルされた中国市場品のほとんどが *C. auriculatum* 由来のものである一因と考えられた。

一方、白首烏の公的規格が整備されている韓国の市場品でも、*C. auriculatum* が白首烏として扱われている事例がみられた。また、ひとつのロットに *C. wilfordii* と *C. auriculatum* 由来のものが混在しているという事例も確認された。両者の外観は酷似しているため、白首烏を扱い慣れていない者には誤った基原種の混入を見極めることは困難であると思われた。また、今回初めて、白首烏として流通するものなかに、*C. wilfordii* でも *C. auriculatum* でもない種の不明な *Cynanchum* 属由来のものが含まれていることが判明した。

「沖繩に産するカキノキ科植物であるリュウキュウガキ (*Diospyros maritima*) の成分研究」では、リュウキュウガキの葉 MeOH 抽出液より単離した化合物は、比旋光度-31.6 を示す無色針状結晶として得られ、赤外線吸収スペクトル、高分解能質量分析、¹H-NMR、¹³C-NMR、二

次元 NMR スペクトルによる解析の結果、カルボニル基、二個の一級水酸基および酸素官能基を有する三級炭素からなるカウラン型ジテルペンであろうと予想された。

「*N*-Phenylpropenyltadalafil の LC-PDA-MS 分析について」では、海外の健康食品市場に流通する製品から検出事例が報告された *N*-Phenylpropenyltadalafil の標準品を購入し、各種機器分析データ及び LC-PDA-MS による分析法をまとめた。本分析法の有用性を確認するために、ED 治療薬及びその類縁体が含まれていることが既知の健康食品製品から調製した試料溶液に、各化合物の標準溶液を一定量、添加し、同様に分析を行った。*N*-Phenylpropenyltadalafil と同じ質量数 504 を持つ化合物として、hydroxyhomosildenafil, homothiodenafil が存在することから、これらは、質量分析計による分離が不可能であり、*N*-Phenylpropenyltadalafil の分析法を考える上では、両化合物とカラム分離することが要求されるが、それぞれの化合物を含有することが既知の健康食品製品を用いて確認を行ったところ、いずれの成分も良好な分離を示した。

C-3 量的概念に基づく判定基準に関する検討

「量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究」において、ゲニポシド、ゲニピン、センノシドについて、毒性、既存の関連品目の規制値、副作用情報、有害事象報告を調査した。

ゲニポシドは、クチナシの果実に含まれるイリドイド配糖体の一つである。局方収載生薬サンシシは、このクチナシの果実由来する生薬であり、その利胆作用は、ゲニポシドが、腸管で加水分解されて生成したゲニピンが、肝臓中で、トランスポーター Mrp2 の発現誘導、胆管膜上への移動を促進することにより、ビリルビンの排泄を促すことによるものと推測されている。このため、日局では、サンシシに対してゲニポシド 3.0%以上を含むと規定している。一方で、クチナシは、黄色色素クロシンを含むこと

から、食品添加物としても利用されており、食品添加物公定書には、クチナシ黄色素、クチナシ青色素、クチナシ赤色素が収載されている。この内、クチナシ黄色素には、純度試験としてゲニポシド0.5%以下（色価100換算）が規定されているが、この規格は、ゲニポシドの毒性によるものではなく、被添加食品中のタンパク質とゲニピンが反応して青色色素を生成することにより、黄色色素としての品質の低下を招くことを阻止するためのものである。なお、クチナシ青色素は、この性質を利用して調製されている。他に、関連する公定書上の規格としては、医薬部外品原料規格2006に、クチナシエキス、クチナシ青液、クチナシ黄が収載されているが、ゲニポシド、ゲニピンの含量についての規格は、設定されていない。医薬部外品は食薬区分上、医薬品として扱われ、今回の量的規制の検討の妨げにはならないため、上記品目のゲニポシド、ゲニピン含量の調査は行わなかった。

ゲニポシド、ゲニピンの毒性情報を RTECS により検索した結果、ゲニポシドについては、in vivo での毒性情報は、認められなかった。一方、ゲニピンの毒性については、千葉大の原田ら（後の国立衛生試験所生薬部長）による報告があり、マウスにおける LD50 値は、経口で、237 mg/kg、腹腔で、190 mg/kg、静注で、153 mg/kg であった。食薬区分の判断の際に参考とすべき、経口投与における毒性値は、劇薬相当である。ゲニポシドが、生体中でゲニピンに代謝されることを考え合わせると、ゲニポシドとゲニピンの和として、量的規制を考える必要がある。

医薬品としての副作用情報については、サンシシを単味で用いることはないことから、サンシシを配合する代表的な漢方処方に対して検索を行った。その結果、加味逍遥散、黄連解毒湯、辛夷清肺湯、茵陳蒿湯において、腸間膜静脈硬化症や肝障害の報告が見られ、特に、前3者での報告が多かった。日本漢方生薬製剤協会による生産動態調査（2014年）における、これらの処方の生産高順位は、記載順に5, 34, 49,

79位であり、症例数の多寡は、使用量を反映したものと思われる。上記4処方の添付文書には、副作用情報として腸間膜静脈硬化症と肝機能障害についての記載が共通して見られる。この内、腸間膜静脈硬化症については、病理所見として、患者の患部に青色色素の沈着が認められることから、直接的なエビデンスはないものの、サンシシ中のゲニポシド及びその代謝物であるゲニピンが、本症状に関与していると推測されている。

これらの漢方処方中のゲニポシド含量としては、加味逍遥散と黄連解毒湯について、日局の規定があり、25-135 mg である。

以上のことから、ゲニポシドの量的規制としては、最小の薬用量である25 mgより十分に低い値として、2.5 mgを設定し、ゲニピンとの和として規制すべきと考える。

ゲニポシド類の含有植物としては、クチナシを含めて、アカネ科植物が多く、他に、シソ科、クマツヅラ科植物などからも報告がある。このため、ゲニポシド、ゲニピンを含む全ての植物素材に、この規制値を適用した場合、予期せぬ植物素材が規制対象となり、流通、生産阻害を引き起こす恐れがある。このことから、規制の範囲については、クチナシに限定するのが望ましいと思われる。

以上の結果を反映させた非医リスト改正案として、「名称：サンシシ、他名等：クチナシ、部位：果実・茎・葉、備考：ゲニポシドとゲニピンの一日摂取量の和が2.5mgを超えるものは「医」」、が提案された。

一方、センノシドは、センナやダイオウに含まれるビスアンスロン誘導体である。センノシドは体内でβ-グルコシダーゼにより糖が外れてセニジンとなり、さらに代謝され、レインアンスロンとなり、大腸壁を刺激して蠕動運動を活発にして瀉下作用をもたらすとされている。

センナについては、日局では、センナ及びセンナ末に対して、総センノシド[センノシドA

及びセンノシドB] 1.0%以上を含むと規定している。また、局外規では、センナエキスに対して、センノシドAとして15.0~25.0%を含むと規定している。さらに、局外生規では、センナ実に対して、総センノシド[センノシドA及びセンノシドB] 1.0%以上を含むと規定している。

また、ダイオウ及びダイオウ末に対しては、センノシドA 0.25%以上を含むと規定している。さらに、局方収載の漢方処方中のセンノシド含量については、大黄甘草湯エキスは、センノシドA : 3.5 mg 以上 (ダイオウ 4 g 処方)、桃核承気湯エキスは、センノシドA : 3 mg 以上 (ダイオウ 3 g 処方)、乙字湯エキスは、センノシドA : 0.5 mg 以上 (ダイオウ 0.5 g の処方)、センノシドA : 1 mg 以上 (ダイオウ 1 g の処方) と規定されている。

なお、食品添加物公定書第8版及び医薬部外品原料規格 2006 に、センナ及びダイオウについての収載はなかった。

センノシドの毒性情報を RTECS 及び Scifinder により検索した結果、Marvola らの報告によると、マウスにおける LD50 値は、センノシドA及びBの総量として、経口では 5000 mg/kg 以上、静注では 4100 mg/kg であった。また、20%センナエキスの LD50 値は、経口では 5000 mg/kg 以上、静注では 171 mg/kg であった。また、Mengs の報告では、ラット及びマウスにおける LD50 値は、センノシドとして、経口では約 5000 mg/kg であった。従って、食薬区分の判断の際に参考とすべき、経口投与における毒性値としては、センノシドA、Bの総量についての毒性は低いと考えられた。一方、センナエキスとしての毒性は静注では劇薬基準 (<100 mg/kg) より低いものの注意すべき値であると考えられた。

医薬品としての副作用情報については、(センノシド内用薬) として、嘔吐、無力症、死亡、薬物性肝障害、胃腸炎、帯状疱疹、血中ナトリウム減少、痙攣発作、多発性硬化症再発、好酸球増加と全身症状を伴う薬物反応など、(セン

ナ・センナ実内用薬) として、全身性皮疹、薬疹の報告があった。また、Botanical Safety Handbook では、センナの葉及び果実 (さや) : クラス 2d に分類されている。

また、センナ及びダイオウの成分として、同様に瀉下作用を有するレインなどのアントラキノン類の含量についても検討する必要があると考えられ、センノシドの規格値については今後も継続して検討することとなった。

また、「LC-MS を用いた *Cassia* 属ハネセンナおよびセンナの分析に関する研究」では、市販の日局センナ抽出物を用いて既報の条件を参考に、ギ酸水溶液—ギ酸アセトニトリル系、ギ酸水溶液—アセトニトリル系の溶媒にて LC-MS の分析条件を検討したが、いずれの条件においても Sennoside B と Sennoside 類縁体と予測されるピークを分離できなかった。最終的に、ギ酸水溶液—ギ酸メタノール系にて Sennoside B に重なっていたと考えられるピークを分離することができた。そこで、本条件にて市販のセンナ5種および種子島産ハネセンナ2種を分析し、これらのサンプルより得られた LCMS データについてセンナ・ハネセンナのグループで判別分析 (Scalling: palato) を行った。その結果、LC-ESI-(+)-MS, LC-ESI-(-)-MS それぞれのスコアプロット上でいずれもセンナ、ハネセンナの2つのグループに分かれる事が確認できた。さらに、LC-ESI-(+)-MS (Fig. 7) の S-Plot より、センナの指標成分として Tinnevellin glucoside 及び Vicenin- II を見出した。また、LC-ESI-(-)-MS の S-Plot からは、センナの判別の寄与成分として、Sennoside A 及び Sennoside B を同定した。

C-4 専医リスト及び非医リストの植物基原等の見直し

「非医リストの植物基原等の見直しに関する研究」では、研究方法に記載のルールに従い、非医リストの整理を行い、暫定の改定リスト案をまとめた。見直しの結果、名称変更品目が、

148 品目、複数項目を統一した品目が、31 品目（インドカラタチ、ウスベニアオイ、オウギ、オオムギ、キバナシユスラン、ギムネマ、クズ、クスノキ、クロスグリ、ケイヒ、コゴメグサ、コパイバ、サクリュウカ、スマレ、セイタカミロバラン、セイヨウシナノキ、セイヨウヒメスノキ、センリョウ、タンポポ、チョウジ、トウガラシ、トケイソウ、パウダルコ、プエラリアミリフィカ、ブッソウゲ、マツヨイグサ、ムラサキフトモモ、ユウガオ、ルイボス、ローズヒップ）、一つの項目を複数品目に分離したものが、6 品目（ガウクルア、イチヤクソウ、ウメガサソウ、ガマ、サイカチ、ブラッククミン）であった。この内、分離品目については、それぞれ、他名に記載のアカガウクルア、ロクテイソウ、オオウメガサソウ、ヒメガマ、トウサイカチ、ニゲラを別品目とした。また、元品目のガウクルアとブラッククミンは、それぞれ、プエラリアミリフィカ、クロタネソウに名称変更を行った。

D. 結論

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。なお、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。

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く、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。今回の国内の結果に関しては、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。

白首烏配合製品について、中国や韓国では流通実績があるものの、両国において白首烏の基原植物とされる種が一致していないことや、公的規格が整備されている韓国でも白首烏とされるもののなかに誤った種由来のものが混入されていたという実態が明らかとなり、そのため、「白首烏」を入手したつもりでも、ラベルの確認だけでは入手するたびに品質が大きく異なるという危険性がある。日本では白首烏の流通実績はほとんどないが、今後、健康食品などとして日本で流通する可能性は高く、上述のように定義の曖昧な原料を健康食品等で使用する場合、異物同名が存在しないかなどを見極め、安全性を十分に確保する必要がある。

沖縄県八重山郡竹富町で採集したリュウキユウガキの葉の成分検索を行い、3 種のカウレン誘導体といくつかのフラボンの配糖体を単離したが、ナフトキノン誘導体の単離には至らず、引き続き検討が必要である。

強壯用健康食品への添加が危惧される ED 治療薬アナログの内、N-Phenylpropenyltadalafil への対応に備え、同化合物の各種機器分析データ及び分析法をまとめることができた。

食薬区分の判断に量的概念を加えた規制のあり方の検討として、ゲニポシド、ゲニピン、センノシドについて、毒性、既存の関連品目の規制値、副作用情報、有害事象報告を調査し、ゲニポシド、ゲニピンについては、薬用量を基準とした改定案をまとめることができた。

センノシド A, B 及びセンノシド B に近接し

たピークを分離する LC 分析条件を見出すことができた。その条件下で日局センナとハネセンナ葉を試料として LCMS データを用いた判別分析を行い、センナの寄与成分として Tinnevellin glucoside, Vicenin-II, Sennoside A 及び Sennoside B の 4 種の化合物を同定した。中でも、Vicenin-II もその化学的安定性から有効な指標成分と成り得る可能性が示された。

非医リスト見直しの一環として、基原植物の学名、和名を調査し、同一植物素材に由来するにも関わらず、生薬名と植物名などで、別項目として扱われている品目や別植物でありながら、同一項目にまとめられている品目の整理を行い、抽出された見直し対象品目について、今後の作業の方向づけを行うとともに、成分情報の取得を行った。

E. 研究発表

論文発表等

- 1) N. Sato-Masumoto, T. Uchikura, H. Sugiwaki, M. Yoshimura, S. Masada, T. Atsumi, M. Watanabe, N. Tanaka, N. Uchiyama, Y. Amakura, T. Hakamatsuka. Survey on the original plant species of crude drugs distributed as *Cynanchi Wilfordii* Radix and its related crude drugs in the Korean and Chinese markets. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1693-1699 (2017).
- 2) 合田幸広：機能性表示食品（届出企業）に求められる品質保証の考え方，薬理と治療，**45**(11)，1751-1753 (2017)。
- 3) 合田幸広：薬用植物の規制と食薬区分機能性，アグリバイオ **28**(2)，28-32 (2018)。
- 4) Tokumoto, H., Shimomura, H., Hakamatsuka, T., Ozeki, Y. and Goda, Y.: Fluorescence coupled with macro and microscopic examinations of morphological phenotype give key characteristics for

identification of crude drugs derived from scorpions. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 510-523 (2018).

学会発表等

- 1) 合田幸広，機能性表示食品の品質保証について，IFIA（国際食品素材/添加物会議）Japan 2017 会議棟セミナー，東京（2017.5）。
- 2) 合田幸広，機能性表示食品（届出企業）に求められる品質保証の考え方，メディカルライター協会セミナー，東京（2017.7）。
- 3) 合田幸広，機能性関与成分の定義を考える，日本アントシアニン研究会第 6 回研究会，東京（2017.7）。
- 4) 合田幸広，機能性表示食品の品質保証について 1，JADMA セミナー（2017.7）。
- 5) 合田幸広，機能性表示食品の品質保証について 2，JADMA セミナー（2017.8）。
- 6) 合田幸広，機能性表示食品の表示と機能性表示食品，日本食品化学学会第 33 回食品化学シンポジウム（2017.10）
- 7) 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（2018.3.）

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査・分析及び量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所薬品部長 合田幸広

「専ら医薬品」の調査に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所薬品部長 合田幸広

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、依頼のあった植物由来 1 品目、動物由来 2 品目及び化学的等 2 品目の本質について文献調査等を行った。その結果、天然物ではゴミシを除き非医薬品成分であるものと考えられた。ゴミシは、含有成分として、gomisin A (0.2-0.3%)及び schizandrin(0.4-0.6%)を天然物としては高含量で含んでおり、これらの成分は、中枢神経作用も予想される強い薬理活性を持つことから、医薬品の成分本質ワーキンググループでの議論が重要と考えられた。デスカルボンシルデナフィルは、PDE5の活性発現部に結合し、また実際に阻害活性を持つことから、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。

研究協力者

大塚英昭 安田女子大学薬学部教授

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、医薬品の範囲に関する基準（直近の改正：平成 28 年 10 月 12 日薬生発第 1012 第 1 号、厚生労働省医薬局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」）に基づき行われる。本基準は、主に成分本質（原材料）、効能効果、形状、用法用量の 4 要素に分けられるが、本研究では、特に成分本質（原材料）により無条件に「専ら医薬品」と判断されるべき成分本質について調査を行うものである。

分担研究者らは、平成 15 年度より、本研究班の前身である「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性及び安全性等の評価に関する研究」において、平成 13 年 3 月 27 日付の「専ら医薬品リスト」に収載された 331 品目について、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性及び安全性の評価に関する研究」として、これらの品目について、徹底的な調査・分析を行い、最終的に「A 安全性に十分な配慮が必要であり、専ら医薬品と考えられる、B 国内外を含め医薬品として使用実態があり、専ら医薬品と考えられる、C さらに調査を続ける必要がある、D 現在のところ判断データがない、E 医薬品としての使用実績が乏しく、含有成分等からも食薬区分の見直し対象となり得ると考えられる」の 5 段階の評価

を行って来た。また、現在食薬区分上分類がなされていない新規成分本質（原材料）について、国内外の医薬品としての使用実態、毒性、麻薬様作用、含有成分の構造等に基づき、食品又は医薬品のどちらに分類すべきものであるか調査を行い、さらに判断の根拠となる各種実験を行ってきた。その結果を基礎に、平成19年4月に医薬品の範囲に関する基準が大改正（平成19年4月17日 医薬発第1115003号）され、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）が321成分（植物由来242、動物由来21、その他58）となった。さらに引き続き「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究において新規に申請のあった成分本質（原材料）や、近年、違法ドラッグ取り締まり等で新たに発見される化合物等について食薬区分の検討を行い、前述した平成28年の通知では、専ら医薬品として使用される成分本質は、336成分（植物由来236、動物由来21、その他79）となった。

本研究では、無承認無許可医薬品の調査と分析、有害性評価に関する研究の他の分担研究と連携しながら、文献調査等を行い、医薬生活衛生局監視指導・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・検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

調査項目は、主に以下の①～⑩である。

- ①名称，他名等，部位等，備考
- ②学名，基原植物和名等，生薬名，英名等
- ③医薬品としての使用実態があるか
- ④毒性データ
- ⑤アルカロイド，毒性タンパク，毒薬劇薬指定成分等を含むか

⑥麻薬，向精神薬及び覚醒剤様作用があるもの（類似化合物も含む）及びその原料植物であるか

⑦主要な二次代謝産物等

⑧主要な生理活性

⑨その他注意すべき点

⑩指定医薬品または要指示医薬品に相当する成分を含むか

本調査では、原著論文以外に、主に以下の参考文献を使用している。

1：日本薬局方（17局）

2：日本薬局方外生薬規格2015

3：（新訂）和漢薬，医歯薬出版（赤松金芳）

4：中薬大辞典，小学館

5：The Complete German Commission E Monographs Therapeutic Guide to Herbal Medicines, The American Botanical Council (Com E)

6：Botanical Safety Handbook, American Herbal Products Association

7：Dictionary of Plant Toxins, Jeffery B. Harborne FRS, Herbert Baxter, Willey

8：WHO Monographs on Selected Medicinal Plants

9：ブラジル産 薬用植物事典（橋本梧郎）

10：和漢薬百科図鑑（難波恒雄）

11：原色牧野和漢薬草大図鑑，北隆館

12：（原色）牧野植物大図鑑：北隆館

13：日本の野生植物，平凡社

14：園芸植物大辞典，小学館

15：世界の植物，朝日新聞社

16：中国薬典2015

これらの参考文献のうち、①名称で規定する基原植物を確定するために、まず、日本の公定書である文献1,2を優先した。次いで、

和漢薬と考えられるものでは、医薬品の範囲に関する基準、別添1で参考文献に指定されている、文献3,4での記載を優先し、次いで、10~16等の記載内容等を考慮し、最も相応しいと考えられるものを選択した。また、欧米で用いられている生薬、ハーブについては、同様に別添1で記載のある5,6,7,8の記載について優先的に考慮し、他文献も踏まえて最も相応しいと考えられるものを選択した。また、南米原産の植物(生薬、ハーブ)については9の記載を、主に参考とした。さらに、英名については、主に文献5,6を参考とした。なお、局方での生薬の正名は、カタカナであるが、通知での生薬名は、参考情報であるので、基本的に、より情報が多い漢字で記載した。

③は、文献1-2,5,USP,新一般用漢方処方の手引き(じほう,通称新210処方),JAPICの日本医薬品集(医療用,一般用)並びに、インターネット等の情報を参考にした。医薬品としての使用実態は、日本で医薬品並びにその成分として承認されている場合(新210処方の構成生薬である場合を含む)、文献5(ComE)やUSPに記載されている場合には、使用実態があるとしたが、文献3,4,9,10,16等に記載されているだけでは、使用実態があるとはしなかった。

④は、②の基原植物の学名や英名を、植物毒性データベースであるRTECSで検索するとともに、Merck Index等の情報も参考とした。また、学名に対応するデータがない場合には、同属植物のデータも学名とともに記載した。さらに、基原植物が含有する化合物の毒性データについても、ここに記載した。

⑤,⑥,⑦は、学名でケミカルアブストラ

クツ(CA)検索した要旨並びに原著論文を参考にするとともに、文献7,10並びにPhytochemical Dictionary (Jeffery B. Harborne FRS, Herbert Baxter, Gerard P. Moss)等を参考にした。

⑧は、学名でケミカルアブストラクツ検索した要旨並びに原著論文,Phytochemical Dictionary並びに、文献4,10,11等を参考にした。

⑨は、①-⑧以外の情報で、インターネットを中心にして情報を収集した。

⑩は、日本医療用医薬品集(じほう),JAPIC一般用医薬品集(JAPIC)等を参考とした。

C. 研究結果と考察

今年度、新規に調査依頼があったもののうち、次の3品目が天然物であった。

フコシルラクトースは、人類の初乳に含まれている成分で、EFSAからも新規食品成分として認められており、経口でのLD50値も5000mg/kg以上であり、また医薬品成分としての使用も現在のところ特になく考えられるので、非医薬品成分と考えられた。なお、名称は、正確に2'-O-フコシルラクトースとすべきものと考察した。

ヒドロキシアパタイトは魚骨等に含まれる成分で、今回はホタテ貝殻由来のものと考えられた。本物質は、経口での安全性が高いことが示されており、非医薬品成分と考えら得た。ただし、基原の差でX線回折のデータが微妙に異なり、また熱処理の有無によっても、化学組成が変化することから、基原の定義が重要であるものと考察した。

ゴミシは、チョウセンゴミシの果実で、日本薬局方に記載されており、医療用5処方、一般

用 17 処方中使用される重要生薬であり、日本では伝統的に医薬品と考えられ、専ら医薬品に指定されている。また文献 6 (BSH) において医薬品との相互作用（特に肝臓代謝）が多数報告されており、また肝炎治療薬 Biphenyldimethyl-dicarboxylate (BDD) の発見の経緯となった生薬でもある。一方で、韓国では食経験が豊富とされている。

