

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 グレーズーンの植物体に関する研究及び食薬区分リストの整備に関する研究
分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長 丸山卓郎

健康食品として流通するカスカラサグラダ及びフラングラ皮製品の基原種と成分について

研究要旨 専ら医薬品であるカスカラサグラダ及びフラングラ皮を使用した健康食品の流通が認められたことから、実態調査のため、塩基配列解析による種同定と LC/MS による成分組成解析を行った。その結果、それぞれに特徴的なクロマトグラムが得られ、遺伝子情報による同定に比べて明瞭であった。

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

近年、瘦身もしくは強壮用を謳った健康食品に無承認無許可医薬品が混入され、このものが原因と思われる健康被害が発生している。前者の代表例は、センナ、ハネセンナなど、瀉下作用を有する天然物やフェノールフタレインなどの化合物であり、後者の代表例は、ED (erectile dysfunction) 治療薬及びその類縁化合物である。

センナ、ハネセンナの瀉下作用の本体は、sennoside 類 (Fig. 1) と呼ばれるピアンスロン誘導体であり、名称の通り、アントラキノン 2 分子が、フェノールラジカルカップリング反応により直接 C-C 結合を形成した構造を有している。Sennoside 類の瀉下作用の機序は、腸内細菌による分解により生じたレインアンスロンが、大腸の蠕動運動を惹起することによるものとされている。

センナと同様に、瀉下目的で使用される西洋生薬に、カスカラサグラダ及びフラングラ皮が

あり、これらの生薬も、cascarosides や glucofrangulins などのアントラキノン類を含有しており、センナと同様の機序により瀉下作用を発揮すると考えられる。

カスカラサグラダ及びフラングラ皮は、それぞれ、*Frangula purshiana* (Syn.: *Rhamnus purshiana*) 及び *F. alnus* (Syn.: *Rhamnus frangula*; 和名 セイヨウイソノキ) の樹皮由来の生薬であり、カスカラサグラダは、日局 7 (第二部) 及び日局 8 に記載されており、現在でも、European Pharmacopoeia 及び US Pharmacopoeia に記載されている。

両植物の食薬区分上の扱いは、その瀉下作用のため、樹皮を、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」に記載し、食品用途での使用を規制している。しかしながら、最近、インターネット上の販売店において、これらの植物を原料と表記している健康食品が販売されていることが確認された。

そこで本研究では、これらの製品の実態把握を目的に、塩基配列解析による原料植物の鑑別及び LC/MS 分析による、アントラキノン類の組成解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用したカスカラサグラダ及びセイヨウイソノキ標準植物試料は、医薬基盤・健康・栄養研究所・薬用植物資源研究センター・北海道研究部より譲り受けた。健康食品製品は、インターネット上の販売店より購入した。また、参考試料として、生薬として使用されるカスカラサグラダ7検体を松浦薬業株式会社より譲り受けた。このうち、2検体は、自社規格に適合しなかったものである。各試料の詳細を、Table 1にまとめた。

2. 実験方法

2-1. 塩基配列解析

各試料をミキサーミル MM-400 (Retsch) で粉砕し、20 mg を用いて、Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega) により genomic DNA を調製した。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA 及び葉緑体 DNA の *trnH*, *psbA* 領域に保存性の高い配列に設計したプライマーを用いて PCR を行うことにより、ITS 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域を含む DNA を増幅した。PCR 産物は、MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) により精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によりサイクルシーケンス反応を行い、ABI 3130xl 又は 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、塩基配列を決定した。

塩基配列の多重整列解析は、ClustalW プログラムを用いて行った。

2-2. LC/MS 分析

標準植物試料を除く各試料をミキサーミル

MM-400 (Retsch) を用いて粉砕し、粉末 30 mg に、メタノール 1 mL を加えて、5 Hz で 10 分間振とう抽出を行った。抽出液を遠心し、上清を試料溶液とした。