含有成分的には、リグナンの gomisin A と schzandrin が著名で、それぞれが 0.2-0.3%及び 0.4-0.6%と、天然物としては高含量で含まれていると報告がある。 RTECS で gomisin A を検索すると、経口、マウスで、それぞれ LD50 値 777mg/kg, 1448mg/kg となっており、特に前者は劇薬基準(300mg/kg)の 2.5 倍の値を示し、かなり危険な化合物と考えられる。また、これらの成分について、多くの一般薬理試験が実施された結果、効果として、睡眠、全身活動の低下、体温低下がみられている（薬学雑誌 1981 年、101 巻、1030）。また、中枢試験で、ヘキソバルビタールナトリウム催眠延長作用が LD50 値の 1/40 で発現し、持続性の運動抑制作用から、中枢抑制作用、あるいはトランキライザー様作用があると報告されている。これらの結果を考えると、日本で専ら医薬品としての使用実態だけでなく、薬理活性的にも、処方箋薬相当の成分を含むと判断出来る可能性があるものと考えられる。また、機能性として示されている論文は、動物実験ではあるが、肝保護作用、抗高血圧作用、血糖降下作用、心臓保護作用など、処方箋薬相当の効果を目指したものである。従って、本品については、医薬品の成分本質ワーキンググループでの議論が重要と考えられた。

なお、韓国の MFDS (食品医薬品安全処) の記載

([http://www.korea.kr/expertWeb/resources/files/data/document_file/2014/2014%EB%85%84_2%EB%B6%84EA%B8%B0_%EC%9E%90%EC%A3%BC%ED%95%98%EB%8A%94_%EC%A7%88%EB%AC%B8%EC%A7%91\(%EC%8B%9D%ED%92%88%EB%B6%84%EC%95%BC\).pdf](http://www.korea.kr/expertWeb/resources/files/data/document_file/2014/2014%EB%85%84_2%EB%B6%84EA%B8%B0_%EC%9E%90%EC%A3%BC%ED%95%98%EB%8A%94_%EC%A7%88%EB%AC%B8%EC%A7%91(%EC%8B%9D%ED%92%88%EB%B6%84%EC%95%BC).pdf)) を機械翻訳すると、

「五味子を食品原料で使うことができるの?」

「五味子(Schisandra chinensis Baillon)の種は食用根拠を探しにくくて、現在としては食品としての安全性を確認することができなく食品の原料で使うことができません」と出てきており、さらに、韓国は食品に使える原料をポジティブリストにしている、基本的に韓方薬は食品としては使えないことが知られている。従って、何らかの使用基準があるものと考えられるので、この点は調査が必要であろう。

化学物質では、β-アラニンについて調査依頼があったが、本品は、魚肉や鳥胸肉といった筋肉に豊富に含まれ、食経験が十分にあり、特に問題となる毒性も見られず、EFSA でも安全性への懸念はもたらさないと結論づけられており、また医薬品としての使用実態がないことから、非医であるものと考察した。

一方で、ED 治療薬であるシルデナフィル類縁物質であるデスカルボンシルデナフィルは、PDE5 の活性発現部に結合し、また実際に阻害活性を持つこと、さらに処方箋薬であるシルデナフィル様の作用を意図して合成されたものと考えられることから、専ら医薬品に指定すべき成分本質と判断されると考察した。

これらの情報は、平成 30 年 2 月 19 日に開催された食薬 WG における基礎資料となった。また別に、ムラサキムカシヨモギ、ミロエステロール、トシシ、フォルスコリン等、担当部局からの問い合わせに、科学的見地から対応した。

D. 結論

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。

なお、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。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表等

論文発表等

- 1) 合田幸広：機能性表示食品（届出企業）に求められる品質保証の考え方，薬理と治療，45(11)，1751-1753 (2017)。
- 2) 合田幸広：薬用植物の規制と食薬区分機能性，アグリバイオ 28(2)，28-32 (2018)。
- 3) Tokumoto, H., Shimomura, H., Hakamatsuka, T., Ozeki, Y. and Goda, Y.: Fluorescence coupled with macro and microscopic examinations of morphological phenotype

give key characteristics for identification of crude drugs derived from scorpions. Biol. Pharm. Bull., 41(4): in press (2018).

学会発表等

- 1) 合田幸広，機能性表示食品の品質保証について，IFIA（国際食品素材/添加物会議）Japan 2017 会議棟セミナー，東京（2017.5）。
- 2) 合田幸広，機能性表示食品（届出企業）に求められる品質保証の考え方，メディカルライター協会セミナー，東京（2017.7）。
- 3) 合田幸広，機能性関与成分の定義を考える，日本アントシアニン研究会第6回研究会，東京（2017.7）。
- 4) 合田幸広，機能性表示食品の品質保証について1，JADMA セミナー（2017.7）。
- 5) 合田幸広，機能性表示食品の品質保証について2，JADMA セミナー（2017.8）。
- 6) 合田幸広，機能性表示食品の表示と機能性表示食品，日本食品化学学会第33回食品化学シンポジウム（2017.10）

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ケ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	-

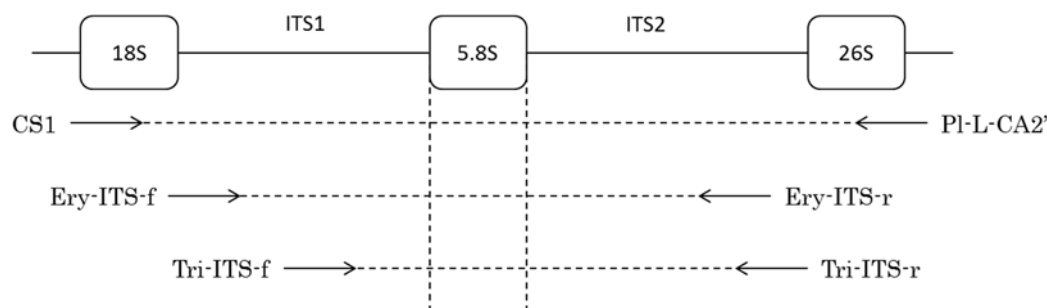
A : アメリカ市場品, J : 国内市場品

- : 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

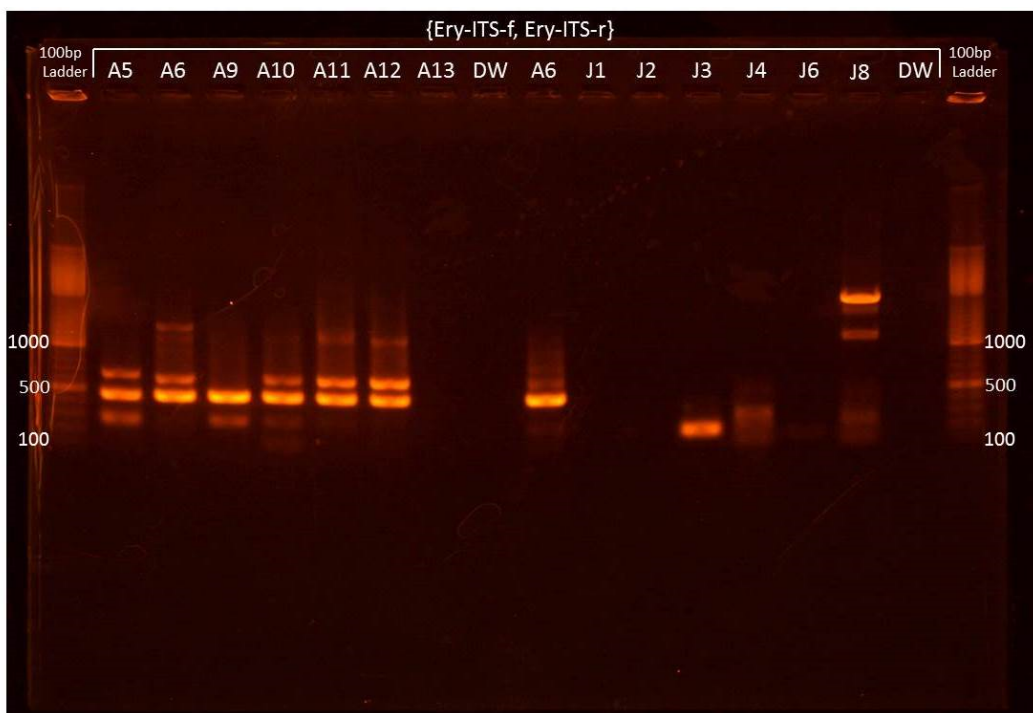


Fig. 2 Electropherogram on species specific PCR for *Erythroxyllum* plants

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*

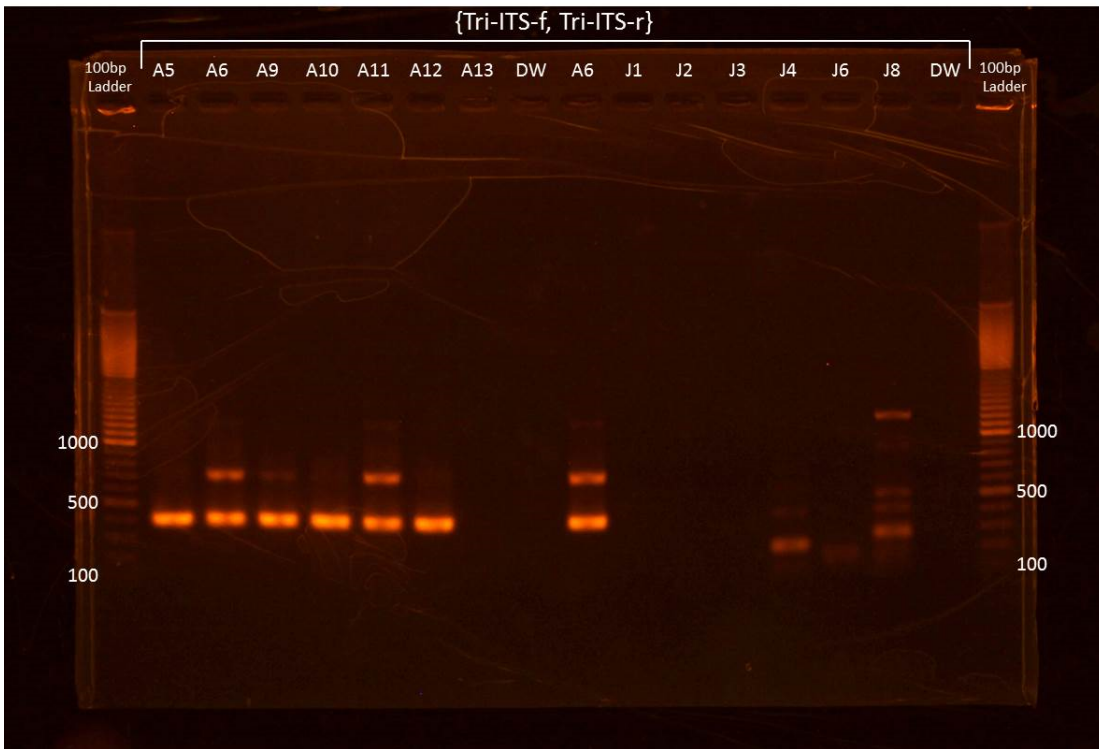


Fig. 4 Electropherogram on species specific PCR for *Trichilia* plants

```

T. emarginata 1 ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCC 60
A5            1 ..... 60
A9            1 ..... 60
A10           1 ..... 60
A12           1 ..... 60

T. emarginata 61 CCAAGCCTTTAGGCCGAGGGCAGGCCTGCCTGGGTGTCACGCATTGTTGCCCCCAAACC 120
A5            61 ..... 120
A9            61 .....M.WY. 120
A10           61 .....M. Y. 120
A12           61 ..... 120

T. emarginata 121 CCCTCTTGGGGAATAGCTGGTCCGGCGAAAAATGGCCTCCCGTGCCTCCAGCTCGCGGT 180
A5            121 .....M..... 180
A9            121 .....R.....M..... 180
A10           121 .....K.....A...R...Y.....C..... 180
A12           121 .....C..... 180

T. emarginata 181 TGGCTCAAATCTGAGTCTTTCGGCGACCGTGCCGCGACGATCGGT 225
A5            181 ..... 225
A9            181 ....Y..... 225
A10           181 ....Y..... 225
A12           181 ....C..... 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

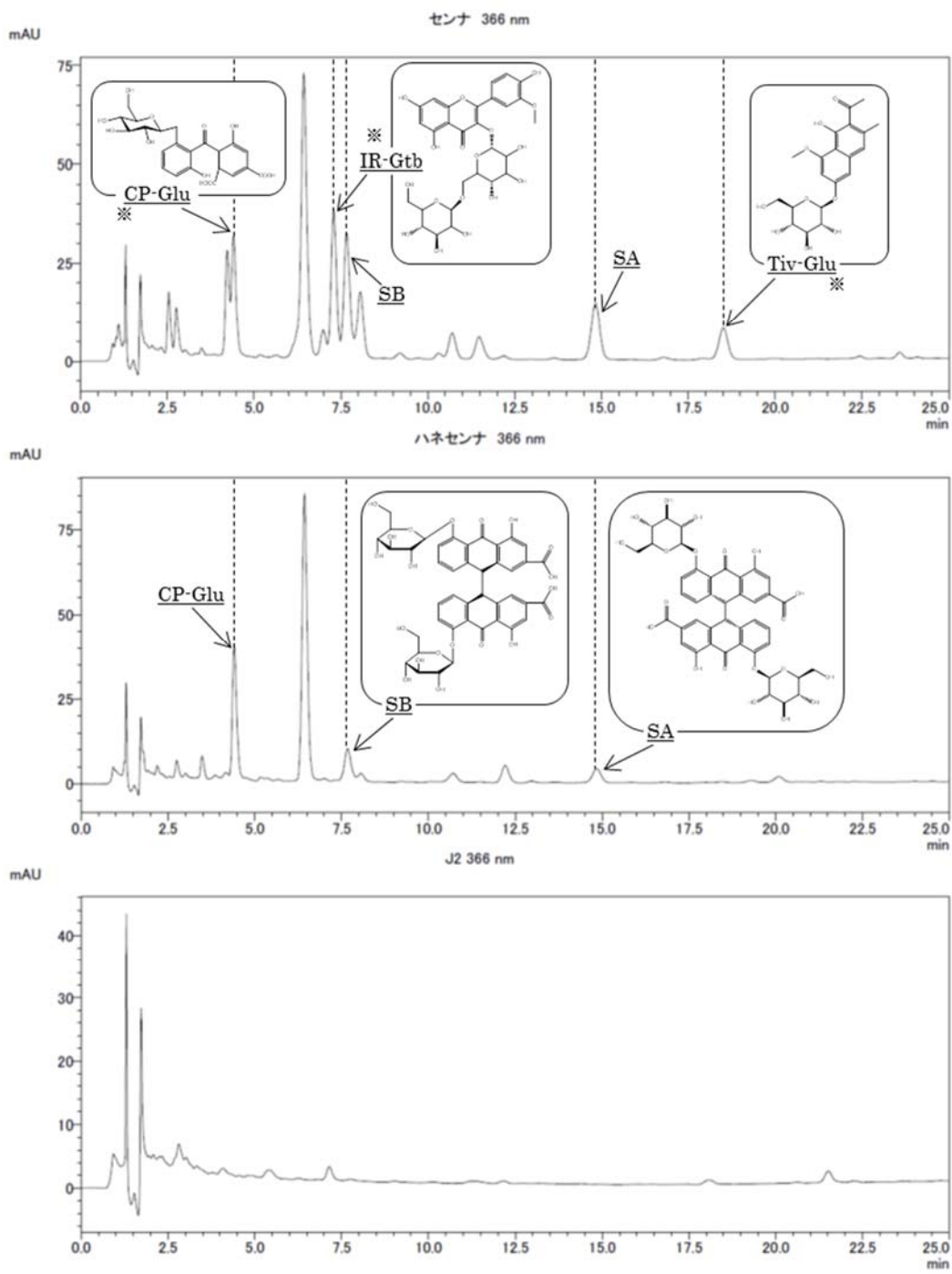
T. lepidota 121  CCCCTCTTGGCGGATGTTTGGACGGGCGGAAACTGGCCTCCCGTGCCTCCAGCTCGCGG  180
A6           121 .....R....W...W.....R...Y.....M.....  180
A11          121 .....A....W.....A.....  180

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).

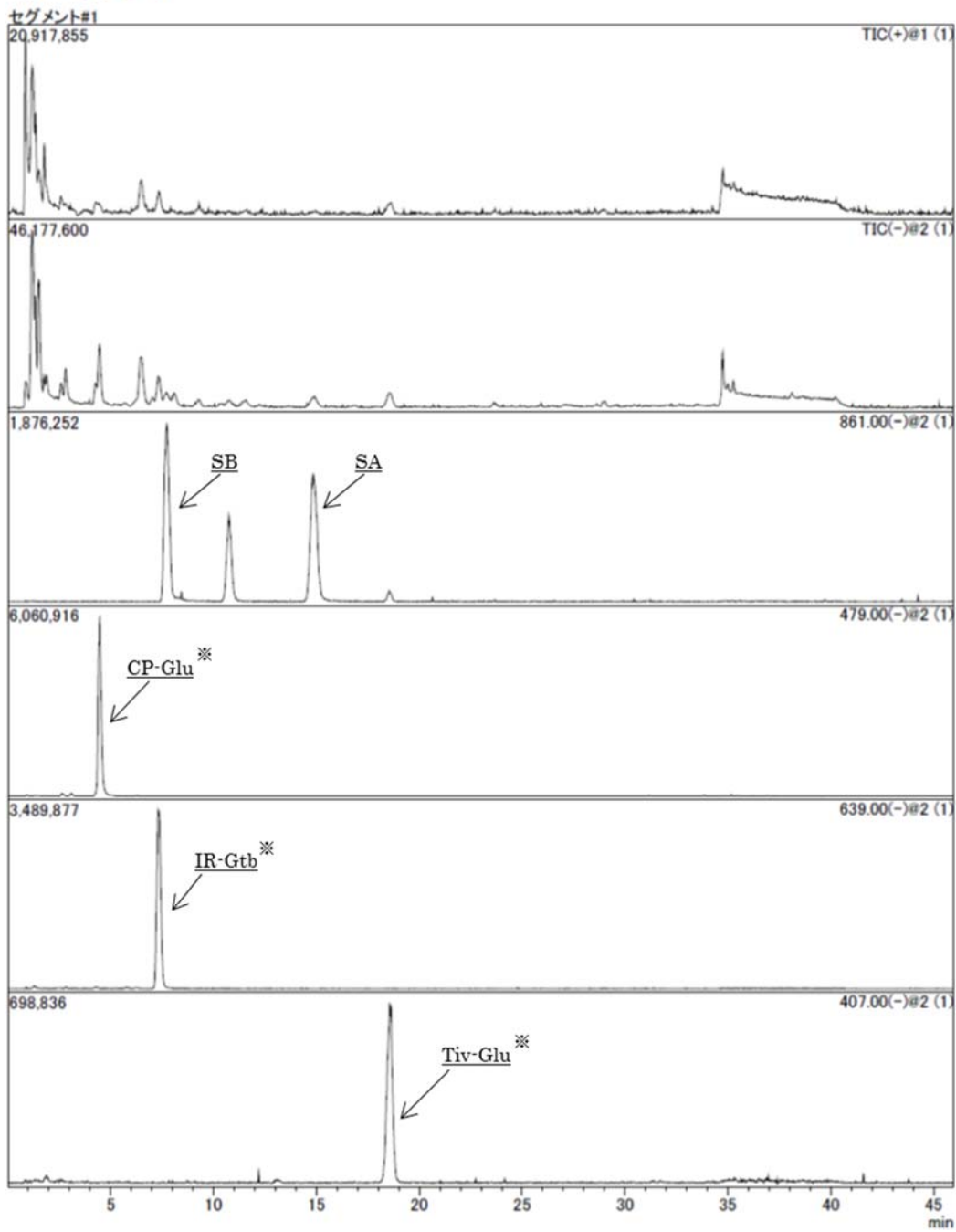
Fig. 6 ITS sequence alignment of *Trichilia* - 2



※ : putative

Fig. 7 UV Chromatogram

<クロマトグラム>



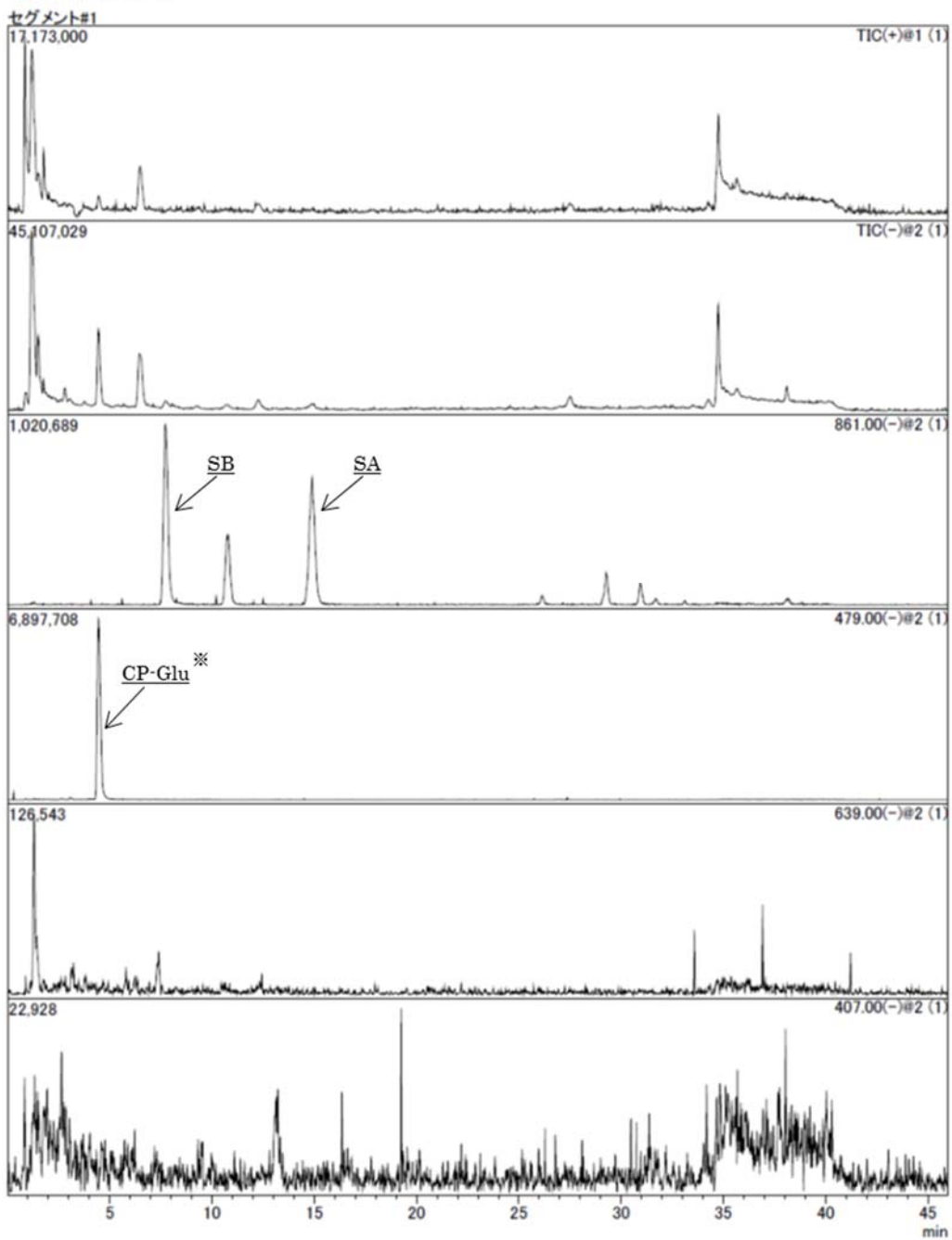
※ : putative

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>

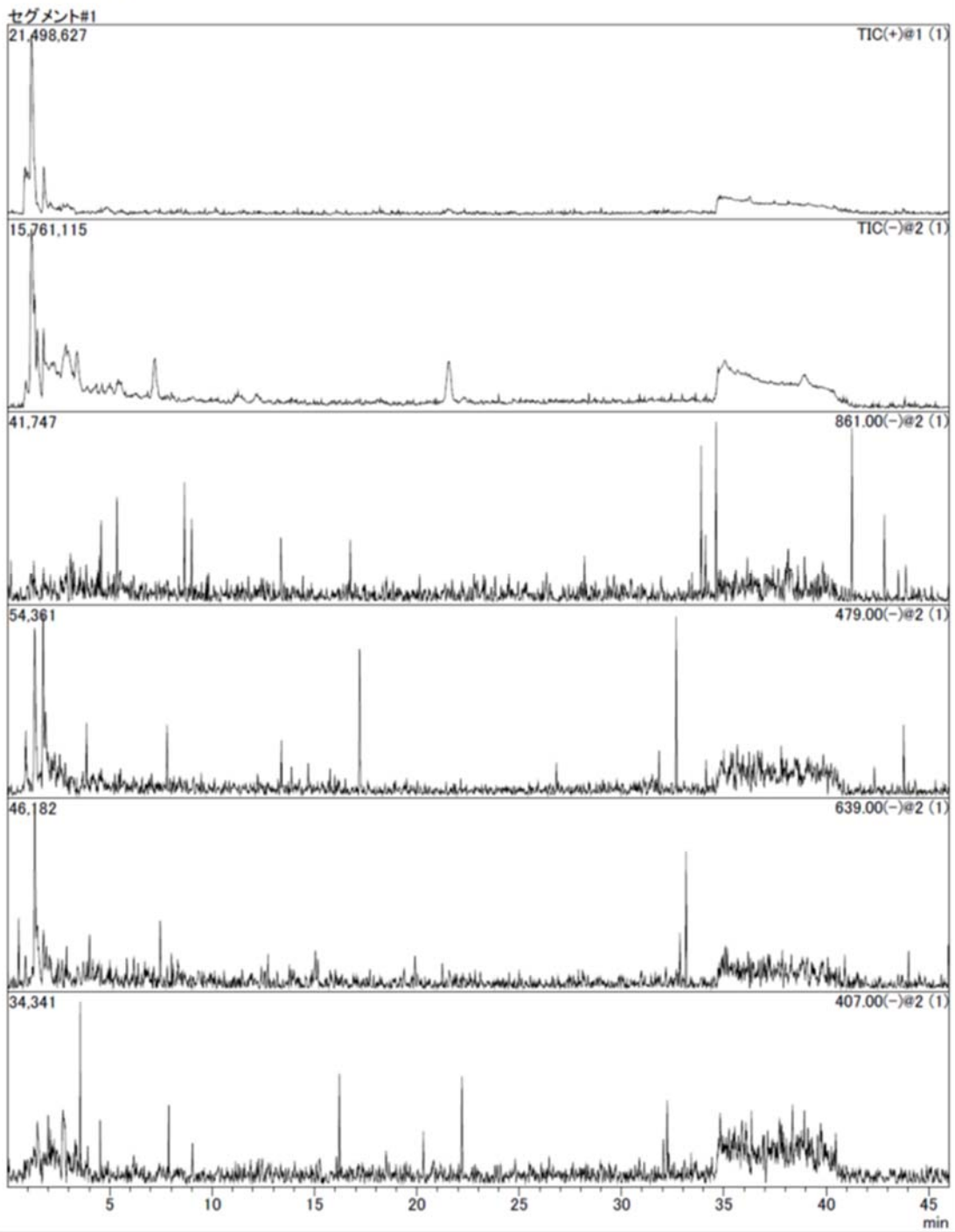


Fig. 10 MS Spectrum (3) J2 Sample Extract

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 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長

日本国外で流通する何首烏及び関連生薬の基原種調査（2）

研究協力者 佐藤 直子 国立医薬品食品衛生研究所 前・生薬部非常勤職員
（現・食品添加物部研究員）

日本薬局方収載生薬のひとつである何首烏の代わりに、韓国では白首烏が使用されてきたが、これと形態のよく似た異葉牛皮消との誤用が近年問題となっている。現在のところ、日本に医薬品として流通しているのは何首烏のみであり、白首烏及び異葉牛皮消の誤用は報告されていないが、今後日本でも白首烏配合製品が流通する可能性が高く何首烏と誤用される危険性も高まる。昨年度までの研究で、中国で何首烏、白首烏、異葉牛皮消として流通する生薬の基原種調査を行い、中国で流通している白首烏と異葉牛皮消の基原種が韓国で定められているものと異なることを明らかにした。本年度は、韓国市場で流通する白首烏等を収集し、その基原種を成分と遺伝子の両面から調べ実態を調査したので報告する。

研究協力者

天倉吉章 松山大学薬学部・教授

袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所・生薬部
長

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所・生薬
部・室長

政田さやか 国立医薬品食品衛生研究所・生薬
部・主任研究官

内倉崇 松山大学薬学部

杉脇秀美 松山大学薬学部

好村守生 松山大学薬学部・講師

渥美聡孝 九州保健福祉大学薬学部・講師

渡辺将人 熊本大学薬学部

田中伸幸 国立科学博物館植物研究部

A. 研究目的

何首烏は、日本薬局方（第十七改正）収載生薬のひとつであり、ツルドクダミ（*Polygonum*

multiflorum Thunberg) の塊根である。古くから、強壯、解毒、補血、緩下のために用いられているが、韓国では何首烏の基原植物が自生せず、その代わりとして白首烏も使用されてきた。白首烏の基原種について、日本に公の定義はないが、韓国ではコイケマ（*Cynanchum wilfordii* Hemsley）の根を基原とする生薬であると規定されている¹⁾。

近年、白首烏配合の健康食品が主に更年期障害を改善する²⁾目的で、韓国国内で多く流通している。しかし、2015年4月、食品医薬品安全処（KFDA）が韓国市場に流通する白首烏配合製品を調査した結果、65%の製品に白首烏と形態のよく似た異葉牛皮消が違法に使用されていることが明らかとなった^{3, 4)}。異葉牛皮消は *C. auriculatum* Royle ex Wight の根であるが、*C. auriculatum* を妊娠中の雌豚に与えると流産を惹起するという報告があり、アメリカ

食品医薬局 (FDA) が運営しているデータベースでは有毒植物として記載されているものである⁵⁾。今回のような白首烏と異葉牛皮消の誤用は韓国では古くから問題となっているため、これまでに PCR 法を用いた両者の鑑別法が多く報告され^{6,7)}、大韓薬典外韓薬 (生薬) 規格集にも記載されている⁸⁾。

現在のところ、日本に医薬品として流通しているのは何首烏のみであり、白首烏及び異葉牛皮消の誤用は報告されていない。しかし、上述の白首烏配合製品のなかにはアメリカですでに販売されているものもあり、日本でも機能性表示食品として許可を取る目的で日本人を対象とした臨床試験が行われている⁹⁾。今後、日本でも白首烏配合製品が流通する可能性が高く、それに伴い白首烏の流通が盛んになれば何首烏と誤用される危険性も高まる。そこで本研究では、日本国外で何首烏、白首烏、異葉牛皮消として流通する生薬の基原植物種について、成分と遺伝子の両面から実態を調査することとした。昨年度までの研究で、中国で何首烏、白首烏、異葉牛皮消として流通する生薬の基原種調査を行い、中国で流通している白首烏と異葉牛皮消の基原種が韓国で定められているものと異なることを明らかにした。本年度は、韓国市場で流通する白首烏等を収集し、その基原種を成分と遺伝子の両面から調べ実態を調査したので報告する。

B. 研究方法

実験材料

本研究に使用した何首烏、白首烏および異葉牛皮消 (耳葉牛皮消) の詳細を表 1 に示す。Sample nos. 1-19 は昨年度の研究で用いた中国市場品、sample nos. 20-26 は新たに韓国ソウル市京東市場 (薬令市場) 内の生薬店にて購入した生薬である。また、本研究のために、表 2 に示す *C. wilfordii* Hemsley 及び *C. auriculatum* Royle ex Wight の植物標本の一

部を、高知県立牧野植物園及び国立科学博物館筑波実験植物園から提供いただいた。さらに、本研究用に表 3 に示す *C. wilfordii* Hemsley を九州の 2 箇所から採集した。この植物種は、渥美聡孝先生 (九州保健福祉大学薬学部) 及び渡辺将人先生 (熊本大学薬学部) によって同定された。また、武田薬品工業株式会社京都薬用植物園及び日本新薬株式会社山科植物資料館から DNA 解析用試料として提供をうけた *P. multiflorum* Thunberg の詳細も併せて表 3 に示す。

高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による分析

a) 試薬及び装置

高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) は、HPTLC Silica gel 60 F254 Glass plate (20×10 cm) (Merck 社製) を用いた。試料溶液注入には、TLC サンプルアプリーケーター リノマー V、TLC 画像の撮影には、TLC 撮影システム TLC ビジュアルライザー (いずれも CAMAG 社製) を使用した。

検出は、紫外線 (UV) 照射 (254, 366 nm)、希硫酸試液 (局方に準拠して調製) により行った。

b) 試料溶液の調製及び分析条件

各試料の試料溶液の調製は、以下のように行った。また、すべての試料溶液は HPTLC ガラスプレートにスポットし、約 7 cm 展開した。各スポットのバンド幅は 8 mm、バンド間隔 2 mm とした。

試料調製 各試料の粉末 0.5 g にメタノール 5.0 mL を加え、約 5 分間超音波処理を行った。自然ろ過後、得られたろ液を蒸発乾固し、残留物をメタノール 1 mL に溶解したものを試料溶液とした。

HPTLC 条件 注入量: 各 3 μ L, 展開溶媒: 酢酸エチル / 水 / メタノール / 酢酸 (100) (200:10:10:3), 検出: UV 照射 (254, 366 nm), 希硫酸噴霧試液噴霧後, 加熱。

塩基配列解析

a) DNA 抽出

生薬試料を 20–30 mg 量りとり、粉碎したものを DNA 抽出用試料とした。DNA 抽出には DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) 及び QIAcube™(QIAGEN) を使用した。

b) PCR 条件

核 rDNA の Internal transcribed spacer region (以下 ITS 領域)の増幅には ITS5A 及び ITS4 を^{10,11)}、葉緑体 DNA *trnL-trnF* intergenic spacer(以下 *trnL-trnF* 領域)には *trnL*-c 及び *trnL*-f を¹²⁾、同じく葉緑体 DNA *trnH-psbA* intergenic spacer region (以下 *trnH-psbA* 領域)には *PsbA3_f* 及び *TrnHf_05* を^{13,14)}それぞれプライマーとして用いた。これらプライマー配列を表 4 に示す。

PCR 反応液は、どの領域を増幅する場合も同じく、KOD FX Neo (TOYOBO) 0.5 μL, 2×PCR buffer for KOD FX Neo 12.5 μL, dNTPs 0.2 mM, forward 及び reverse primer 各 0.2 μM を含むものに、0.5 μL の DNA 溶液を加え全量を 25 μL とした。PCR 反応は DNA Engine thermal cycler (Bio-Rad) を用いて行い、温度プログラムは(94°C, 2 min) × 1 cycle, (98°C, 10 sec; 60°C, 30 sec; 68°C, 70 sec) × 31 cycles, (68°C, 70 sec) × 1 cycle とした。なお、増幅産物はマイクロチップ電気泳動装置 MCE202 MultiNA (Shimadzu) を用いて泳動し確認した。

増幅産物精製及び配列解析

PCR 反応により得られた増幅産物は、MiniElute® PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、ユーロフィンジェノミクス株式会社 に委託してダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。これら配列について、BLAST 相同性検索及び種の同定された植物標本や植物体由来の遺伝子配列との比較により、基原種を推定した。

C. 研究結果

高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による分析

韓国市場で入手した何首烏及び白首烏とラベルされた計 7 ロットについて HPTLC 分析を行ったところ、何首烏と白首烏とは異なる分離パターンを示した(図 1 sample nos. 20–26)。図 1 には、今回検討した韓国市場品と併せて昨年度検討した中国市場品の 1HPTLC 結果も示しているが、韓国市場品のうち白首烏とラベルされた生薬 (sample nos. 20–24) が示す分離パターンは中国で流通する生薬が示すどのパターンとも似ていなかった。このことから、これら韓国市場品はこれまで中国で入手した検体とは異なる植物種あるいは異なるケモタイプを持つもの由来である可能性が示唆された。

一方、韓国市場品のうち何首烏とラベルされている検体 (sample nos. 25, 26) の分離パターンは、中国で何首烏として流通していた生薬 (sample nos. 1, 2, 5–7, 15–17) の分離パターンとは明らかに異なっていた。昨年度の研究で、これら何首烏とされた検体は遺伝子配列から何首烏の基原植物である *P. multiflorum* Thunberg 由来の配列であることが推定されており、今回何首烏として購入した韓国市場品の基原植物はこれとは別種であることが推測された。

これらの結果から、韓国で入手した生薬試料の中にも、生薬のラベルと中身が異なるものが存在する可能性が示唆された。そこで、これら 7 ロットについて遺伝子配列から基原種の推定した。

ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域の塩基配列解析

まず、何首烏、白首烏、異葉牛皮消の基原種である *P. multiflorum* Thunberg, *C. wilfordii* Hemsley, *C. auriculatum* Royle ex Wight について、表 2 及び 3 に示す植物種の同定された試料を用い、その ITS 領域, *trnH-psbA*

領域及び *trnL-trnF* 領域の配列を調べた (表 5)。これら配列と GenBank に登録されている配列と比較した結果, ITS 領域では 99.5~100% の一致率, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域では 100% の一致率があった。なお, *P. multiflorum* 及び *C. auriculatum* の *trnH-psbA* 領域については解析が困難であった。

次に, 韓国市場品計 7 ロットについて, ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域の配列を調べ, 先に調べた標本及び植物体の配列と比較することで基原種の推定を行った。生薬購入時に白首烏とラベルされていた 5 ロットのうち, sample nos. 21-24 は *C. wilfordii* 由来の ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域 (GenBank accession nos. AY548207, KT220733 and JX028243) の配列とほぼ一致した。そのため, 白首烏とラベルされていた sample nos. 21-24 はすべて正しい基原種から生産されたものであることが示された。昨年度の研究で, 中国市場品である sample nos. 4, 13, 19 は, *C. wilfordii* 由来の配列との相溶性が最も高く, 他に該当しそうな種がなかったため, *C. wilfordii* 由来の生薬であると推測していた。しかし, 今回新たに入手した *C. wilfordii* Hemsley の植物標本から得られた配列と比較すると, sample nos. 4, 13, 19 の各領域の配列の一致率は sample nos. 21-24 のものより低かった。さらに, HPTLC 分析では, sample nos. 4, 13, 19 が示した分離パターンと sample nos. 21-24 の分離パターンは大きく異なっていた。そのため, sample nos. 4, 13, 19 の基原種は *C. wilfordii* ではない, GenBank に登録されていない *Cynanchum* 属由来であると考えられた。