LC/MS 分析は、以下の条件により行った。

装置 : Prominence UHPLC-LCMS2020 (Shimadzu)
カラム : CORTECS UPLC C₁₈ (2.1 x 150 mm, 1.6 μm; Waters)

移動相 A : 0.1%ギ酸水溶液

移動相 B : 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエントプログラム : 1%B (0 min)-50%B (20 min)-50%B (25 min)

流速 : 0.3 mL/min

注入量 : 1 μL

カラムオープン温度 : 40°C

検出器 A : PDA 検出器 (190-800 nm)

検出器 B : MS 検出器 (ESI⁺)

(MS 測定条件)

Drying gas : 10 L/min

Nebulize gas : 1.5 L/min

DL 温度 : 250°C

ヒートブロック温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 1.5 kV

スキャン範囲 : *m/z* 100-800

C. 研究結果

核 rDNA の ITS 領域及び葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の DNA を増幅し、塩基配列を決定した。ただし、健康食品製品である RP-10 から RP-13 の 4 検体の *trnH-psbA* IGS 領域は、PCR 産物が得られなかった。医薬健康研から分譲されたカスカラサグラダ標準植物試料 RP-1 の ITS1 領域は、全長 262 bp で、113 番目に C/T の複合塩基を含んでいた。ITS2 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域は、それぞれ、全長 215 bp 及び

413 bp だった。それぞれの領域について、Blast search プログラムによる相同性検索を行った結果、いずれの領域においても、*F. purshiana* が最も高い相同性を示し、ITS 領域においては、完全に一致する配列が確認できた。

セイヨウイソノキ標準植物試料 RF-1, 2 は、ITS 領域、*trnH-psbA* IGS 領域のどちらも、互いに同一の配列を示し、全長は、ITS1 領域が 262 bp、ITS2 領域が 216 bp、*trnH-psbA* IGS 領域が、418 bp だった。相同性検索の結果、いずれの領域においても、*F. alnus* の配列の中に一致するものを見出したが、ITS1 領域では、*F. azorica*、*F. baetica* などの同属植物として登録された配列とも一致した。また、いずれの領域においても、カスカラサグラダ、セイヨウイソノキのどちらも、同属植物との配列の違いはわずかであった。

生薬試料及び健康食品製品の配列は、RP-8 を除き、RP 試料は、*F. purshiana*、RF 試料は、*F. alnus* と同定され、異なる基原植物が混入しているケースは少なかった。RP-8 は、相同性検索の結果、アカネ科植物である *Exostema caribaeum* と高い相同性を示した。本植物は、中南米に多く分布し、かつては、キニーネの代用品として熱病治療に用いられた植物である。

標準植物試料を除く、15 検体のメタノールエキスを LC/MS により分析した結果、カスカラサグラダ、フ랑グラ皮、偽品である RP-8 は、それぞれ、特徴的なクロマトグラムを示したが、各品目内の差異は、ほとんど認められなかった。各試料の代表的なクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

カスカラサグラダには、図中、1-4 の番号で示した 4 本の主要なピークが認められた。これらのピークの UV スペクトルは、互いによく似

ており、類似の骨格を有する化合物であると推定された (Fig. 3)。各ピークのマススペクトルを Fig. 4 に示した。ピーク 1,2 は、分子量 580、ピーク 3,4 は、分子量 564 を持つ化合物と推定された。カスカラサグラダからは、cascaroside A-F と名付けられたアントラキノン配糖体が報告されており、それらの分子量が、564 及び 580 であることから、ピーク 1-4 は、cascaroside 類であると推定された (Fig. 5)。

フ랑グラ皮には、保持時間 12 分過ぎに、2 本の主要なピークが認められ、カスカラサグラダのものとは、明瞭に区別可能であった。種ピークの構造推定には至らなかった。