一方, 同じく白首烏とラベルされたロットである sample no. 20 について 4 検体を無作為に選び, ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域の配列を調べたところ, 3 検体は *C. wilfordii* 由来の配列と一致したが, 1 検体は

C. auriculatum 由来のもの (GenBank nos. EU580717, KT220734 and JX028242) と高い配列相溶性を示した。これは, 正しい基原種が *C. wilfordii* である sample no. 20 のなかに, *C. auriculatum* の混入があることを示している。

生薬購入時に何首烏とラベルされていた sample nos. 25, 26 の遺伝子配列は, どの領域においても *C. auriculatum* 由来の配列と一致していた。先述の HPTLC 分析の結果から予想されたとおり, sample nos. 25, 26 は生薬購入時のラベルから予測される基原種と異なることが示された。

D. 考察

本研究で調査した何首烏及び関連生薬の中国・韓国市場品計 26 ロットについて, 推定される基原種を表 6 に示す。

生薬購入時に何首烏とラベルされていた検体のうち, 中国市場品はすべて生薬名から予想される基原種と遺伝子から推定される基原種が一致した。一方韓国市場では *C. auriculatum* 由来のものが何首烏として取引されていた。日本薬局方「カシュウ」の確認試験項目で規定されている確認成分はスチルベン配糖体であり, 主波長 366 nm の紫外線照射をした際に R_f 値 0.3 付近にみられる青白色のスポットだが¹⁵⁾, 本研究の HPTLC 分析では *C. wilfordii* や *C. auriculatum* 由来と推定される生薬には本スポットは認められなかった (図 1(B))。このことから, 日本において, 基原種の異なる種が局方医薬品として流通する何首烏と誤用される可能性は低いと考えられた。

異葉牛皮消の基原種である *C. auriculatum* 由来のものが白首烏として扱われていることが, 本研究でも確認された。本研究で調べた白首烏とラベルされた生薬のほとんどが *C. auriculatum* 由来のものであった。白首烏の基原植物を公に定義しているのは韓国のみであり, 中国の薬局方である中国薬典には白首烏,

異葉牛皮消とともに収載されていない。中国で扱われる生薬を記載している中薬大辞典には両生薬に関する記述があるが、白首烏[bai-shou-wu]の基原植物は *C. auriculatum* Royle ex Wight とされており¹⁶⁾、韓国で白首烏の基原植物とされる *C. wilfordii* の根は隔山消[ge-shan-xiao]と記されていた¹⁷⁾。さらに、白首烏の別名として隔山消が、隔山消の別名として白首烏が挙げられており、両生薬の区別が曖昧であることが推察されたうえ、どちらかといえば *C. auriculatum* の根が白首烏として認識されているように思われた。中国から報告された白首烏を題材とした科学論文でも、*C. auriculatum* と *C. wilfordii* の両方が bai-shou-wu (白首烏) の基原として記述されていた¹⁸⁾。このような背景が、白首烏とラベルされた中国市場品のほとんどが *C. auriculatum* 由来のものである一因と考えられた。

一方、白首烏の公的規格が整備されている韓国の市場品でも、*C. auriculatum* が白首烏として扱われている事例がみられた。とくに、sample no. 20 のようにひとつのロットに *C. wilfordii* と *C. auriculatum* 由来のものが混在しているという事例も確認された。両者の外観は酷似しているため(図2)、白首烏を扱い慣れていない者には誤った基原種の混入を見極めることは困難であると思われた。

また、今回初めて、白首烏として流通するもののなかに、*C. wilfordii*でも *C. auriculatum* でもない種の不明な *Cynanchum* 属由来のものが含まれていることが判明した。今後、このようなものも白首烏として流通する可能性があることも考える必要がある。

E. 結論

生薬においてその品質確保のために正しい基原種由来のものを用いることは必須であるが、近年、健康食品においてもその原材料の品質確保の重要性が指摘されている。白首烏配合

製品は健康食品などとして日本で流通する可能性が高いが、日本では白首烏の流通実績がほとんどない。中国や韓国では流通実績があるものの、両国において白首烏の基原植物とされる種が一致していないことや、公的規格が整備されている韓国でも白首烏とされるもののなかに誤った種由来のものが混入されていたという実態がある。そのため、「白首烏」を入手したつもりでも、ラベルの確認だけでは入手するたびに品質が大きく異なるという危険性がある。このように、日本での流通実績がほとんどなく定義の曖昧な原料を健康食品等で使用する場合、異物同名が存在しないかなどを見極め、安全性を十分に確保する必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

該当無し

2. 誌上発表

N. Sato-Masumoto, T. Uchikura, H. Sugiwaki, M. Yoshimura, S. Masada, T. Atsumi, M. Watanabe, N. Tanaka, N. Uchiyama, Y. Amakura, T. Hakamatsuka. Survey on the original plant species of crude drugs distributed as *Cynanchi Wilfordii Radix* and its related crude drugs in the Korean and Chinese markets. *Biol. Pharm. Bull.*, 2017, 40, 1693-1699.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

参考文献

- 1) The Korean Herbal Pharmacopoeia. Korea Food and Drug Administration, p. 98 (2002).
- 2) Chang A, Kwak BY, Yi K, Kim JS (2012) The effect of herbal extract (EstroG-

- 100) on pre-, peri- and post-menopausal women: a randomized double-blind, placebo-controlled study. *Phytother. Res.* **26**: 510-516.
- 3) Ministry of Food and Drug safety, Korea. <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=676&seq=27270> (accessed 2016-12-13).
- 4) 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部, 食品安全情報 (化学物質) No. 9/2015. p. 22. <http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/2015/foodinfo201509c.pdf> (accessed 2016-12-13).
- 5) U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Poisonous Plant Database. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/Plantox/Detail.CFM?ID=11513> (accessed 2016-12-13).
- 6) Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Lee KH, Kim JH, Seong RS, Kang TS, Lee JH, Jang YM (2015). Development of primer sets for the detection of *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*. *J. Food Hyg. Saf.* **30**: 289-294.
- 7) Kim MK, Wang H, Kim YJ, Sathiyamoorthy S, SaengKwon W, Yang DC (2013). Molecular authentication by multiplex-PCR of three similar medicinal plant species: *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*). *J. Med. Plants Res.* **7**:2584-2589.
- 8) Ministry of Food and Drug safety, Korea. 대한약전외한약(생약)규격집수재생약(KHP) “Cynanchi Wilfordii Radix.” http://www.mfds.go.kr/files/upload/herbmed/photo_data/KHP1352.pdf (accessed 2016-01-29).
- 9) UMIN Clinical Trials Registry (UMIN-CTR). “Clinical study on the efficacy and safety of EstroG-100J for menopausal symptoms: randomized double-blinded controlled study”. UMIN test ID: UMIN000015967. https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000018381 (accessed 2016-12-13)
- 10) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322 in: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. & White, T. (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- 11) Downie SR, Katz-Downie DS (1996) A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* **83**: 234-251.
- 12) Taberlet PL, Gielly G, Pautou J, Bouvet K (1991) Universal primers for amplification of three non-coding region of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**:1105-1109.
- 13) Samg T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* **84**:1120-1136.
- 14) Tate JA, Simpson BB (2003) Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* **28**: 723-737.
- 15) 合田幸広, 袴塚高志監修, 日本生薬関係規格集 2014., じほう社, p. 643 (2014)

- 16) 南京中医药大學編著, 中藥大辭典 上 (第二版)., 上海科學技術出版社, p. 1007 (2006).
- 17) 南京中医药大學編著, 中藥大辭典 下 (第二版)., 上海科學技術出版社, p. 3395 (2006).
- 18) Zhang X, Shan L, Huang H, Yang X, Liang X, Xing A, Huang H, Liu X, Su J, Shang W (2009) Rapid identification of acetophenones in two *Cynanchum* species using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**: 715-725.

表 1 本研究で用いた生薬

Sample no.	購入時の生薬名	産地	流通市場
1	何首烏	四川省	中国
2	何首烏	四川省	中国
3	白首烏	江蘇省	中国
4	異葉牛皮消	広西	中国
5	何首烏	四川省	中国
6	何首烏	四川省	中国
7	何首烏	四川省	中国
8	白首烏	広西	中国
9	白首烏	江蘇省	中国
10	白首烏	江蘇省	中国
11	白首烏	江蘇省	中国
12	白首烏	江蘇省	中国
13	白首烏	江蘇省	中国
14	白首烏	江蘇省	中国
15	何首烏	広西	中国
16	何首烏	四川省	中国
17	何首烏	四川省	中国
18	耳葉牛皮消	江蘇省	中国
19	耳葉牛皮消	江蘇省	中国
20	白首烏	不明	韓国（ソウル市京東市場）
21	白首烏	韓国	韓国（ソウル市京東市場）
22	白首烏	韓国	韓国（ソウル市京東市場）
23	白首烏	慶北・永川	韓国（ソウル市京東市場）
24	白首烏	慶北・永川	韓国（ソウル市京東市場）
25	何首烏	韓国	韓国（ソウル市京東市場）
26	何首烏	韓国	韓国（ソウル市京東市場）

表 2 本研究で用いた植物標本

標本番号	学名	所蔵元
MBKNo. 0147750	<i>Cynanchum wilfordii</i>	高知県立牧野植物園
MBKNo. 0147752	<i>Cynanchum wilfordii</i>	高知県立牧野植物園
MBKNo. 0124851	<i>Cynanchum wilfordii</i>	高知県立牧野植物園
MBKNo. 0098266	<i>Cynanchum wilfordii</i>	高知県立牧野植物園
MBKNo. 0104147	<i>Cynanchum wilfordii</i>	高知県立牧野植物園
MBKNo. 0106808	<i>Cynanchum wilfordii</i>	高知県立牧野植物園
TNS601490	<i>Cynanchum auriculatum</i>	国立科学博物館筑波実験植物園
TNS727275	<i>Cynanchum auriculatum</i>	国立科学博物館筑波実験植物園

表 3 本研究で用いるために収集したまたは提供をうけた植物

管理番号	提供元	採集場所	学名
NIHS-DPP-40001	武田薬品工業株式会社 薬用植物園	—	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg
NIHS-DPP-40002	日本新薬株式会社 山科植物資料館	—	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg
NIHS-DPP-10001	—	宮崎県延岡市	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hook f.
NIHS-DPP-10002	—	熊本県八代市	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hook f.

表 4 本研究で用いたプライマー配列

プライマー名	配列
ITS5a	5'-CCTATCATTAGAGGAAGGAG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
PsbA3_f	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'
TrnHf_05	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'
trnLF-c	5'-CGAAATCGGTAGACGCTA-3'
trnLF-f	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

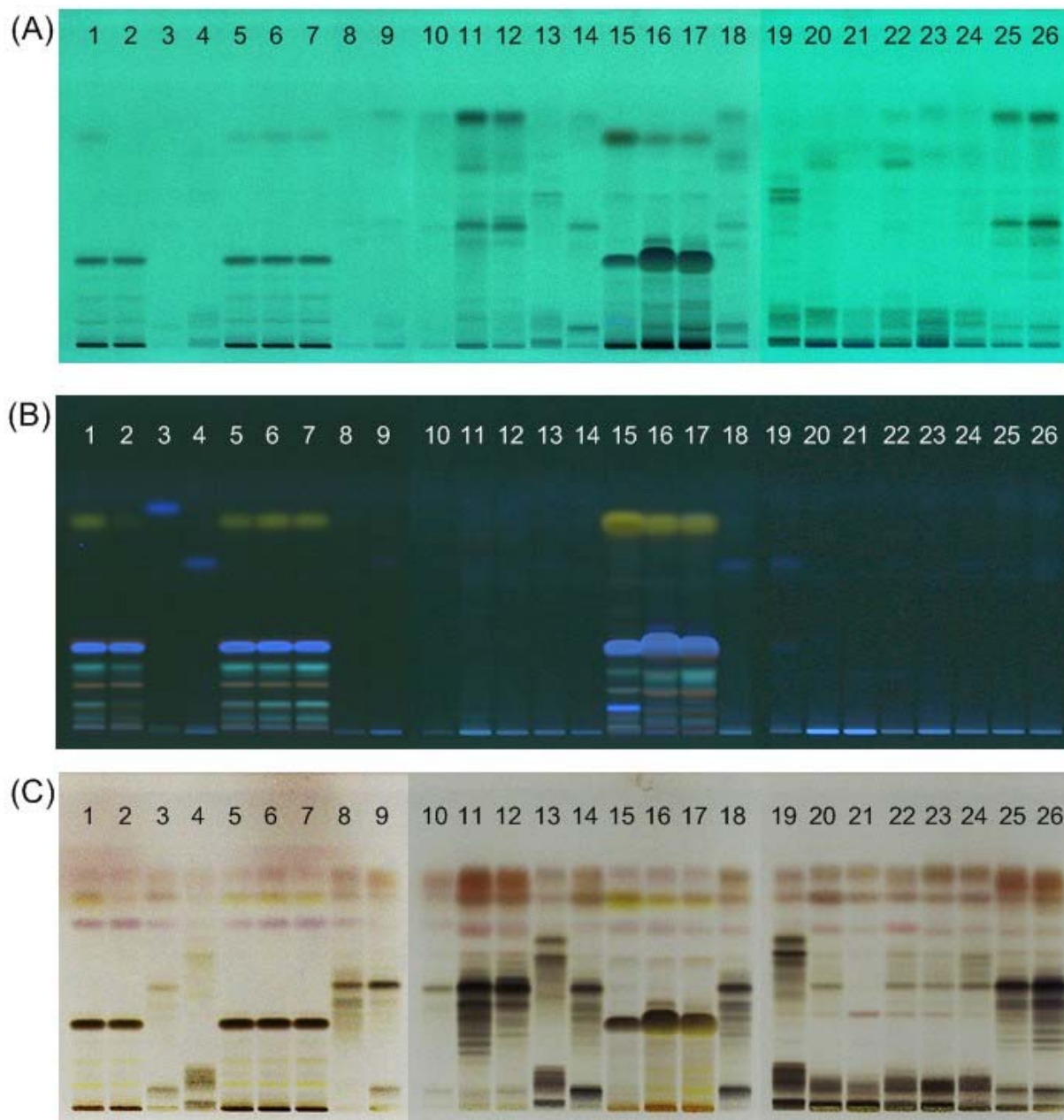


図1 何首烏，白首烏及び異葉牛皮消の HPTLC 分析結果

(A) 紫外線照射（主波長 254）, (B) 紫外線照射（主波長 366 nm）, (C) 希硫酸試液を噴霧ののち加熱したもの. 数字は Sample no. を示している（1～19: 中国市場品, 20～26: 韓国市場品）.

表 5 植物標本及び植物体から得られた ITS 領域, *trnH-psbA* 領域及び *trnL-trnF* 領域の GenBank accession nos. 一覧

標本/管理番号	ITS 領域	<i>trnH-psbA</i> 領域	<i>trnL-trnF</i> 領域
MBKNo. 0147750	LC217897	LC217909	LC217903
MBKNo. 0147752	LC217898	LC217910	LC217904
MBKNo. 0124851	LC217899	LC217911	LC217905
MBKNo. 0098266	LC217900	LC217912	LC217906
MBKNo. 0104147	LC217901	LC217913	LC217907
MBKNo. 0106808	LC217902	LC217914	LC217908
TNS601490	LC217915	LC217917	-
TNS727275	LC217916	LC217918	-
NIHS-DPP-40001	KY610502	KY610503	-
NIHS-DPP-40002	LC217191	LC217192	-
NIHS-DPP-10001	LC217193	LC217197	LC217195
NIHS-DPP-10002	LC217194	LC217198	LC217196

表 6 本研究に用いた検体の遺伝子解析から推定された基原種の学名