D. 考察

食薬区分上、医薬品相当と判断されているカスカラサグラダ及びフ랑グラ皮を原料に用いたと表記されている製品が多数見受けられたことから、当該製品を購入し、遺伝子解析及び LC/MS 分析を行った。その結果、生薬の規格外品の中に、別種基原のものが存在したものの、健康食品製品は、表示通りカスカラサグラダ及びセイヨウイソノキを原料としていることが確認できた。

LC/MS 分析の結果からは、それぞれの植物から報告されているアントラキノン類と推定されるピークが複数確認できた。これらは、今後、標品を購入し、保持時間及びマススペクトルの比較により同定を行う必要がある。

カスカラサグラダとセイヨウイソノキは、遺伝子解析を行った 2 つの領域における配列の違いはわずかであったが、メタノールエキスの成分組成は、大きく異なっており、両者の区別には、遺伝子解析よりも成分化学的手法の方が有効であると思われた。

これらの植物は、伝統的に下剤として使用されてきたものであり、これらを原料とする健康食品の摂取した場合、センナ及びハネセンナと同様に、様々な健康被害が発生する恐れがあり、注意が必要である。

E. 結論

専ら医薬品であるカスカラサグラダ及びフラングラ皮を使用した健康食品の流通が認められたことから、実態調査のため、塩基配列解析による種同定と LC/MS による成分組成解析

を行った。その結果、それぞれに特徴的なクロマトグラムが得られ、遺伝子情報による同定に比べて明瞭であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

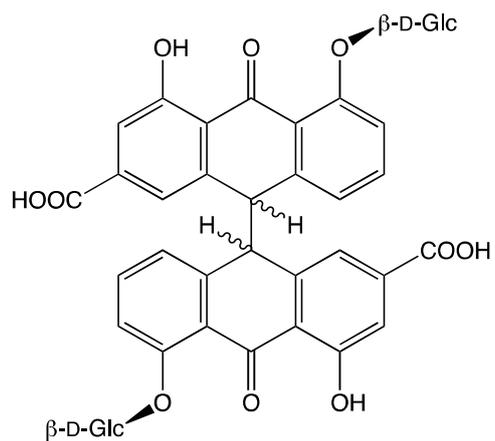
なし

2. 学会発表

なし

Table 1 Details of cascara sagrada and frangula used in this study.

品目名	試料番号	用途	形態	入手元・販売元	産地	入手日	
カスカラサグラダ	RP-1	標準植物	枝葉	医薬基盤研 北海道研究部	北海道	2019年9月2日	
	RP-2				アメリカ	2015年12月21日	
	RP-3				アメリカ	2016年7月28日	
	RP-4				アメリカ	2017年5月26日	
	RP-5	生薬	刻み	松浦薬業株式会社	アメリカ	2018年1月4日	
	RP-6				アメリカ	2019年6月11日	
	RP-7				アメリカ	2019年1月31日	
	RP-8				メキシコ	2019年1月31日	
	RP-9			刻み	JustIngredients Ltd.	アメリカ	-
	RP-10				Nature's Answer	-	-
	RP-11	健康食品	カプセル		ZAND	-	-
	RP-12				NOW FOODS	-	-
	RP-13				Nature's Way Brands	-	-
フラングラ皮	RF-1	標準植物	枝葉	医薬健康研 北海道研究部	北海道	2019年9月2日	
	RF-2				北海道	2019年9月2日	
	RF-3			Avie Apotheke	-	-	
	RF-4	健康食品	刻み	Natur Kraeuter	-	-	
	RF-5			Louis Herboriste	-	-	



sennosides A and B

Fig. 1 Chemical structure of sennosides A and B

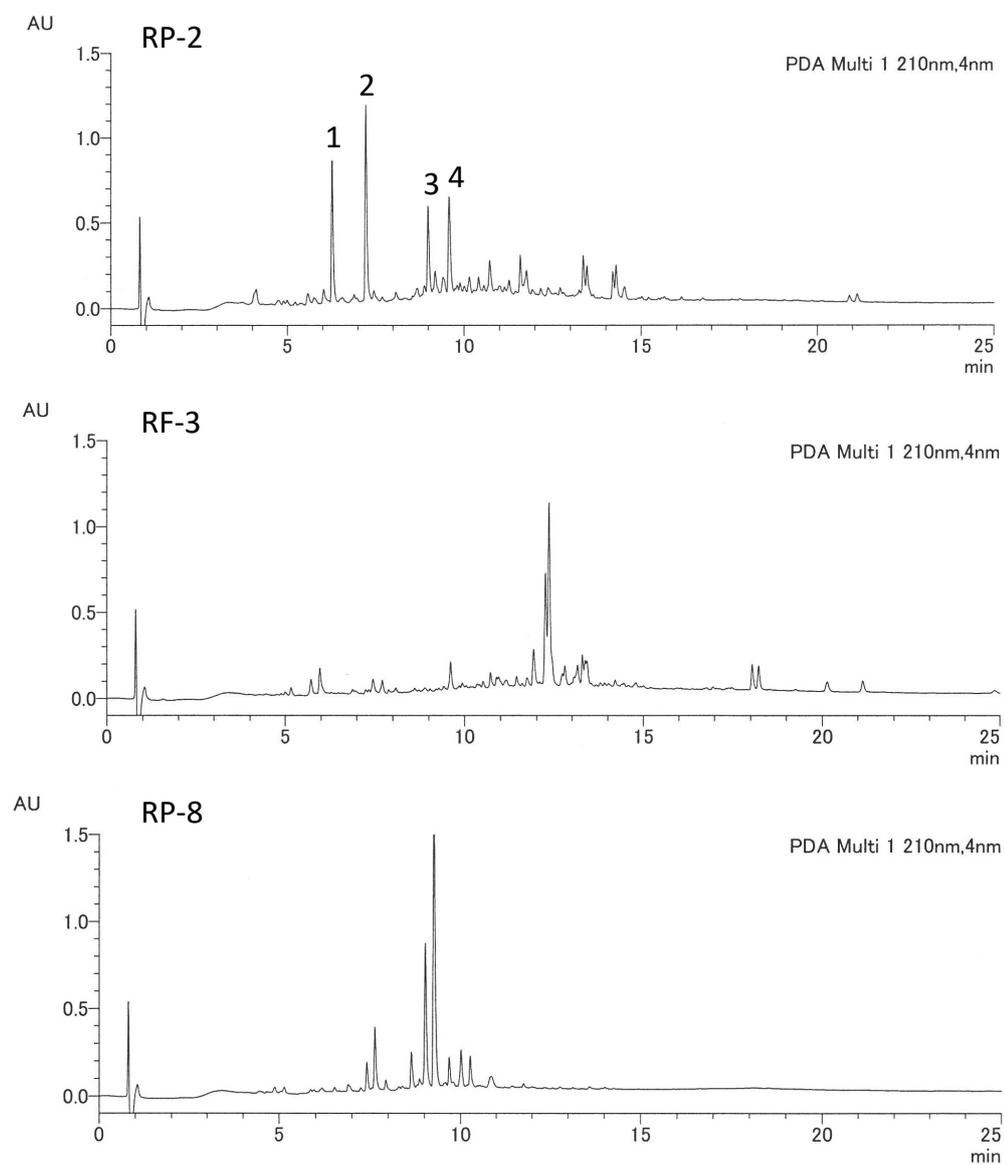


Fig. 2 Representative chromatograms at 210 nm of each sample