Sample no.	購入時の生薬名	生薬名から	
		予想される学名	遺伝子から推定された学名
1	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
2	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
3	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>
4	異葉牛皮消	<i>C. auriculatum</i>	種の不明な <i>Cynanchum</i> 属
5	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
6	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
7	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
9	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>
10	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>
11	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>
12	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>
13	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	種の不明な <i>Cynanchum</i> 属
14	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. auriculatum</i>
15	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
16	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
17	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>P. multiflorum</i>
18	異葉牛皮消	<i>C. auriculatum</i>	<i>C. auriculatum</i>
19	異葉牛皮消	<i>C. auriculatum</i>	種の不明な <i>Cynanchum</i> 属
20	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. wilfordii</i> と <i>C. auriculatum</i> の混合ロット
21	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. wilfordii</i>
22	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. wilfordii</i>
23	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. wilfordii</i>
24	白首烏	<i>C. wilfordii</i>	<i>C. wilfordii</i>
25	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>C. auriculatum</i>
26	何首烏	<i>P. multiflorum</i>	<i>C. auriculatum</i>

*背景が灰色のものは、生薬名から予想される学名と遺伝子解析から推定され学名が異なっていた生薬.

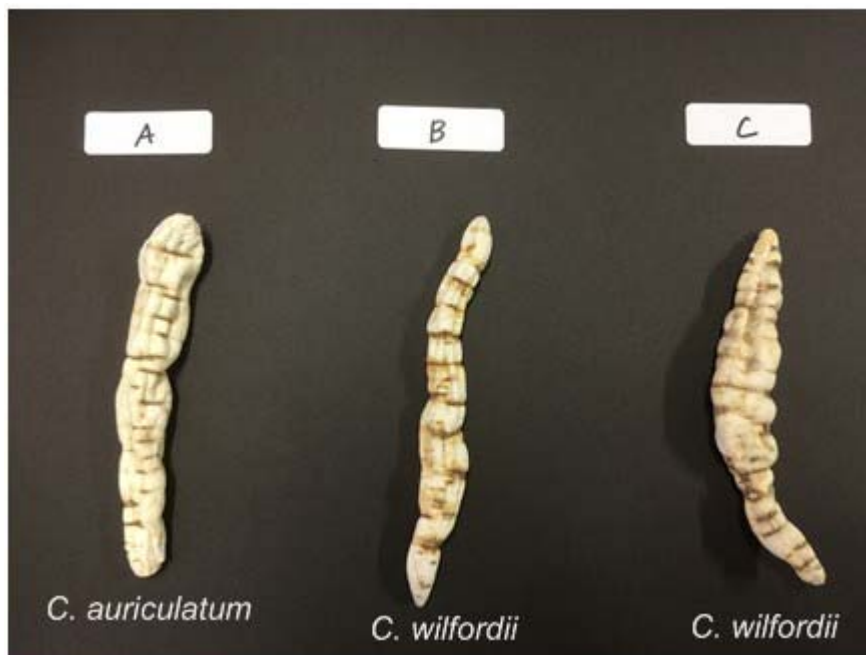


図2 Sample no. 20 の3つの検体の外観. 遺伝子配列を調べたところ, Aは *C. auriculatum* 由来, B, Cは *C. wilfordii* 由来のものと推定された.

厚生労働行政推進調査事業費補助金
(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
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・分析に関する研究

分担研究者 大塚 英昭 安田女子大薬学部 教授

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

研究要旨

沖縄に産するカキノキ科植物であるリュウキュウガキ(*Diospyros maritima*)は沖縄本島から先島諸島にわたって自生しており、その果実は毒とされている。時として、「柿」という名称から、誤食の可能性もあり、実際危険を及ぼすであろう成分の検討をおこなっている。さらに本植物は魚毒作用を持つことが知られており、本活性を示す成分の検索も行う予定である。

研究協力者名

広島大学 教授 松浪勝義

安田女子大学 准教授 稲垣昌宣、助教 川上 晋

A. 研究目的

多くの地域にカキノキ科植物は自生、また栽培され、その果実を生食する。渋柿であっても渋をぬいて食用に供している。沖縄にはカキノキ科植物は本邦にも産するカキを初めとして、数種類が知られている。リュウキュウコクタン (*Diospyros egyptica*) の果実は貧弱で、食用としてもちいられることはなく、その材の多くは琉球楽器である三線 (さんしん) の棹として用いられている。近縁植物のリュウキュウガキ (*D. maritima*) は沖縄本島から先島諸島にわたって自生しており、芳醇な果実を結ぶことが知られ、一般に毒といわれているが、一

見喫食が可能であると見間違えられる可能性がある。この実にはナフトキノンである **plumbagin** (図2)



図1

が含まれ毒性を示す物質であるとされている。この点に鑑み、リュウキュウガキの成分の検索を行った。

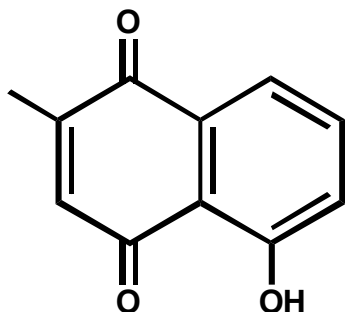


図 2

ちなみに近年の報告では、ナフトキノンの配糖体が近縁種 (*D. mollis*) [1]から報告されている。

B. 研究方法

先島諸島八重山郡竹富町で採集したリュウキュウガキ (*D. maritima*) の葉 (7.80 kg) を MeOH で抽出し、濃縮残渣を水に懸濁して、EtOAc で分配して EtOAc 可溶画分と水可溶画分をえた。水画分はさらに 1-BuOH と分配して 1-BuOH 画分を 215 g 得た (Chart 1)。

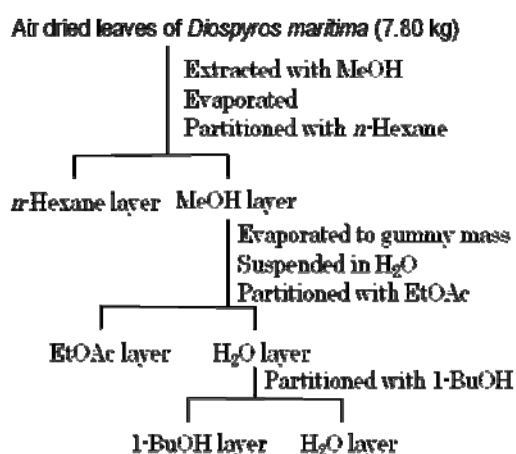


Chart 1

1-BuOH 画分を Diaion HP-20、silica gel カラムクロマトグラフィーで精製して化合

物 1 (50.4 mg)、化合物 2 (344.3 mg)、および化合物 3 (114.3 mg) 得た (Chart 2)。

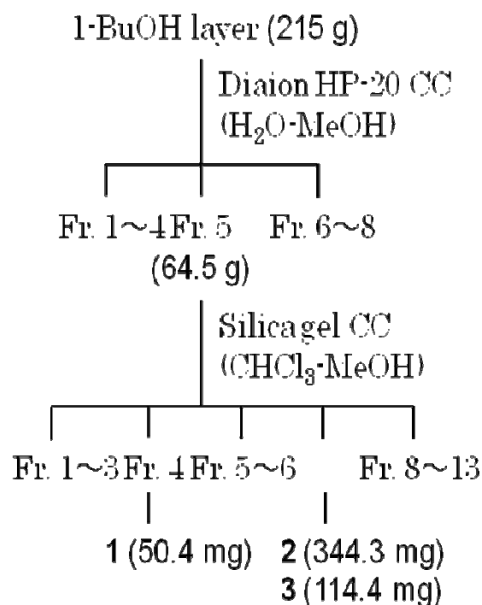


Chart 2

得られた化合物は、核磁気共鳴スペクトルを中心とする、機器分析によってその構造を明らかとした。

C. 研究結果

化合物は比旋光度 ($[\alpha]$) -31.6 を示す無色針状結晶として得られ、その融点は $187-189^{\circ}\text{C}$ であった。赤外線吸収スペクトルにおいて水酸基 (3375 cm^{-1}) の吸収と強いカルボニル (1693 cm^{-1}) に由来する吸収が認められ、高分解能質量分析の結果、その分子式は $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$ と決定された。 $^1\text{H-NMR}$ において 2 本シングレットメチル基と 2 組の一級水酸基に由来するシグナルが観測された。 $^{13}\text{C-NMR}$ においては高分解能質量分析の結果どおり、20 本のシグナルが観測され、二本のメチル基、十本のメチレン基が存在し、そのうち 2 本には水酸基が結合していた。さらに、三本のメチン

基、三本の四級炭素および酸素官能基を有する3級炭素とカルボニル炭素のシグナルが観測された (Table 1)。

¹³C and ¹H NMR (150 MHz, 600 MHz, C₅D₅N) chemical shifts for **1**

No.	¹³ C	¹ H
1	40.2	1.95 (1H, overlapped) 1.22 (1H, ddd, J = 13.0, 13.0, 5.4 Hz)
2	35.5	2.83 (1H, ddd, J = 14.4, 13.1, 6.6 Hz) 2.44 (1H, ddd, J = 14.4, 2.3, 2.3 Hz)
3	215.0	-
4	54.6	-
5	56.9	1.33 (1H, d, J = 11.3 Hz)
6	21.9	1.57 (2H, m)
7	42.4	1.70 (1H, ddd, J = 12.7, 2.9, 2.9 Hz) 1.45 (1H, overlapped)
8	44.5	-
9	56.1	0.99 (1H, br d, J = 8.3 Hz)
10	38.9	-
11	19.0	1.64 (1H, m) 1.46 (1H, overlapped)
12	26.5	1.89 (1H, m) 1.54 (1H, m)
13	45.9	2.49 (1H, br s)
14	37.5	2.03 (1H, dd, J = 11.2, 4.0 Hz) 1.94 (1H, dd, J = 11.2, 2.0 Hz)
15	53.6	1.85 (1H, d, J = 14.3 Hz) 1.71 (1H, d, J = 14.3 Hz)
16	61.5	-
17	66.4	4.12 (1H, d, J = 10.9 Hz) 4.07 (1H, d, J = 10.9 Hz)
18	21.3	1.44 (3H, s)
19	64.9	4.31 (1H, d, J = 11.1 Hz) 3.81 (1H, d, J = 11.1 Hz)
20	18.0	1.19 (3H, s)

Table 1

以上のことを勘案すると、化合物**1**はカルボニル基、二個の一級水酸基および酸素官能基を有する三級炭素からなるカウラン型ジテルペンであろうと予想された (図3)。

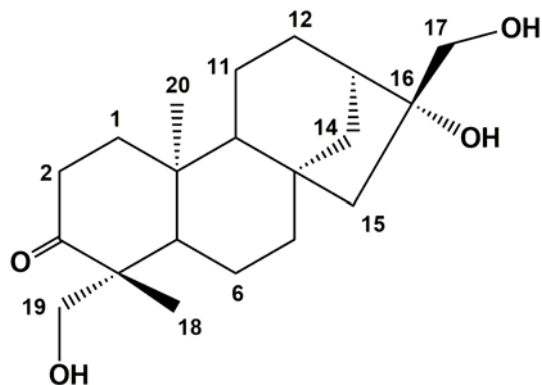
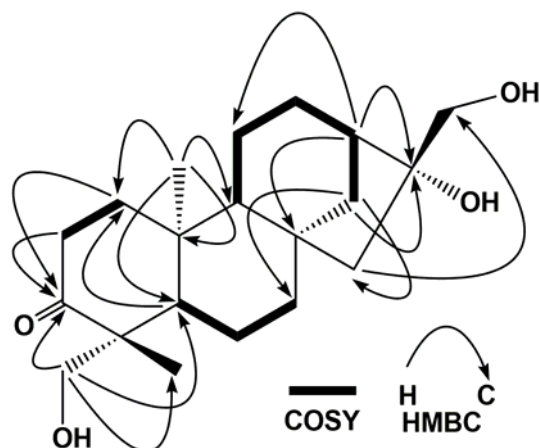
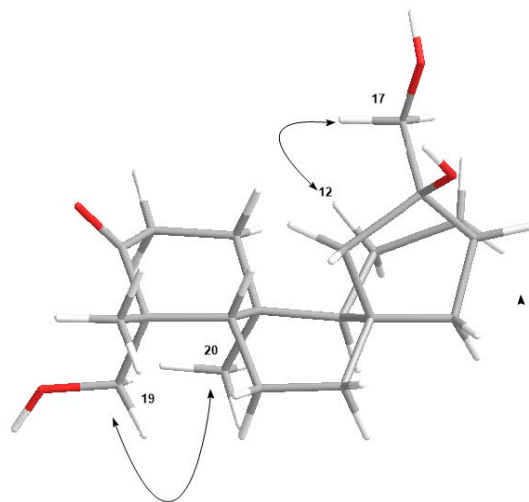


図3

これを確証するために、二次元スペクトルを測定し、解析を行った。すなわち、COSY スペクトルにおいて、1位と2位、6位と7位そして10位から14位に相関



が観測された。ついで、HMBC スペクトルの解析を行い、予想通り図4にみられる相関を確認することができた。また一級水酸基は17位および18位もしくは19位と推察され、残りの水酸基は16位、カルボニル基は3位であった。16位の立体構造および4位のカルビノールキの位置決定のため位相検波 NOESY の測定を行った (図5)。

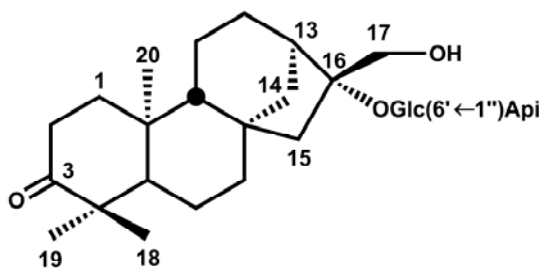


17位のカルビノールのメチレン水素から12位の水素へ相関が観測されたことより、16位の立体を構造式のように決定し、4位にあるカルビノールのメチレン水素より20位のメチルに NOE 相関がみられたことにより19位がカルビノールであると決

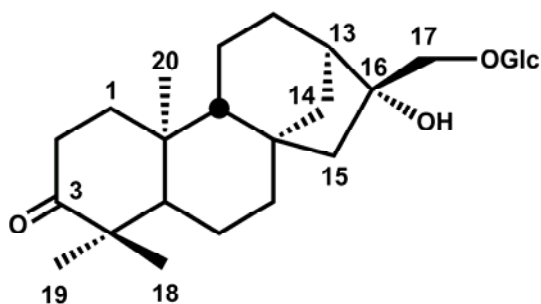
定した。

絶対構造は円偏光二色性スペクトルを測定し、283 nm に負の Cotton 効果 ($\Delta\epsilon$: -0.14) を示すことより、エナンチオ型であると決定した[2]。

化合物 2 及び化合物 3 も化合物 1 と類似の構造を有しており、 $^1\text{H-NMR}$ で 3 本のシングレットメチルが観測され、それらを 18 位、19 位、20 位にアサインした。核磁気共鳴スペクトルの詳細な検討から、その他の部分は化合物 1 と同様の構造を有しており、化合物 2 では 16 位の水酸基に Glc(6)Api が化合物 3 では 17 位の水酸基にグルコースが結合していることが明らかとなった。その後文献検索の結果、化合物 3 は既知であり、sugeroside と同定された[3]。

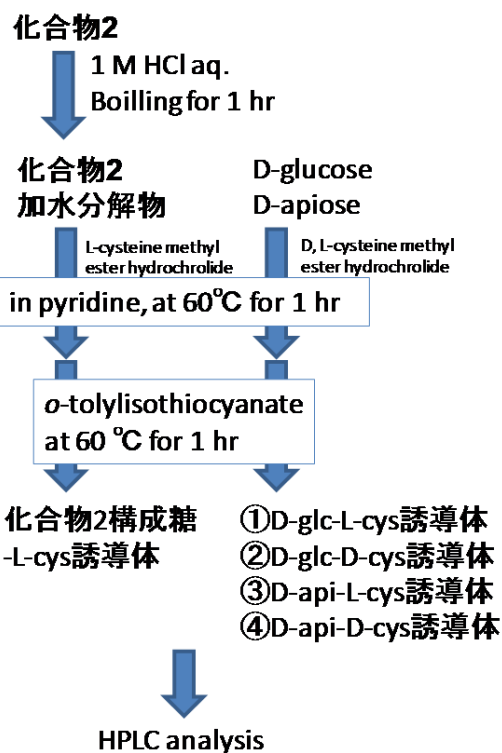


化合物 2



化合物 3

糖の絶対配置の決定は D-, L-システインを用いて誘導体とし、以下の方法を用いて行った。



HPLC 条件

Column: Cosmosil 5C₁₈-AR II 4.6 mm × 250 mm

Detector: Photo Diode Array

Flow rate 0.8ml/min

化合物 2 の加水分解物からは 19.2 min および 32.2 min のピークが検出され、①③と同様の保持時間を示した。よって化合物 2 の構成糖は D-glucose と D-apiose であると結論された。

D. 結論

沖縄県八重山郡竹富町で採集したリュウキュウガキの葉の成分検索を行った。今回の探索研究では 3 種のカウレン誘導体といくつかのフラボンの配糖体を単離したが、ナフトキノン誘導体の単離には至らなかった。今後、ナフトキノン誘導体の単離を目

指すとともに単離した化合物の生物活性にも注目したい。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表等

川上 晋、稲垣昌宣、大塚英昭、松浪勝義、
武田美雄 リュウキュウガキの成分研究
日本生薬学会第62回年会，岐阜（2015.09.）

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他なし

G. 参考文献

- [1] Suwama, T., Watanabe, K.,
Monthakantirat, O., Luecha, P., Noguchi,
H., Watanabe, K., Umehara, K.:
Naphthalene glycosides in the Thai
medicinal plant *Diospyros mollis*. *J. Nat.*
Med., **72**, 220–229 (2018).
- [2] Rüedi, P., Wollenweber, E., Marx, D.,
Scheele, C., Kaurane-type diterpenes
from fern frond exudates. *Z. Naturforsch.*,
44c, 901–904 (1989).
- [3] Hirono, S., Chou, W.-H., Kasai, R.,
Tanaka, O., Tada, T., Sweet and bitter
diterpene-glucosides from *Rubus*
suaviusmus. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**,
1743–1744 (1990).

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

N-Phenylpropenyltadalafil の LC-PDA-MS 分析について

研究要旨 強壯用健康食品への添加が危惧される ED 治療薬アナログ、*N*-Phenylpropenyltadalafil への対応に備え、同化合物の標準品を購入し、各種機器分析データ及び LC-PDA-MS 分析法をまとめた。

協力研究者

最所和宏 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
主任研究官

A. 研究目的

近年、健康食品に無承認無許可医薬品が含まれ、このものが原因と思われる健康被害が発生している。痩身用を標榜した健康食品への食欲抑制剤や下剤及びその作用を有する生薬の混入や、強壯用を謳った健康食品への ED (erectile dysfunction) 治療薬及びその類似化合物 (Fig. 1) の混入などがその代表例であり、このような製品を摂取し、頭痛、嘔吐、動悸などの症状を訴える事例や重篤な場合には、死に至ったケースもある。厚生労働省では、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」を順次、改定し、「医薬品の範囲に関する基準」を提示するとともに、監視業務を強化している。その結果、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、少なくなっている。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。

近年では、国内の市場品から新規の ED 治療薬類縁体の同定は報告されていないが、海外では、依然、様々な新規化合物が報告されている (Fig. 2)。また、最近では、健康食品に混入されるだけでなく、正規品を装った偽造品による健康被害も発生している。

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、実際、海外での報告から数年後に、日本の市場品から検出される例が認められている。一方、ED 治療薬の正規品の製造メーカー 4 社が合同で行ったインターネット調査では、偽造品が流通していることは認識しながらも、自分が購入したものは、本物であると根拠なく認識している男性が多数存在することが明らかになっている¹⁾。このことから、ED 治療薬類縁体による健康被害防止のためには、購入者に対する注意喚起を強化する傍ら、これまで同様、監視業務を継続する必要があると考えられる。

本研究では、海外において新規に流通事例が

報告された化合物群を含有する健康食品が流通した場合に備え、それらの内、*N*-Phenylpropenyltadalafil (**1**)の標準品を入手し、各種機器分析データ及び LC-PDA-MS 分析法をまとめた。

B. 研究方法

1. 実験材料

1 の標準品は、TLC Pharmachem 社より購入した。