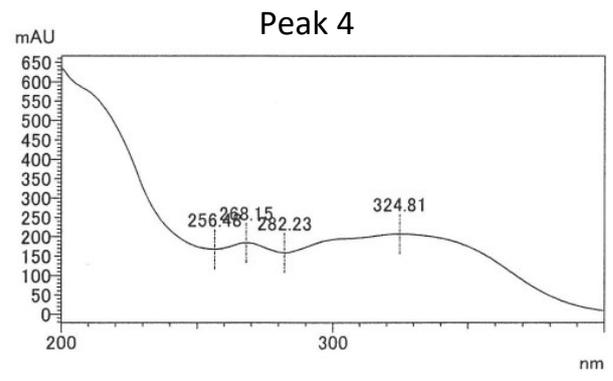
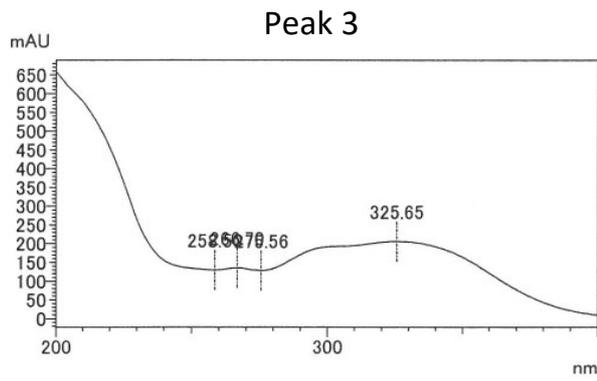
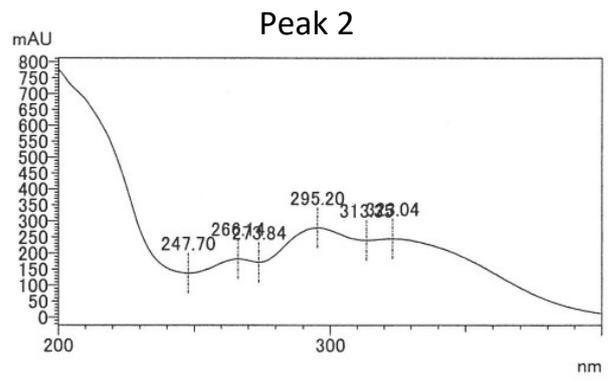
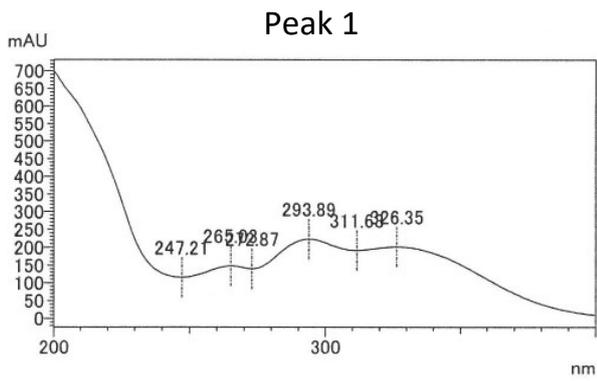
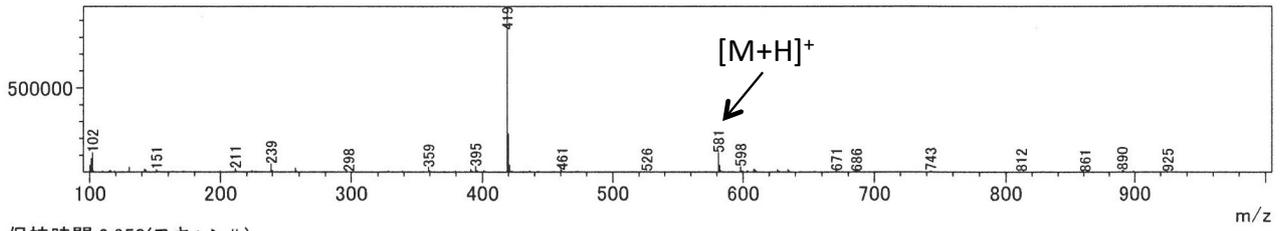