ED 治療薬及びその類縁体を含有する健康食品は、当研究部の試験業務により、当該化合物を含有することが既に確認されていた 3 製品を用いた (Table 1)。

2. 実験方法

2-1. 試料調製

1 について、1 mg をそれぞれメタノール 1 mL に溶解し標準溶液 A とした。このものを、メタノールでさらに 10 倍積したものを、標準溶液 B とした。

ED 治療薬及びその類縁体を含有する健康食品 (Table 1)、それぞれ 100 mg に 1%ギ酸溶液/アセトニトリル (1/4) 1 mL を加え、10 分間振とう抽出を行った。さらに遠心分離を 3000 G にて 5 分間行い、上清を分取した。各製品由来の抽出液 240 μ L に、標準溶液 A を 30 μ L スパイクしたものを分析用試料とした。

2-2. LC-PDA-MS 分析

厚生労働省の通知²⁾を参考に以下の条件で行った。

LC 条件

カラム : Inertsil ODS-3 (2.1 \times 150 mm, 5 μ m; GL Sciences)

移動相 A 液 : アセトニトリル/5 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) 25/75

移動相 B 液 : アセトニトリル

グラジエント (A 液/B 液) : 100/0 (0-3 min) - 3%/min - 70/30 (13-30 min)

流速 : 0.3 mL/min

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 (モニター波長 290 nm)

MS 条件

イオン化法 : ESI ポジティブモード

乾燥ガス流量 : 10 L/hr

コーンガス流量 : 1.5 L/hr

DL 温度 : 250 $^{\circ}$ C

ヒートブロック温度 : 200 $^{\circ}$ C

キャピラリー電圧 : 1.1 kV

質量電荷比範囲 : 100-800

C. 研究結果

上記の条件において、**1** の標準溶液 B を LC-PDA-MS 分析した結果、約 28.3 分に溶出され、その UV スペクトルパターンは、225, 290 nm 付近に吸収極大を持ち、論文報告のものと同様であった (Fig. 3-C)³⁾。また、マススペクトルについても、**1** の構造から予想される分子量に由来する擬似分子イオンピークをベースピークとして認めた (Fig. 3-D)。ただし、昨年度、同様の分析に供した *N*-cyclopentylnortadalafil 及び dipropylaminopretadalafil に比べ、夾雑ピー

クが多く認められた。

本分析法の有用性を確認するために、ED 治療薬及びその類縁体が含まれていることが既知の健康食品製品から調製した試料溶液に、各化合物の標準溶液を一定量、添加し、同様に分析を行った。

国立医薬品食品衛生研究所が行っている強壯用健康食品の収去試験における測定対象物質を中心に、これまで健康食品中から報告された ED 治療薬及びその類縁体と質量数を Table 2 に示した。1 と同じ質量数 504 を持つ化合物として、hydroxyhomosildenafil, homothiodenafil が存在することから、これらは、質量分析計による分離が不可能である。このため、1 の分析法を考える上では、両化合物とカラム分離することが要求される。このため、それぞれの化合物を含有することが既知の健康食品製品である三便宝と Pinger を用いて確認を行った。その結果、いずれの成分も良好な分離を示し、それぞれの化合物の同定が可能であった (Fig. 4)。

D. 考察

海外の健康食品市場に流通する製品から、検出事例が報告された 1 の標準品を購入し、各種機器分析データ及び分析法をまとめた。ウデナフィルの分析方法として厚生労働省通知された分析条件において、担体に十分に保持され、分析が可能であることが確認されたが、これまで、本研究班で検討した類似の化合物に比べて

感度が低いことから、高感度分析のためには、分析条件の変更を検討する必要性が認められた。

E. 結論

強壯用健康食品への添加が危惧される ED 治療薬アナログの内、N-Phenylpropenyltadalafil への対応に備え、同化合物の標準品を購入し、各種機器分析データ及び分析法をまとめた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

参考文献

- 1) ファイザー株式会社, ED 治療薬使用者の購入ルートによる偽造品への意識・実態の違いを調査. 平成 23 年 6 月 29 日, http://www.pfizer.co.jp/pfizer/company/press/2011/2011_06_29.html.
- 2) 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.
- 3) Y. C. Huang, H. C. Lee, Y. L. Lin *et al.*, *Food Addit. Contam. Part A*, **33**, 179-185 (2016).

Table 1. The list of health supplement including therapeutic agents for erectile dysfunction (ED) and their derivatives

品名	含有成分
陰莖增大丸	sildenafil, tadalafil
三便宝	hydroxyhomosildenafil, tadalafil
Pinger	homosildenafil, homothiodenafil

Table 2 The list of popular ED therapeutic agent and their derivatives

No.	Compound name	Compound type	Exact mass
1	Sildenafil	Sildenafil	474.58
2	Vardenafil	Vardenafil	488.60
3	Tadalafil	Tadalafil	389.40
4	Homosildenafil	Sildenafil	488.60
5	Hydroxyhomosildenafil	Sildenafil	504.60
6	Hongdenafil	Sildenafil	466.58
7	Udenafil	Sildenafil	516.66
8	Aminotadalafil	Tadalafil	390.39
9	Pseudovardenafil	Vardenafil	459.56
10	Hydroxyhongdenafil	Sildenafil	482.58
11	Xanthoantrafil	others	389.40
12	Norneosildenafil	Sildenafil	459.56
13	Nitrodenafil	Sildenafil	357.36
14	Thiodenafil	Sildenafil	490.64
15	Thioquinapiperifil	others	448.58
16	Homothiodenafil	Sildenafil	504.67
17	Norhongdenafil	Sildenafil	452.55
18	Acetil acid	Sildenafil	356.38
19	Imidazosagatriazinone	Sildenafil	312.37
20	Mutaprodenafil	Sildenafil	629.75

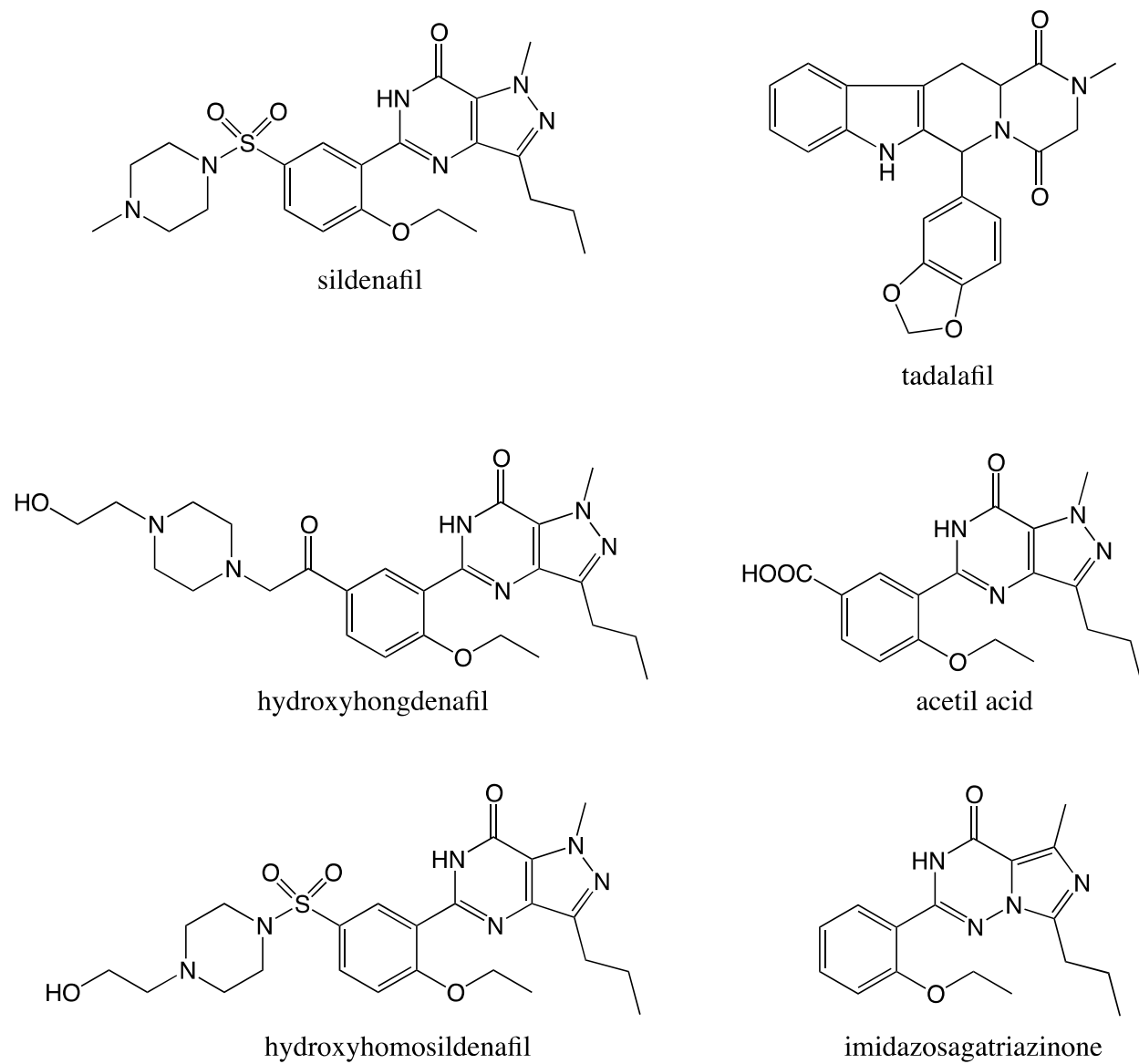


Fig. 1 Structures of several therapeutic agents for ED and their analogues

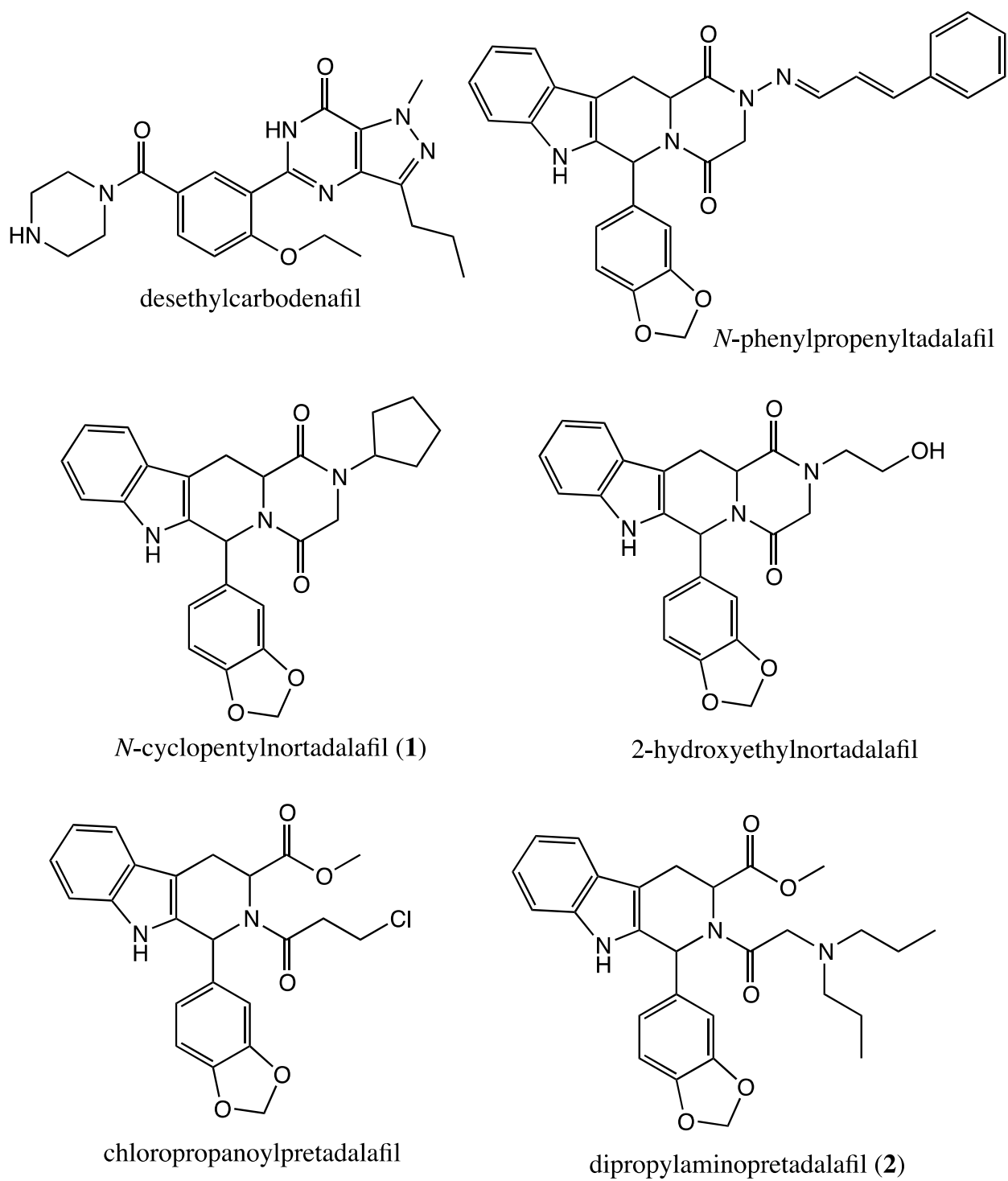
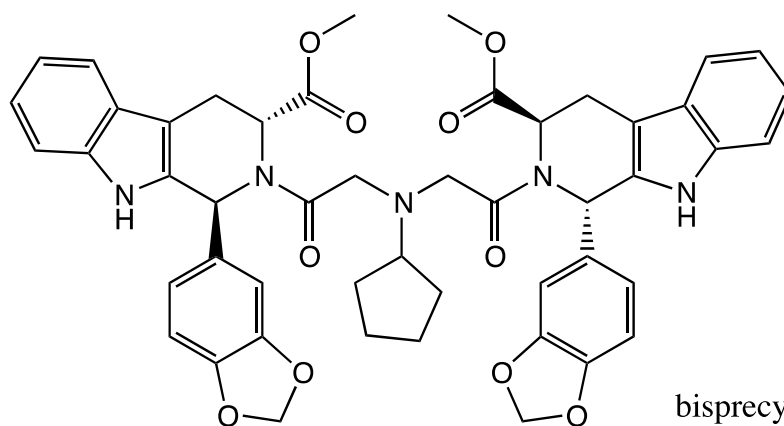
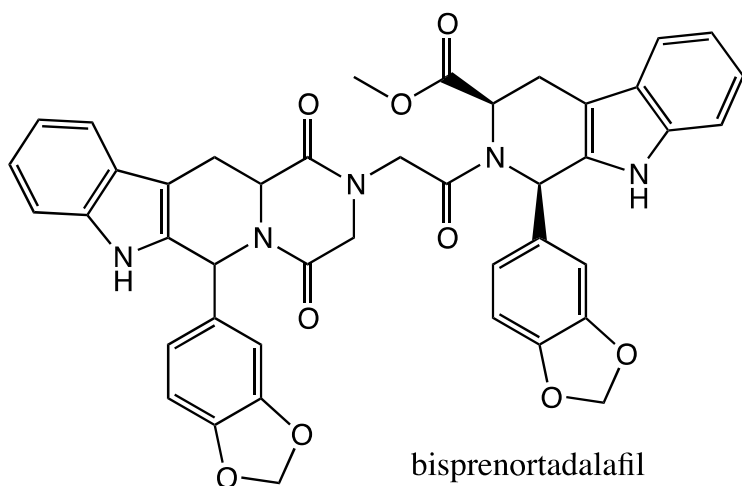


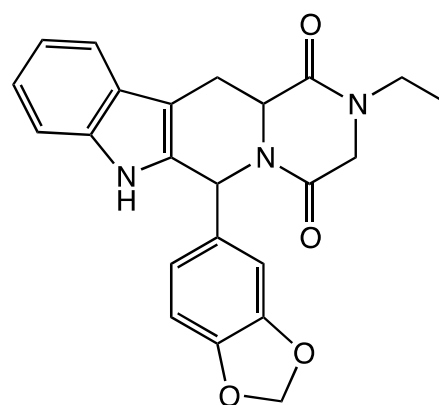
Fig. 2 Structures of newly reported ED treatment drug analogues



bisprecyclopentyltadalafil



bisprenortadalafil



homotadalafil

Fig. 2 Continued

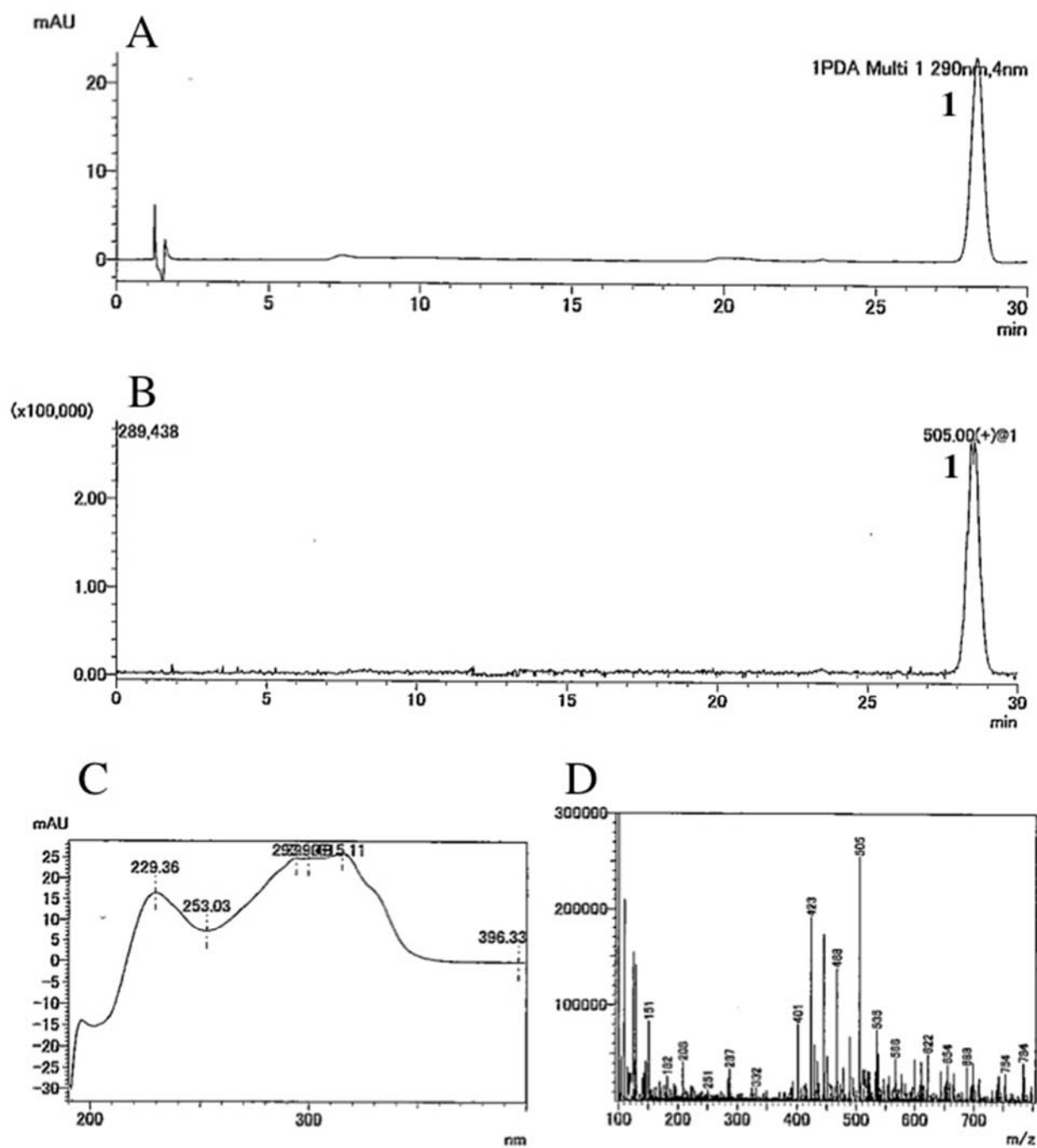


Fig. 3 LC chromatograms and spectroscopic data of *N*-Phenylpropenyltadalafil (1)
 A: Chromatogram at 290 nm on LC-PDA-MS analysis
 B: Mass chromatogram at m/z 505 on LC-PDA-MS analysis
 C: UV spectrum of peak 1 (*N*-Phenylpropenyltadalafil)
 D: Mass spectrum of 1 (*N*-Phenylpropenyltadalafil)

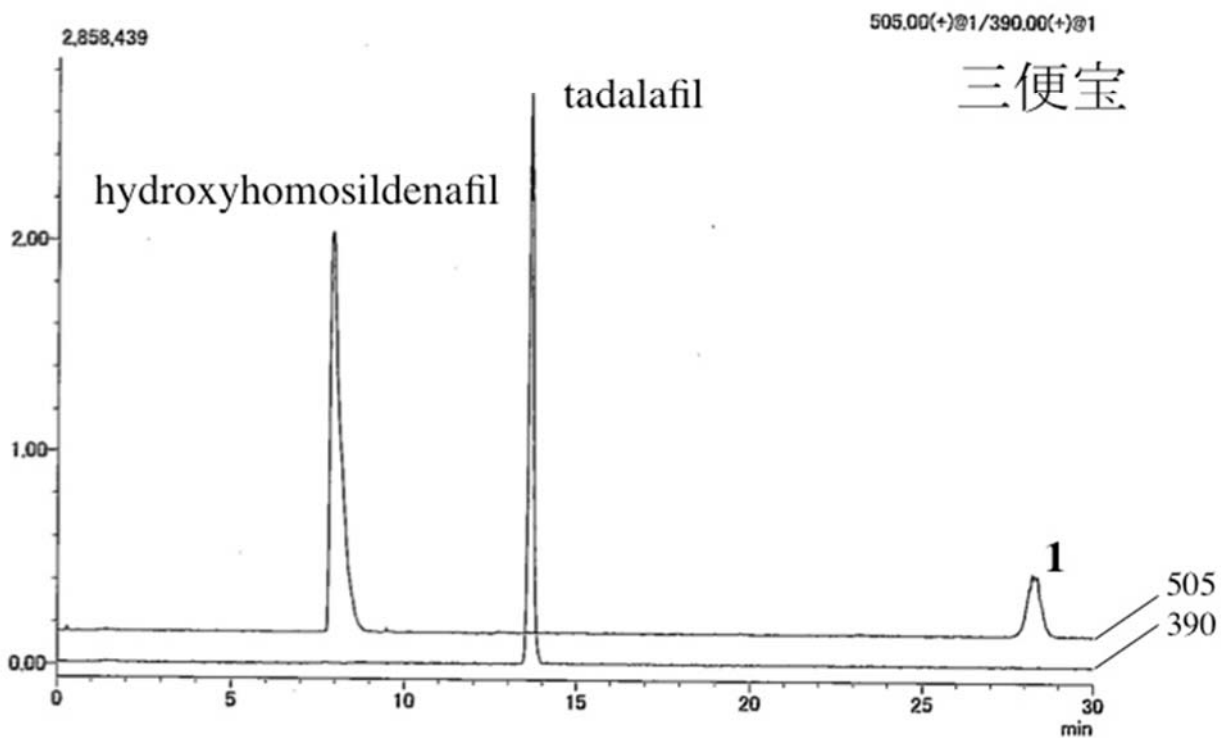
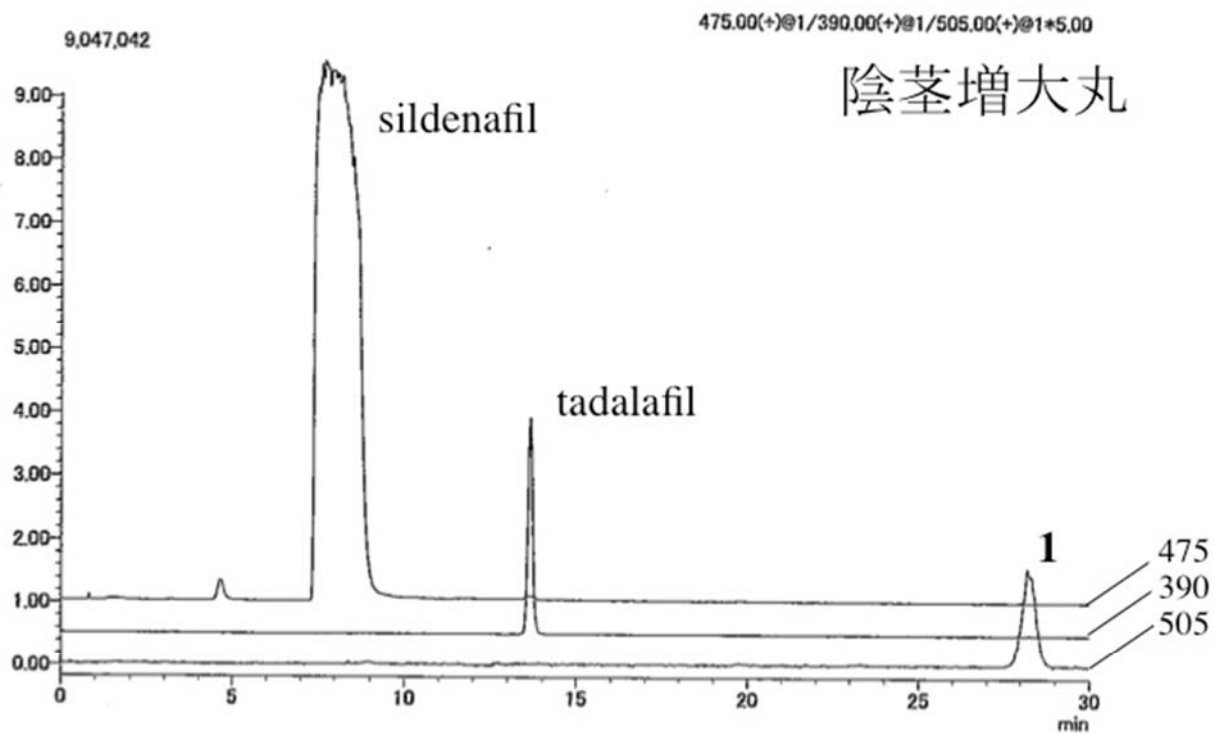


Fig. 4 Mass chromatograms of food supplements for tonicity spiked with authentic *N*-Phenylpropenyltadalafil (**1**)

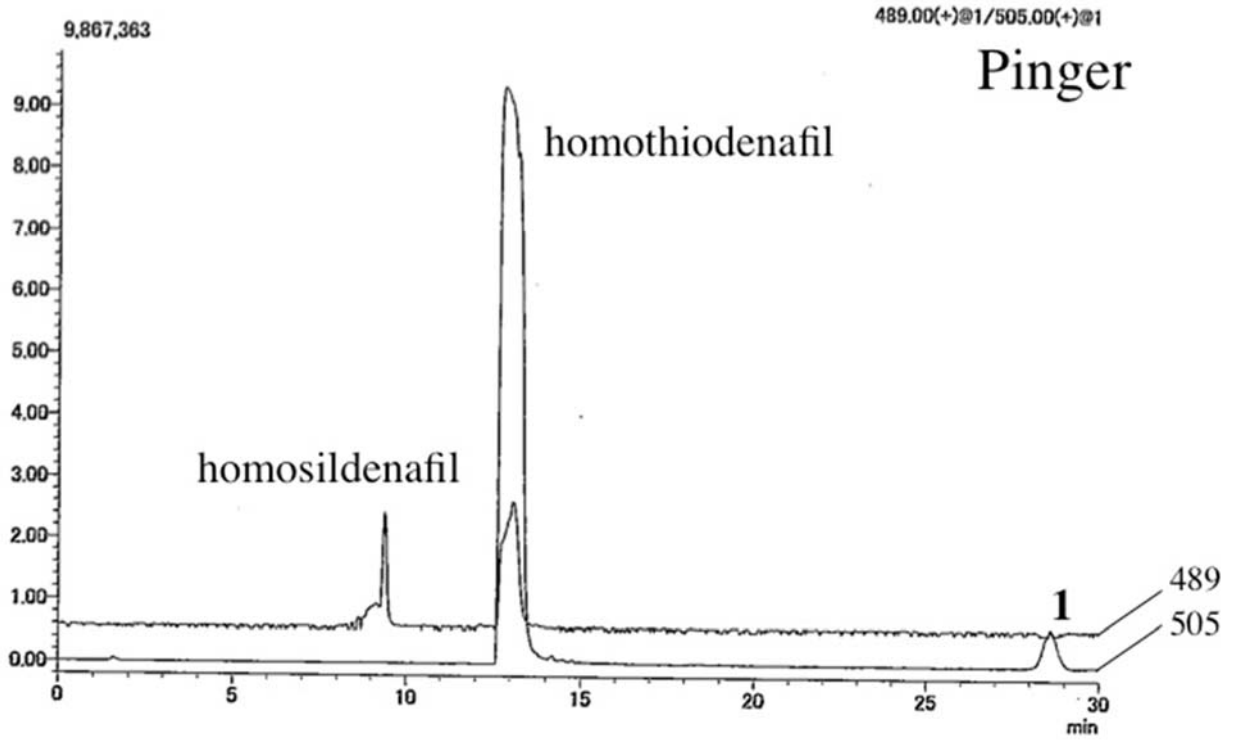


Fig. 4 Continued

分担研究報告書

分担研究課題 量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 第一室長 丸山卓郎

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 第二室長 内山奈穂子

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 袴塚高志

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所薬品部長 合田幸広

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長 西川秋佳

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所病理部 部長 小川久美子

平成 12 年より食薬区分の判断基準から錠剤，カプセル剤が事実上除かれたことを受けて，植物素材の濃縮エキス由来の錠剤，カプセル剤が，健康食品として流通することにより，過剰摂取に起因すると思われる健康被害事例が認められている．このため，食薬区分の判断に量的概念を加えた規制のあり方の検討として，ゲニポシド，ゲニピン，センノシドについて，毒性，既存の関連品目の規制値，副作用情報，有害事象報告を調査し，ゲニポシド，ゲニピンについて，薬用量を基準とした改定案をまとめた．

A. 研究目的

無承認無許可医薬品は，医薬品としての製造販売承認を持たずに，疾病の治療や予防など，本来，医薬品が担うべき目的性を，暗に有した製品である．これらの製品は，医師，薬剤師等，医療従事者の管理・監督外に流通することにより，意図せぬ副作用の発現，正当な医療機会の喪失等の健康被害に加え，標榜される効果に乏しい製品の服用による経済被害など，使用者に対して多くの不利益となる．また，正規の医薬品と異なり，その副作用による健康被害は，公的な副作用救済制度の対象外であることも，健康被害発生時の対応を，より困難なものにしている．このため，行政として，これらの製品の流通を，未然に防ぐ制度の設計が求められる．厚生労働省では，昭和 46 年 6 月 1 日付け薬発第 476 号厚生省薬務局長通知「無承認基準無許

可医薬品の指導取締りについて」を逐次，改正することにより，人が経口的に服用する物が医薬品に該当するかどうかの判断を行ってきているが，平成 12 年の改定（医薬発第 392 号）により，製品形状の規制から，錠剤及びカプセル剤が除かれたため，現在，植物成分の濃縮エキス由来の錠剤，カプセル剤が，健康食品として流通している．これらの製品は医薬品ではないため，消費者の服用コンプライアンス意識が低い場合があり，結果として，過剰摂取による健康被害の一因となっている．

このような背景から，食薬区分の判断基準に，含有成分の量的な概念を加えた規制の必要性が指摘されており，本研究班では，規制のあり方について検討を行ってきている．これまでの議論により，量的規制対象候補化合物として，ゲニポシド，センノシド，クマリン，アントラ

キノンが挙げられており、昨年度、ゲニポシドの毒性情報、規制の際に考慮すべき他の公定規格などの調査を行った。今年度は、ゲニポシドのアグリコン（非糖部）であるゲニピンと、もう一つの候補化合物であるセンノシドについて、上記項目及び医薬品としての副作用情報の調査を行った上で、ゲニポシド、ゲニピンについては、薬用量を基準とした規制案をまとめた。なお、考察の都合上、昨年度の報告書に記載のゲニポシドの情報も、共に記載した。

B. 研究方法

毒性情報調査は、RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances) 及び Botanical Safety Handbook などによった。副作用情報は、医薬品医療機器総合機構が提供する医薬品副作用データベースを利用した。その他の情報は、以下の公定書、書籍を参照するとともに、必要に応じて、Google Scholar による関連文献情報の検索を行った。

- ・ 第17改正日本薬局方
- ・ 日本薬局方外医薬品規格 2002（局外規）
- ・ 日本薬局方外生薬規格 2015（局外生規）
- ・ 食品添加物公定書第8版
- ・ 医薬部外品原料規格 2006
- ・ 日本医薬品情報センター編，一般用医薬品集 2017
- ・ 日本医薬品情報センター編，医療用医薬品集 2017
- ・ 第24回生薬に関する懇談会『山梔子』講演要旨集
- ・ 局方医薬品承認申請の手引

C. 研究結果と考察

各化合物の構造を Figs. 1, 2 に示し、調査概要を Table 1 にまとめた。

C-1. ゲニポシド，ゲニピン

ゲニポシドは、クチナシの果実に含まれるイリドイド配糖体の一つである。局方収載生薬サンシシは、このクチナシの果実に由来する生薬であり、その利胆作用は、ゲニポシドが、腸管で加水分解されて生成したゲニピンが、肝臓中で、トランスポーターMrp2 の発現誘導、胆管膜上への移動を促進することにより、ビリルビンの排泄を促すことによるものと推測されている。このため、日局では、サンシシに対してゲニポシド 3.0%以上を含むと規定している。一方で、クチナシは、黄色色素クロシンを含むことから、食品添加物としても利用されており、食品添加物公定書には、クチナシ黄色素、クチナシ青色素、クチナシ赤色素が収載されている。この内、クチナシ黄色素には、純度試験としてゲニポシド 0.5%以下（色価 100 換算）が規定されているが、この規格は、ゲニポシドの毒性によるものではなく、被添加食品中のタンパク質とゲニピンが反応して青色色素を生成することにより、黄色色素としての品質の低下を招くことを阻止するためのものである。なお、クチナシ青色素は、この性質を利用して調製されている。他に、関連する公定書上の規格としては、医薬部外品原料規格 2006 に、クチナシエキス、クチナシ青液、クチナシ黄が収載されているが、ゲニポシド、ゲニピンの含量についての規格は、設定されていない。医薬部外品は食薬区分上、医薬品として扱われ、今回の量的規制の検討の妨げにはならないため、上記品目のゲニポシド、ゲニピン含量の調査は行わなかった。

ゲニポシド、ゲニピンの毒性情報を RTECS により検索した結果、ゲニポシドについては、in vivo での毒性情報は、認められなかった。一

方、ゲニピンの毒性については、千葉大の原田ら（後の国立衛生試験所生薬部長）による報告があり、マウスにおける LD₅₀ 値は、経口で、237 mg/kg、腹腔で、190 mg/kg、静注で、153 mg/kg であった。食薬区分の判断の際に参考とすべき、経口投与における毒性値は、劇薬相当である。ゲニポシドが、生体中でゲニピンに代謝されることを考え合わせると、ゲニポシドとゲニピンの和として、量的規制を考える必要がある。

医薬品としての副作用情報については、サンシシを単味で用いることはないことから、サンシシを配合する代表的な漢方処方に対して検索を行った。その結果、加味逍遙散、黄連解毒湯、辛夷清肺湯、茵陳蒿湯において、腸間膜静脈硬化症や肝障害の報告が見られ、特に、前3者での報告が多かった。日本漢方生薬製剤協会による生産動態調査（2014年）における、これらの処方の生産高順位は、記載順に 5, 34, 49, 79位であり、症例数の多寡は、使用量を反映したものと思われる。上記4処方の添付文書には、副作用情報として腸間膜静脈硬化症と肝機能障害についての記載が共通して見られる。この内、腸間膜静脈硬化症については、病理所見として、患者の患部に青色色素の沈着が認められることから、直接的なエビデンスはないものの、サンシシ中のゲニポシド及びその代謝物であるゲニピンが、本症状に関与していると推測されている。

これらの漢方処方中のゲニポシド含量としては、加味逍遙散と黄連解毒湯について、日局の規定があり、25-135 mg である。

以上のことから、ゲニポシドの量的規制としては、最小の薬用量である 25 mg より十分に低い値として、2.5 mg を設定し、ゲニピンとの和として規制すべきと考える。

ゲニポシド類の含有植物としては、クチナシを含めて、アカネ科植物が多く、他に、シソ科、クマツヅラ科植物などからも報告がある。このため、ゲニポシド、ゲニピンを含む全ての植物素材に、この規制値を適用した場合、予期せぬ植物素材が規制対象となり、流通、生産阻害を引き起こす恐れがある。このことから、規制の範囲については、クチナシに限定するのが望ましいと思われる。

以上の結果を反映させた非医リスト改正案を Table 2 に示した。