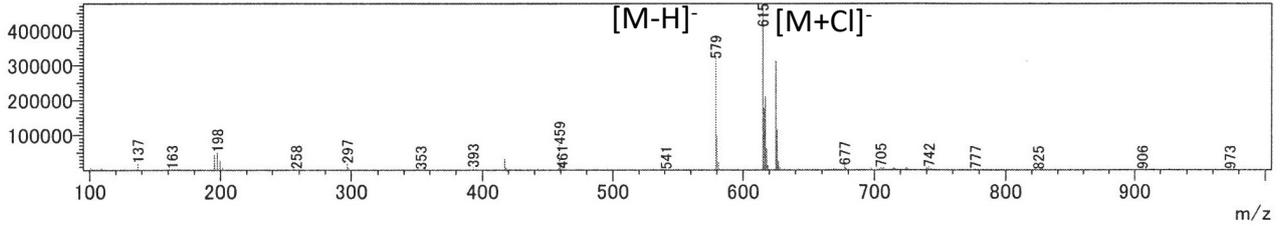
Fig. 3 UV spectra of each peak found in cascara sagrada extract

保持時間:6.333(スキャン#)
ピーク数:948
セグメント1-イベント1

Peak 1

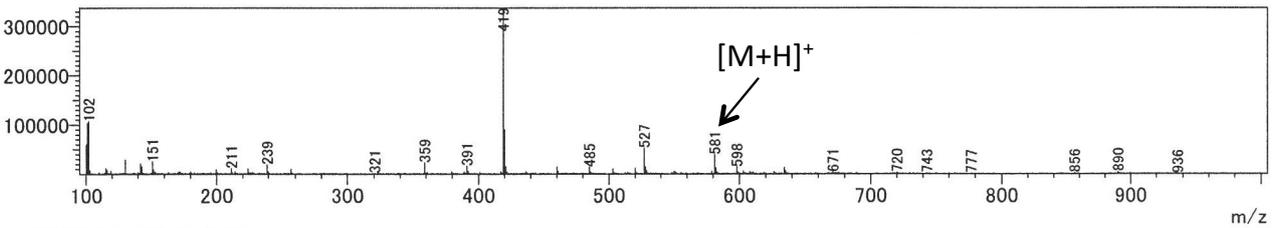


保持時間:6.350(スキャン#)
ピーク数:924
セグメント1-イベント2



保持時間:7.400(スキャン#)
ピーク数:924
セグメント1-イベント1

Peak 2



保持時間:7.416(スキャン#)
ピーク数:930
セグメント1-イベント2

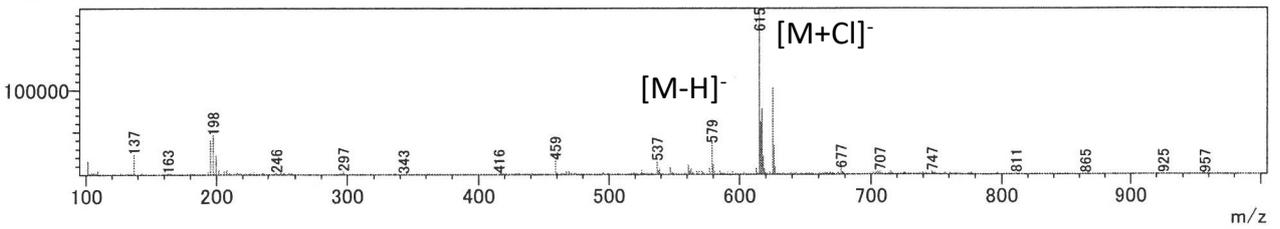
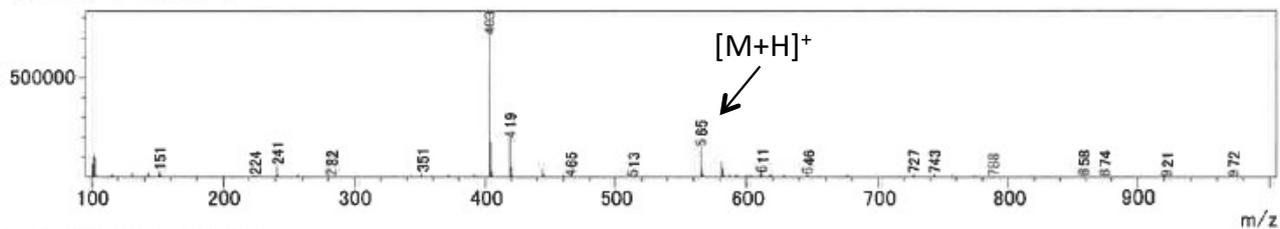