C-2. センノシド

センノシドは、センナやダイオウに含まれるビスアンスロン誘導体である。センノシドは体内でβ-グルコシダーゼにより糖が外れてセニジンとなり、さらに代謝され、レインアンスロンとなり、大腸壁を刺激して蠕動運動を活発にして瀉下作用をもたらすとされている。

センナについては、日局では、センナ及びセンナ末に対して、総センノシド[センノシドA及びセンノシドB] 1.0%以上を含むと規定している。また、局外規では、センナエキスに対して、センノシドAとして 15.0~25.0%を含むと規定している。さらに、局外生規では、センナ実に対して、総センノシド[センノシドA及びセンノシドB] 1.0%以上を含むと規定している。

また、ダイオウ及びダイオウ末に対しては、センノシドA 0.25%以上を含むと規定している。さらに、局方収載の漢方処方中のセンノシド含量については、大黃甘草湯エキスは、センノシドA：3.5 mg 以上（ダイオウ 4 g 処方）、桃核承気湯エキスは、センノシドA：3 mg 以上（ダイオウ 3 g 処方）、乙字湯エキスは、センノシドA：0.5 mg 以上（ダイオウ 0.5 g の処方）、センノシドA：1 mg 以上（ダイオウ 1 g の処

方) と規定されている。

なお、食品添加物公定書第8版及び医薬部外品原料規格 2006 に、センナ及びダイオウについての記載はなかった。

センノシドの毒性情報を RTECS 及び Scifinder により検索した結果、Marvola らの報告によると、マウスにおける LD₅₀ 値は、センノシド A 及び B の総量として、経口では 5000 mg/kg 以上、静注では 4100 mg/kg であった [1]。また、20%センナエキスの LD₅₀ 値は、経口では 5000 mg/kg 以上、静注では 171 mg/kg であった [1]。また、Mengs の報告では、ラット及びマウスにおける LD₅₀ 値は、センノシドとして、経口では約 5000 mg/kg であった [2]。従って、食薬区分の判断の際に参考とすべき、経口投与における毒性値としては、センノシド A、B の総量についての毒性は低いと考えられた。一方、センナエキスとしての毒性は静注では劇薬基準 (<100 mg/kg) より低いものの注意すべき値であると考えられた。

医薬品としての副作用情報については、(センノシド内用薬) として、嘔吐、無力症、死亡、薬物性肝障害、胃腸炎、帯状疱疹、血中ナトリウム減少、痙攣発作、多発性硬化症再発、好酸球増加と全身症状を伴う薬物反応など、(センナ・センナ実内用薬) として、全身性皮疹、薬疹の報告があった。また、Botanical Safety Handbook では、センナの葉及び果実(さや)：クラス 2d に分類されている。

また、センナ及びダイオウの成分として、同様に瀉下作用を有するレインなどのアントラキノン類の含量についても検討する必要があると考えられ、センノシドの規格値については

今後も継続して検討することとなった。

D. 結論

食薬区分の判断に量的概念を加えた規制のあり方の検討として、ゲニポシド、ゲニピン、センノシドについて、毒性、既存の関連品目の規制値、副作用情報、有害事象報告を調査し、ゲニポシド、ゲニピンについては、薬用量を基準とした改定案をまとめた。

E. 研究発表

1. 学会発表

該当無し

2. 誌上発表

該当無し

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

G. 参考文献

- [1] Marvola, M.; Koponen, A.; Hiltunen, R.; Hietala, P. The effect of raw material purity on the acute toxicity and laxative effect of sennosides. *J Pharm Pharmacol* (1981), 33(2), 108-109.
- [2] Mengs, U., Toxic effects of sennosides in laboratory animals and in vitro. *Pharmacology* (1988), 36(Suppl. 1), 180-187.

Table 1 ゲニポシド，ゲニピン，センノシドの調査結果

		ゲニポシド	ゲニピン	センノシド
毒性情報		RTECSにおいて, in vivoのデータ無し	mouse, LD ₅₀ : 237 mg/kg (po), 190 mg/kg (ip), 153 mg/kg (iv) (原田ら, 薬学雑誌, 94, 157-162 (1974)) po, rat, TDL ₀ >50 mg/kg, 胃腸障害 (Food and Chemical Toxicology, 47, 1127 (2009))	<LD ₅₀ > ●mice, sennoside A+B 4100 mg/kg (iv), >5000 mg/kg (po), 20% sennoside ext. :171 mg/kg (iv), >5000 mg/kg, (po) . (Marvola M. et al., J Pharm Pharmacol, 1981, 33, 108-109). ●rats and mice, about 5000 mg/kg (po) (Mengs U., Pharmacology,1988, 36(Suppl. 1), 180-187).
公定規格	日本薬局方	(サンシシ) ゲニポシド 3.0%以上 (黄連解毒湯エキス) ゲニポシド 30-90 mg (サンシシ 2 g 処方) 45-135 mg (サンシシ 3 g 処方) (加味逍遙散エキス) ゲニポシド 25-75 mg		(センナ, センナ末) 総センノシド含量 (センノシドA+B) 1.0% 以上 (ダイオウ, ダイオウ末) センノシドA:0.25%以上 (大黃甘草湯エキス) センノシドA:3.5 mg以上 (ダイオウ 4 g 処方) (桃核承気湯エキス) センノシドA 3 mg以上(ダイオウ 3 g 処方) (乙字湯エキス) センノシドA 0.5 mg以上又はレイン1.5 mg以上 (ダイオウ0.5 gの処方), センノシドA 1 mg以上又はレイン3 mg以上(ダイオウ1 gの処方)
	日本薬局方外医薬品規格	該当品目無し		(センナエキス) 総ヒドロキシアントロン誘導体[センノシドAとして]15.0 ~ 25.0 %を含む. センナエキス1.0 g は, センナ(日局)約20 g に相当する.
	日本薬局方外生薬規格	該当品目無し		(センナ実) 総センノシド含量 (センノシドA+B) 1.0% 以上
	医薬部外品原料規格	(クチナシエキス, クチナシ黄, クチナシ青液) 含量規格無し		(センナ) 記載無し
	食品添加物公定書	(クチナシ黄色素) ゲニポシド 0.5%以下 (色価100換算)		該当品目無し
	局方医薬品承認申請の手引			(センナ) 1日量3~6 g (センナ末) 1日1回, 0.2~0.5 g
副作用情報		(サンシシ配合漢方処方) 茵陳蒿湯 腸間膜静脈硬化症 黄連解毒湯 腸間膜静脈硬化症, 間質性肺疾患, 肝障害など 加味逍遙散 腸間膜静脈硬化症, 肝障害など 辛夷清肺湯 肝障害, 腸間膜静脈硬化症, 間質性肺疾患など		(センノシド内用薬) 嘔吐, 無力症, 死亡, 薬物性肝障害, 胃腸炎, 帯状疱疹, 血中ナトリウム減少, 痙攣発作, 多発性硬化症再発, 好酸球増加と全身症状を伴う薬物反応など (センナ・センナ実内用薬) 全身性皮疹, 薬疹 (PMDA 副作用データベース)

Table 2 ゲニポシド類の量的概念を加えた改定案

名称*	他名等*	部位	備考
サンシシ	クチナシ	果実・茎・葉	ゲニポシドとゲニピンの一日摂取量の和が2.5 mg を超えるものは「医」

*: 現在検討中の見直し案では, 標準和名であるクチナシが名称, 生薬名であるサンシシが他名とされている.

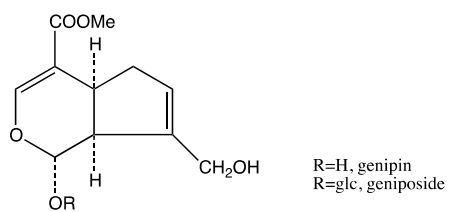


Fig. 1 Structures of genipin and geniposide

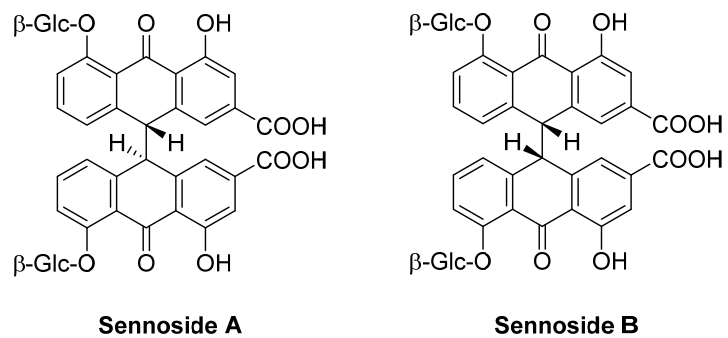


Fig. 2 Structures of sennosides A and B

分担研究報告書

分担研究課題 量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究

研究分担者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部第二室長

研究協力者 辻本 恭 国立医薬品食品衛生研究所 派遣研究員

LC-MS を用いた *Cassia* 属ハネセンナおよびセンナの分析に関する研究

ハネセンナはキャンドルブッシュ、ゴールデンキャンドル等の名称で、瘦身、便秘の解消などの目的で健康食品として広く使用されている。一方、類似の植物として挙げられるセンナは、小葉が日本薬局方(日局)に記載されている医薬品であり、葉軸、葉柄、果実を含め「専ら医薬品として使用される成分本質」(「専ら医薬品」)として規制されている。センナにおいては、茎のみが医薬品として判断しない成分本質(非医薬品)として分類されている。しかしながら、センナ茎含有と表示された市販製品の中には、医療用医薬品の一日最小服用量で摂取される量に近い含量の **Sennoside** が検出され、製品中には「専ら医薬品」であるセンナの小葉や葉軸、果実などが混入していた例が報告されている。そこで、センナ茎およびハネセンナ(キャンドルブッシュ、ゴールデンキャンドル)を含む製品中の **Sennoside** の検出・定量を目的とし UPLC-MS を用いた分析法の検討を行った。まず、日局センナと国産ハネセンナ葉を試料として既報の条件を参考に分析を行ったところ、**SennosideB** のピークに近い保持時間を持つピークが重なっており、分離が不十分であった。そこで移動相及びグラジエント条件の検討を行った結果、**SennosideB** を単独のピークとして検出することが可能となった。また、得られた LC-MS データを用いてセンナおよびハネセンナの判別分析を行い、**Vicenin-II** がセンナ特有の指標成分と成り得る可能性が示唆された。しかし、現時点ではハネセンナのサンプル数が少ないため、今後サンプル数を増やし解析を行う予定である。

研究協力者

丸山卓郎:国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
第一室長

徳本廣子:国立医薬品食品衛生研究所 非常勤
職員

川原信夫:国立研究開発法人 医薬基盤・健康・
栄養研究所 薬用植物資源研究センター長

林 茂樹:国立研究開発法人 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 主任研究員

安食菜穂子:国立研究開発法人 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 研究員

A. 研究目的

ハネセンナはキャンドルブッシュ、ゴールデンキ
ャンドル等の名称で、瘦身、便秘の解消などの目
的で、健康食品として広く流通している。

一方、類似の植物として挙げられるセンナは、
小葉が日本薬局方(日局)に記載されている医薬
品であり、葉軸、葉柄、果実を含め「専ら医薬品と
して使用される成分本質」(「専ら医薬品」)として
規制されている。センナにおいては、茎のみが医
薬品として判断しない成分本質(非医薬品)として
扱うことができる。しかしながら、センナ茎含有と表
示された市販製品の中には、医療用医薬品の一

日最小服用量で摂取される量に近い含量の Sennoside が検出され、製品中には「専ら医薬品」であるセンナの小葉や葉軸、果実などが混入していた例が報告されている [1]。

ハネセンナにおいても Sennoside が含まれているため、市販のハネセンナ(キャンドルブッシュ)を含む製品に関する健康被害事例も報告されている [2]。そこで本研究では UPLC-MS による Sennoside およびその類縁化合物の定量分析を目的とした条件検討を行った。

B. 研究方法

【実験材料】

栽培品:ハネセンナ *Cassia alata* は 2015 年 11 月および 2016 年 12 月に国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究部より供与された栽培品の植物体の一部(花、植物体上部の主茎と葉、植物体中部の主茎と側枝および側枝の葉、植物体下部の主茎)を使用した (Table 1)。

市販製品:日局センナは、国内メーカーを通じて入手したものを使用した (Table 1)。

【試料及び調製法】

市販の日局センナ(5 種)、ハネセンナ葉(2 種)、について分析を行った。各検体をミキサール MM400 (Verder Scientific 社製)にて粉碎した(20 Hz、30 sec)。得られた粉末試料 100 mg を秤量し、70% MeOH 2.5 ml に懸濁し、超音波処理(10 min)の後遠心分離した(2800 rpm、10 min)。上清を分離し、残渣を再度 70% MeOH 2.5 ml に懸濁し、超音波処理(10 min)の後遠心分離した(2800 rpm、10 min)。分離し併せた上清を 5 ml にメスアップし、20 mg/ml 溶液として測定に供した。

【試薬】

Sennoside A,B は和光純薬工業より購入した。Vicenin- II は Phytolab GmbH & Co., KG より購入し、Tinnevellin glucoside は Ark Pharm より購入した。

【分析条件】

[高分解能 LC-MS] 装置:UltiMate 3000 RS LC system 及び Q Exactive Quadrupole-Orbitrap ハイブリッド型質量分析計(Thermo Fisher Scientific 社製)、カラム:ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 x 2.1 mm、particle size 1.8 μ m、Waters 社製)

質量分析条件 イオン化:エレクトロスプレーイオン化(ESI)法、Positive and negative mode、Capillary temperature: 320 $^{\circ}$ C、Vaporizer temperature: 300 $^{\circ}$ C、Desolvation gas: helium、Splay voltage: 4.0 KV、Cone voltage: 35.0 V、Normalized collision energy: 30.0 V、mass spectral range: m/z 150-2000。キャリブレーション: LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution 及び ESI Negative Ion Calibration Solution (何れも Pierce 社製)を使用した。

【判別分析】

測定データをメタボローム解析ソフトウェア Progenesis QI ver. 1.0 (Waters) で処理し、ピークの検出(ピーク強度、保持時間(RT)、質量数(m/z))、アライメントを行い、EzInfo (Waters)でデータマトリクスの作成を行った。このデータマトリクスを SIMCA Ver. 14 (Umetrics) を用いて判別分析を行った。

C. 研究結果

1. HPLC 条件の検討

まず、市販の日局センナ抽出物を用いて既報 [3]の条件を参考に分析を行った。

【分析条件 1】[3]

移動相:A = 0.1% ギ酸水溶液; B = 0.1% ギ酸アセトニトリル

グラジエント条件:82%A/18%B (0–2 min hold)、to 81%A/19%B (2–15 min hold)、to 70%A/30%B (15–32 min) to 50 %A/50%B (32–38 min)、to 82%A/18%B (38–40 min、6 min hold)。流速 0.3 ml/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C

上記の条件で分析した結果、SennosideB のピークに重なるピーク①が観測され、本条件では分

離が不十分であった (Fig. 1, 2)。

そこで、ギ酸水-アセトニトリル系を用いて以下の4種の分析条件で検討を行った。

【分析条件 2】移動相: A = 0.1% ギ酸水溶液; B = アセトニトリル

【分析条件 2-1】: 90%A/10%B to 80%A/20%B (0-45min)、to 5%A/95%B (45-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-1)

【分析条件 2-2】: 90%A/10%B to 85%A/15%B (0-15min、15min hold)、to 80%A/20%B (30-37.5min)、to 5%A/95%B (37.5-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-2)

【分析条件 2-3】: 90%A/10%B to 85%A/15%B (0-10min、20min hold)、to 80%A/20%B (30-37.5min)、to 5%A/95%B (37.5-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-3)

【分析条件 2-4】: 90%A/10%B to 85%A/15%B (0-5min、20min hold)、to 80%A/20%B (25-37.5min)、to 5%A/95%B (37.5-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-4)