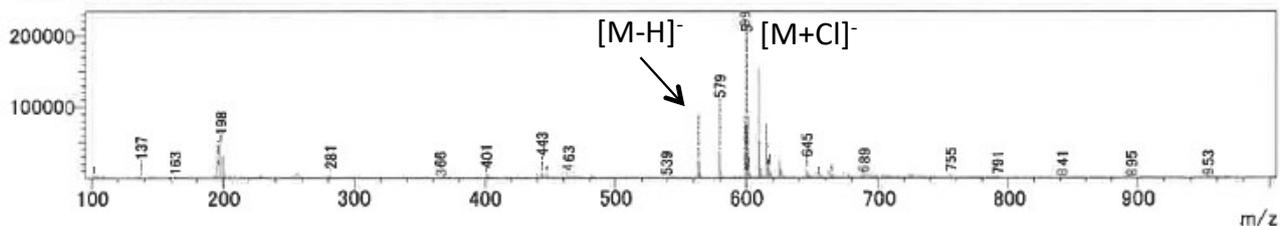
Fig. 4 Mass spectra of each peak found in cascara sagsada extract

保持時間:9.100(スキャン#)
ピーク数:929
セグメント1-イベント1

Peak 3

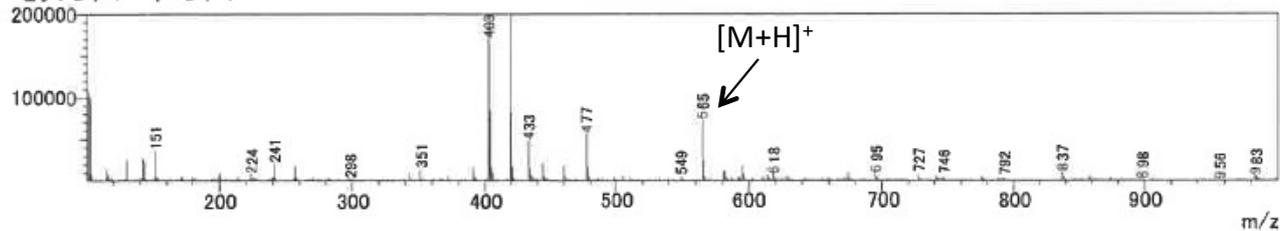


保持時間:9.116(スキャン#)
ピーク数:924
セグメント1-イベント2