分析の結果、いずれの条件においても Sennoside B とピーク①を分離することは困難であった (Fig. 3)。また、精密質量分析より、ピーク①の分子式は $C_{42}H_{40}O_{19}$ (分子量 848.21) と推測された (calcd. for $C_{42}H_{40}O_{19}$ (M-H) 847.2080, found. 847.2086) (Fig. 4b)。また MS/MS のフラグメントより2つのヘキソースが O-グリコシドとして含まれ、1つのカルボン酸が含まれているものと考えられた (Fig. 4c)。また、ピーク①は、Sennoside A 及び B と同様に、ビスアントラキノン骨格に由来する 354nm の吸収をもつことから、Sennoside 類縁体である事が予測された (Fig. 5)。

次に、ギ酸-水-アセトニトリル系では、Sennoside B のピークの分離が困難であったため、溶出液 B にメタノール系を用いてさらに以下のグラジエント条件で検討を行った。

【分析条件 3】

移動相: A:0.1%ギ酸水溶液、B:0.1%ギ酸-メタノール

【分析条件 3-1】: 95%A/5%B to 65%A/35%B (0-10 min)、to 35%A/65%B (10-40 min)、to 5%A/95%B (40-40.1 min、5 min hold)、0.1ml/min (Fig. 6-1)

【分析条件 3-2】: 95%A/5%B to 60%A/40%B (0-10 min)、to 35%A/65%B (10-40 min)、to 5%A/95%B (40-40.1 min、5 min hold)、0.1ml/min (Fig. 6-2)

【分析条件 3-3】: 95%A/5%B to 65%A/35%B (0-10 min)、to 35%A/65%B (10-40 min)、to 5%A/95%B (40-40.1 min、5 min hold)、0.1ml/min (Fig. 6-3)

その結果、Sennoside B に重なっていたと考えられるピークは分離し、条件 3-3 が最も良い分離を示した (Fig. 6)。

2. センナ・ハネセンナの判別分析 (LC-ESI(+)-MS、LC-ESI(-)-MS)

市販のセンナ 5 種および種子島産ハネセンナ 2 種を切断、粉碎し得られた粉末の 70%メタノール溶液を LC-MS の条件 3-3 に附した。その結果、センナ及びハネセンナいずれの試料においても Sennoside A、B は良好に分離した (data not shown)。次に、これらのサンプルより得られた LCMS データについてセンナ・ハネセンナのグループで判別分析 (Scalling: palato)を行った。その結果、LC-ESI(+)-MS、LC-ESI(-)-MS それぞれのスコアプロット上でいずれもセンナ、ハネセンナの2つのグループに分かれる事が確認できた (Fig. 7、11)。

LC-ESI(+)-MS (Fig. 7) の S-Plot (Fig. 8) より、センナの指標成分として 28.93_408 (RT_m/z) の成分と、19.33_594 (RT_m/z) の成分が観測された。各マススペクトルパターンから、前者は Tinnevellin glucoside (Tiv-Glc)、後者は Vicenin-II であると考えられ (Fig. 9、10)、両成分は、標品との直接比較により同定した (data not shown)。

LC-ESI(-)-MS (Fig. 11) の S-Plot (Fig. 12) からは、さらにセンナの判別に 30.88_862 (RT_m/z)

の成分と 26.88_862 (RT_{m/z}) の成分が寄与していると考えられた (Fig. 13, 14)。これら寄与成分 (Fig. 15) については、標品との直接比較により、30.88_862 (RT_{m/z}) の成分は Sennoside A、26.88_862 (RT_{m/z}) の成分は Sennoside B と同定した。

D. 考察

LC-MS データを用いてセンナおよびハネセンナの判別分析を行った結果、Tinnevellin glucoside (Tiv-Glc)、Vicenin-II、Sennoside A、Sennoside B の 4 化合物がセンナの寄与成分であることが明らかになった (Fig. 15)。また、LC-ESI(-)-MS データの S-plot から推定される寄与成分としては、センナのグループには 28.44_640 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Isorhamnetin 3-O-gentiobioside (IR-Gtb) であると推定された (Fig. 13, 16)。また、26.17_847 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Sennoside C または D であると推定された (Fig. 13, 16)。一方ハネセンナのグループには 37.57_286 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Kameferol であると推定された。また、27.43_610 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Kameferol 配糖体の寄与が考えられた (Fig. 14, 16)。これらの化合物については、今後同定を行う予定である。

E. 結論

Sennoside A、B の定量分析に向けた LC 条件の検討において、Sennoside B に近接したピークを分離する条件を見出すことができた。その条件下で日局センナとハネセンナ葉を試料として LCMS データを用いた判別分析を行い、センナの寄与成分として 4 種の化合物を同定した。これまで、センナの指標成分として Isorhamnetin 3-O-gentiobioside および Tinnevellin glucoside が報告されているが [3]、今回見出された Vicenin-II もその化学的安定性から有効な指標成分と成り得る可能性が示された。また、現時点ではハネセン

ナのサンプル数が少ないため、今後サンプル数を増やし解析を行う予定である。

F. 研究発表

1. 学会発表
該当無し
2. 誌上発表
該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

H. 参考文献

- [1] 国民生活センター; ダイエットなどをうたった「健康食品」ーセンナ茎を使った茶類を中心にー、2005 年 9 月 7 日、http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20050907_1.html (accessed: March 2018)。
- [2] 国民生活センター; キャンドルブッシュを含む健康茶ー下剤成分 (Sennoside) を含むため過剰摂取に注意ー、2014 年 1 月 23 日、http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20140123_1.html (accessed: March 2018)。
- [3] Takahashi, M.; Sakurai, K.; Fujii, H.; Saito, K. J. AOAC Int. 2014, 97 (4), 1195-1201.

Table 1. 使用サンプル

No.	試料	形態	産地	入手時期
S-1	日局センナ	刻み	インド	2015年7月
S-2	日局センナ	刻み	インド	2016年
S-3	日局センナ	粉末	インド	2015年8月
S-4	日局センナ	刻み	インド	2016年
S-5	日局センナ	刻み	インド	不明
HS-1	ハネセンナ葉	全形	日本	2016年12月
HS-2	ハネセンナ葉	全形	日本	2015年12月

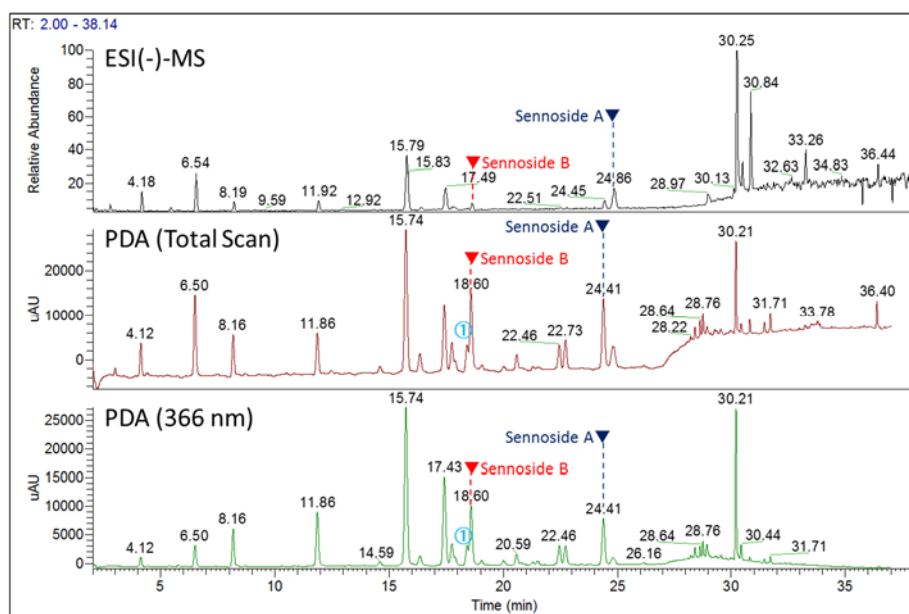


Fig. 1. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(分析条件1[3])

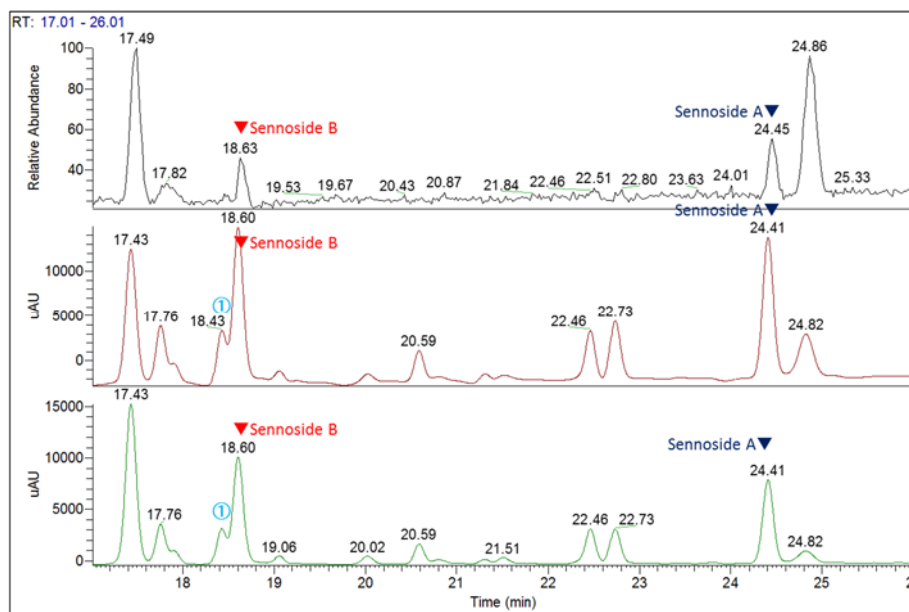


Fig. 2. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(拡大図、分析条件1[3])

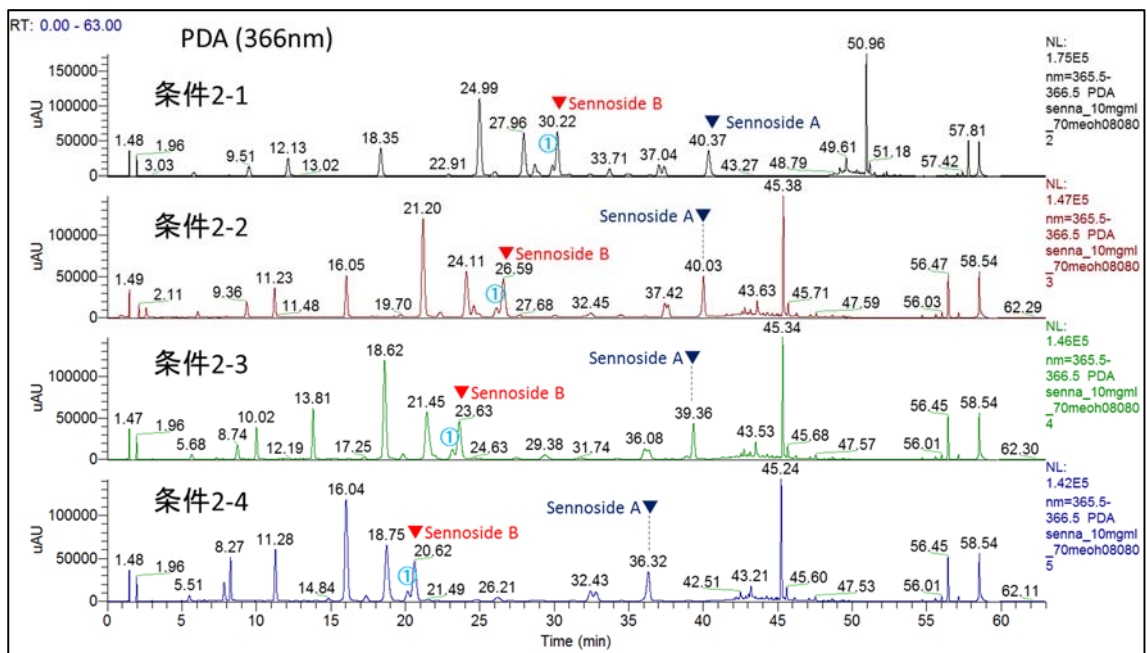


Fig. 3. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(分析条件 2)

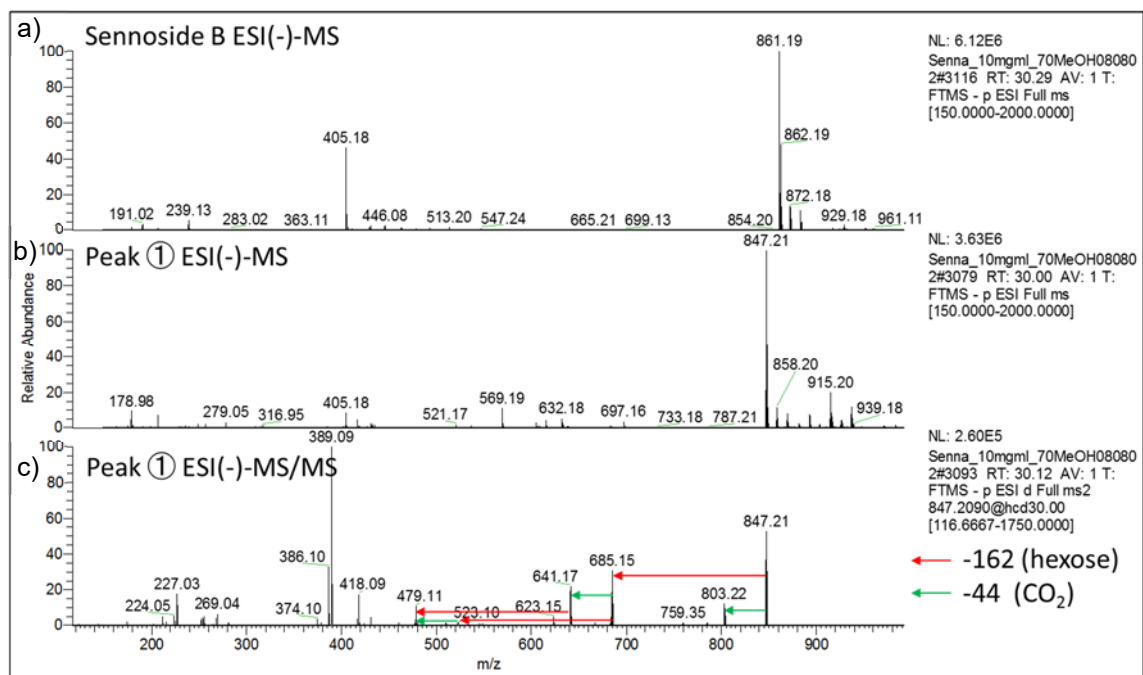


Fig. 4. ピーク①と Sennoside B のマスペクトルの比較 (分析条件 2-1)

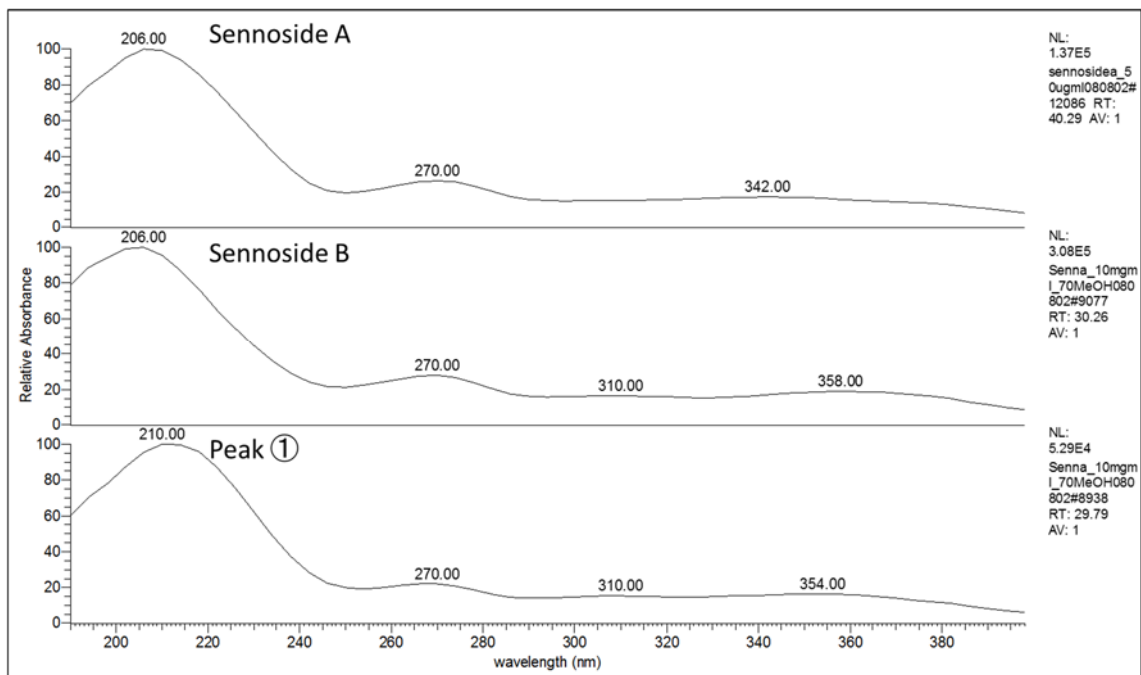


Fig. 5. Sennoside A, Sennoside B とピーク①との UV スペクトルの比較 (分析条件 2-1)

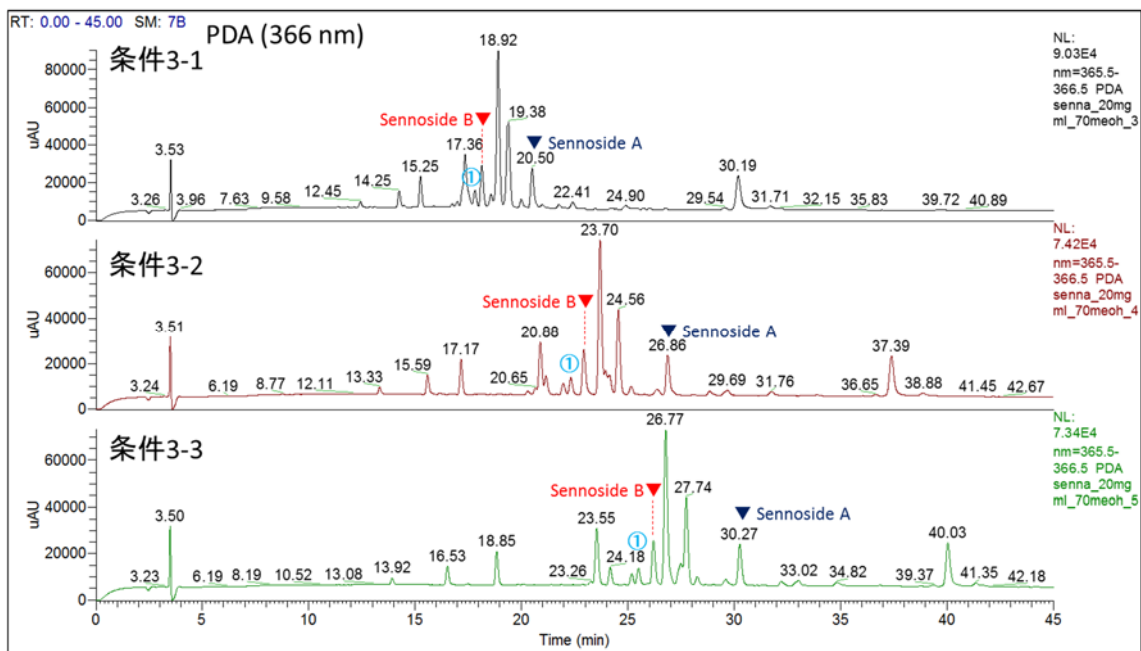


Fig. 6. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(分析条件 3)

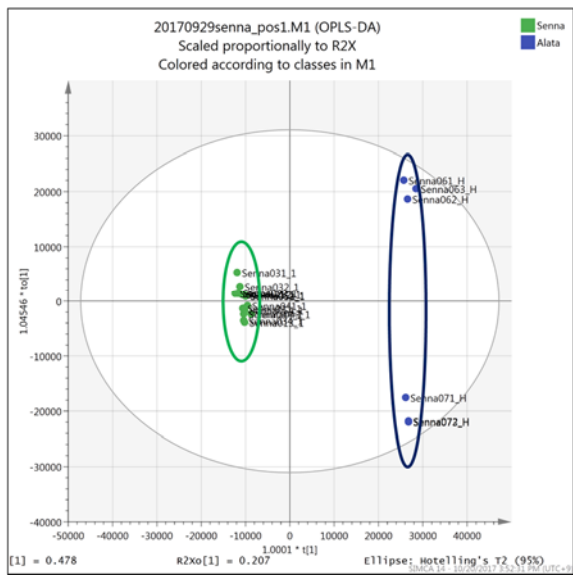


Fig. 7. LC-ESI(+)-MS データからの OPLS-DA プロット

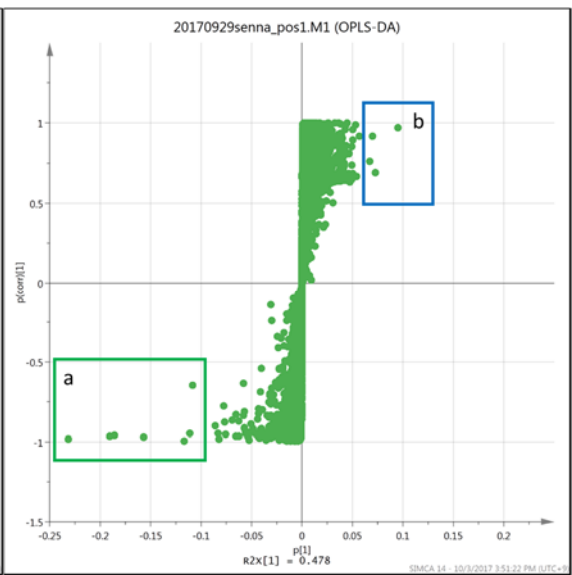


Fig. 8. LC-ESI(+)-MS データからの S-Plot

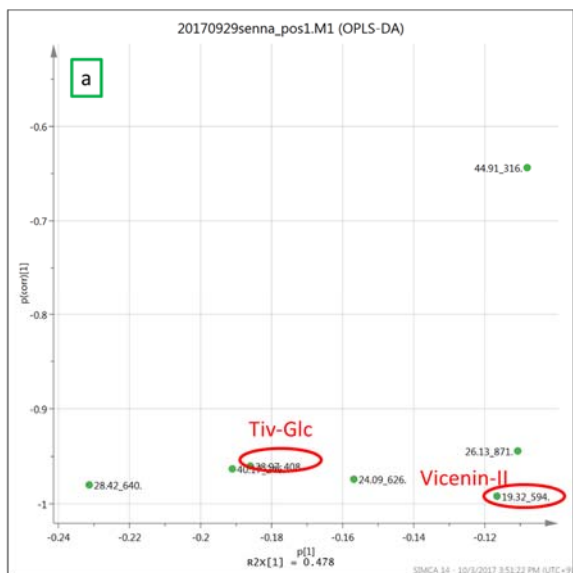


Fig. 9. S-Plot 範囲 a の拡大図

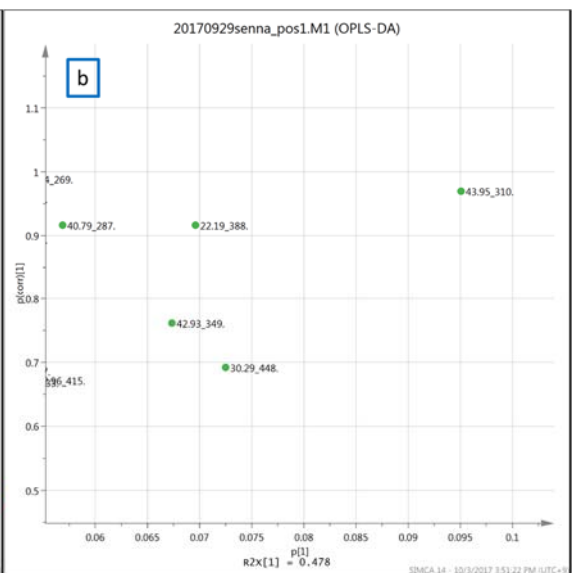


Fig. 10. S-Plot 範囲 b の拡大図

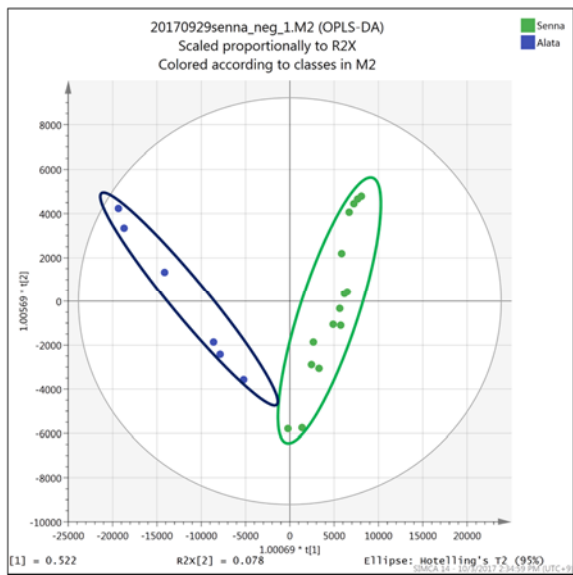


Fig. 11. LC-ESI(-)-MS データからの OPLS-DA プロット

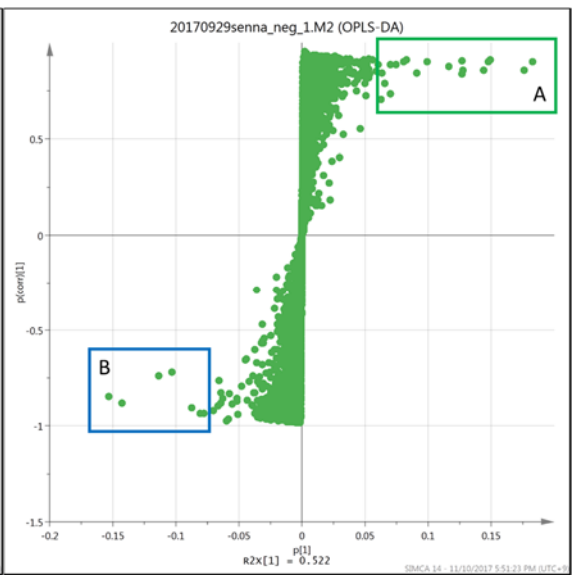


Fig. 12. LC-ESI(-)-MS データからの S-Plot

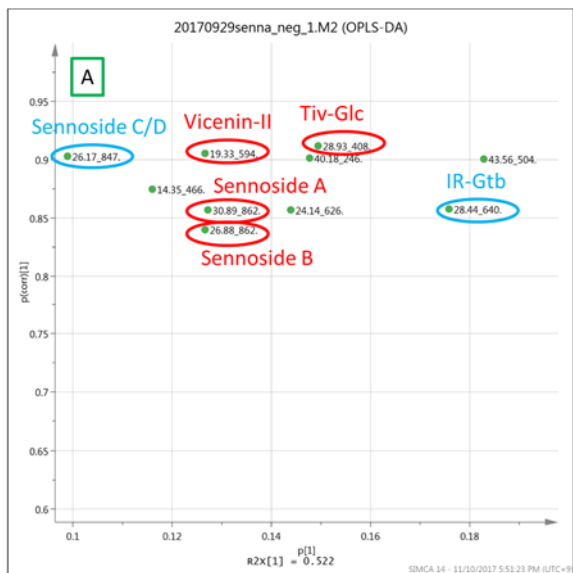


Fig. 13. S-Plot 範囲 A の拡大図

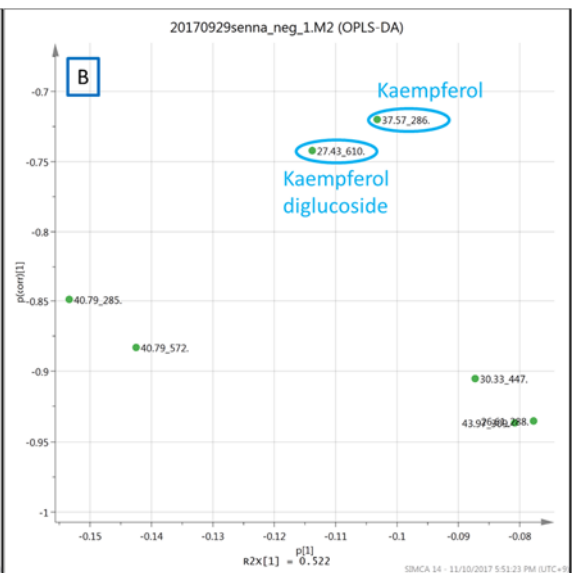


Fig. 14. S-Plot 範囲 B の拡大図

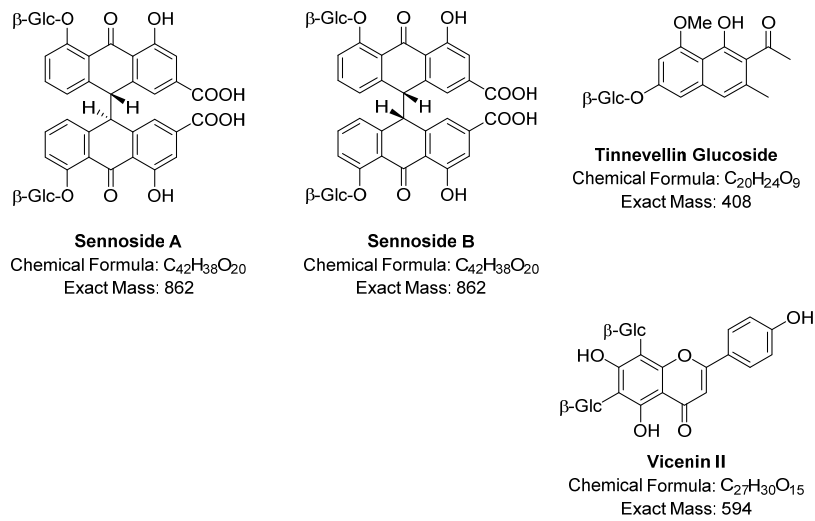


Fig. 15. 判別分析より見出され、同定したセンナの寄与成分

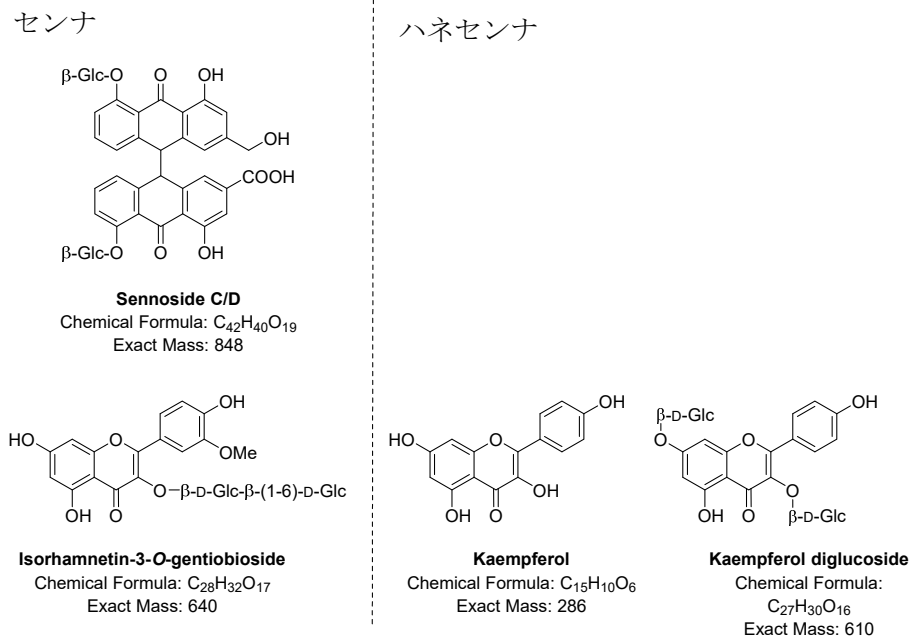


Fig. 16. 判別分析より見出されたセンナ・ハネセンナの推定寄与成分

厚生労働行政推進調査事業費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
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

非医リストの植物基原等の見直しに関する研究

非医薬品リスト中の全品目について、基原植物の和名、学名の調査を行い、その結果に基づき、名称変更、同一植物に由来する複数品目の統合、同一項目に含まれている複数植物の分離作業を行い、暫定の改定リスト案をまとめた。名称変更品目は、148 品目、統合品目は、31 品目、分離品目は、6 品目であった。

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

A. 研究目的

人が経口的に摂取するものを販売する場合、その品目は、行政上、医薬品あるいは食品のいずれかに分類され、それぞれ、薬機法あるいは食品衛生法の適用を受ける。各品目がいずれに属するか、その判断は、「医薬品の範囲に関する基準」に基づき行われる（医薬・生活衛生局長通知、無承認無許可医薬品の指導取締について、別紙、平成 28 年 10 月 12 日 薬生発 1012 第 1 号）。同通知には、（別添 2）（別添 3）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」及び「医薬品的効能効果を標榜しない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）リスト」が例示されている。このうち、専ら医薬品リストについては、本研究班の前身である「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性及び安全性等の評価に関する研究」（平成 15 年～平成 17 年度）において見直しが行われているが、非医薬品リストについては、長く見直しがなされていないことから、昨年度、本研究班において、リストの見直しを行った。今年度は、非医薬品リスト中の全品目について、

基原植物の学名、和名を調査し、同一植物素材に由来するにも関わらず、生薬名と植物名などで、別項目として扱われている品目や別植物でありながら、同一項目にまとめられている品目について、整理を行った。また、昨年度までの調査で明らかになっていた使用部位などの修正を加え、改定リスト案を作成した。

B. 研究方法

平成 28 年 10 月 12 日 薬生発 1012 第 1 号、厚生労働省医薬・生活衛生局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締について」の別添として例示されている「非医薬品リスト」について、原材料の基原種の和名及び学名を調査した。

平成 13 年 3 月 27 日付の「専ら医薬品リスト」発出時の主要メンバーである佐竹元吉博士（元国立医薬品食品衛生研究所生薬部長）らが編集した「健康・機能性食品の基原植物事典」に記載の基原種を基に、学名については、

1) The Plant List

(<http://www.theplantlist.org/>),

2) International Plant Name Index

(<http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>),

3) YList (<http://ylist.info/index.html>)

を用いて現在通用している学名を調べた。和名

については、同書籍の記載及び上記調査で明らかになった学名を基に、YList を用いて調査した。

改定リストの作成に当たっては、現在のリストでは、名称が、生薬名のものと同植物名のもので混在していることから、植物和名を名称とすることで統一を図った。ただし、複数の基原植物を持つ生薬を、別項目として扱うのは、利便性の点で難があるため、そのような品目は、生薬名を名称とし、他名に、全ての基原植物を列記した。

和名と学名については、佐竹博士の書籍の記載を上段に、調査の結果、修正が必要と考えられたものについては、下段に青字で記載した。また、修正箇所は、赤字で記載し、修正前の項目を、必要に応じて黄色ハイライトで直後に記載した。

C. 研究結果と考察

研究方法に記載のルールに従い、非医リストの整理を行い、暫定の改定リスト案をまとめた (Table 1)。見直しの結果、名称変更品目が、148 品目 (内訳は、Table 1 参照)、複数項目を統一した品目が、31 品目 (インドカラタチ、ウスベニアオイ、オウギ、オオムギ、キバナシュスラン、ギムネマ、クズ、クスノキ、クロスグリ、ケイヒ、コゴメグサ、コパイバ、サクリュウカ、スミレ、セイタカミロバラ、セイヨウ

シナノキ、セイヨウヒメスノキ、センリョウ、タンポポ、チョウジ、トウガラシ、トケイソウ、パウダコ、プエラリアミリフィカ、ブツウゲ、マツヨイグサ、ムラサキフトモモ、ユウガオ、ルイボス、ローズヒップ)、一つの項目を複数品目に分離したものが、6 品目 (ガウクルア、イチヤクソウ、ウメガサソウ、ガマ、サイカチ、ブラッククミン) であった。この内、分離品目については、それぞれ、他名に記載のアカガウクルア、ロクテイソウ、オオウメガサソウ、ヒメガマ、トウサイカチ、ニゲラを別品目とした。また、元品目のガウクルアとブラッククミンは、それぞれ、プエラリアミリフィカ、クロタネソウに名称変更を行った。

D. 結論

主に非医リストについて、見直し対象品目の抽出を行った。また、それぞれの対象品目の処理について、今後の作業の方向づけを行うとともに、成分情報の取得を行った。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
合田幸広	機能性表示食品（届出企業）に求められる品質保証の考え方	薬理と治療	45(11)	1751-1753	2017
合田幸広	薬用植物の規制と食薬区分機能性	アグリバイオ	28(2)	28-32	2018
H. Tokumoto, H. Shimomura, T. H akamatsuka, Y. Ozeki, Y. Goda	Fluorescence coupled with macro and microscopic examinations of morphological phenotype give key characteristics for identification of crude drugs derived from scorpions.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	in press		2018
N. Sato-Masumoto, T. Uchikura, H. Sugiwaki, M. Yoshimura, S. Masada, T. Atsumi, M. Watanabe, N. Tanaka, N. Uchiyama, Y. Amakura, T. Hakamatsuka.	Survey on the original plant species of crude drugs distributed as <i>Cynanchi Wilfordii Radix</i> and its related crude drugs in the Korean and Chinese markets.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	40	1693-1699	2017