保持時間:9.600(スキャン#)
ピーク数:914
セグメント1-イベント1

Peak 4



保持時間:9.616(スキャン#)
ピーク数:915
セグメント1-イベント2

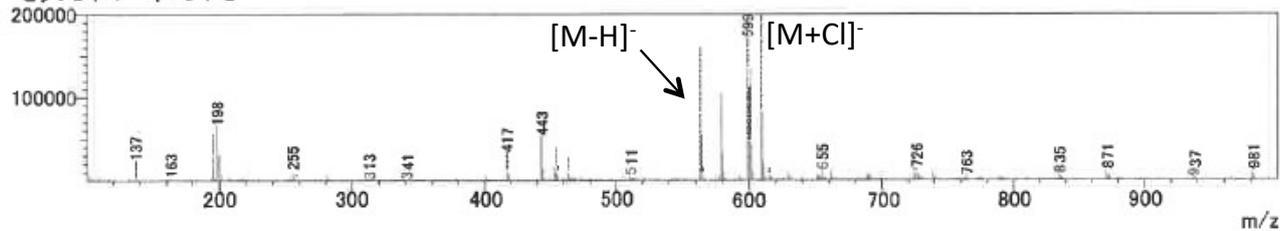


Fig. 4 Continued

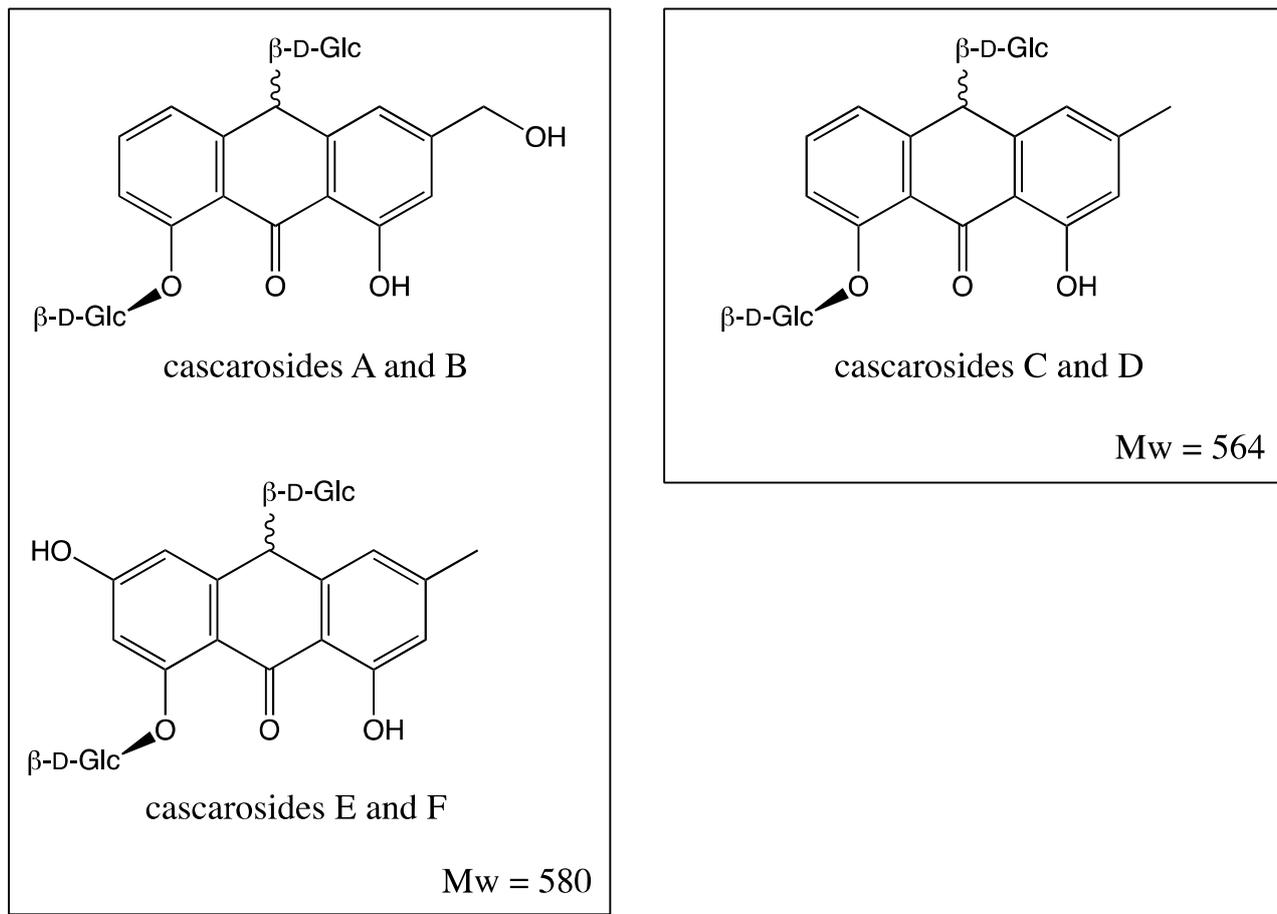


Fig. 5 Chemical structures of cascarosides A to F