

表1 本研究に用いた標準試料

sample no.	Scientific name	Japanese name
Dt-1	<i>Datura stramonium</i>	シロバナヨウシュチョウセンアサガオ
Dt-2	<i>D. stramonium</i>	シロバナヨウシュチョウセンアサガオ
Dt-3	<i>D. stramonium</i> var. <i>tatula</i>	シロバナヨウシュチョウセンアサガオ
Dt-4	<i>D. stramonium</i> var. <i>tatula</i>	シロバナヨウシュチョウセンアサガオ
Dt-5	<i>D. stramonium</i> var. <i>inermis</i> (purple corolla)	トゲナシヨウシュチョウセンアサガオ
Dt-6	<i>D. stramonium</i> var. <i>inermis</i> (white corolla)	トゲナシヨウシュチョウセンアサガオ
Dt-7	<i>D. metel</i>	チョウセンアサガオ
Dt-8	<i>D. metel</i>	チョウセンアサガオ
Dt-9	<i>D. fastuosa</i> (yellow corolla)	ヤエチョウセンアサガオ
Dt-10	<i>D. fastuosa</i> (purple corolla)	ヤエチョウセンアサガオ
Dt-11	<i>D. innoxia</i>	ケチョウセンアサガオ
Dt-12	<i>D. meteloides</i>	アメリカチョウセンアサガオ
Dt-13	<i>Ipomoea tricolor</i> Heavenly Blue	ソライロアサガオ (セイヨウアサガオ)
Dt-14	<i>I. violacea</i> Pearly Gates	ソライロアサガオ (セイヨウアサガオ)
Dt-15	<i>Argyreia nervosa</i>	ギンバアサガオ
Dt-16	<i>Merremia tuberosa</i>	ウッドローズ
Dt-17	<i>Datura suaveolens</i>	キダチチョウセンアサガオ
Dt-18	<i>Argyreia nervosa</i>	ギンバアサガオ
Dt-19	<i>A. nervosa</i>	ギンバアサガオ
Dt-20	<i>A. nervosa</i>	ギンバアサガオ

表2 本研究に用いた市場品

Sample no.	品目	形態	Sample no.	品目	形態
Dtk-1	ダチュラ	粉末	Dtk-6	ベビーウッドローズ	粉末
Dtk-2	ダチュラ	粉末	Dtk-7	ハワイアンウッドローズ	粉末
Dtk-3	モーニンググローリー	種子	Dtk-8	ハワイアンウッドローズ	種子
Dtk-4	モーニンググローリー	種子	Dtk-9	ハワイアンウッドローズ	粉末
Dtk-5	ベビーウッドローズ	種子			

表3 市場品の推定基原種

Sample no.	Species	Sample no.	Species	Sample no.	Species
Dtk-1	<i>D. stramonium</i> etc.	Dtk-4	<i>I. tricolor</i>	Dtk-7	<i>M. tuberosa</i>
Dtk-2	<i>D. stramonium</i> etc.	Dtk-5	mixture	Dtk-8	mixture
Dtk-3	<i>I. tricolor</i>	Dtk-6	mixture	Dtk-9	<i>M. tuberosa</i>

厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療器機等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

分担研究課題 「専ら医薬品」の有効性及び安全性等の評価に関する調査及び実証的研究  
並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 部長  
研究協力者 代田 修 徳島文理大学香川薬学部 助教授

－ 幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) に含有される成分に関する研究－

研究要旨 幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) に含有される幻覚性活性本態であるサルビリンA (salvinorin A) を指標物質として得ることを目的として、遠心分配クロマトグラフ法を用いた簡易精製法を確立した。

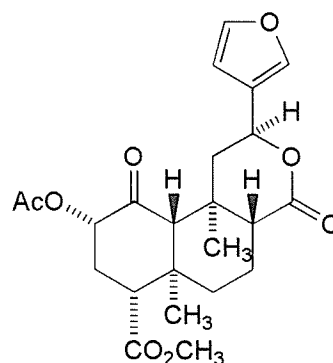
A. 研究目的

近年、麻薬や覚せい剤の代用目的で様々な植物がお香(スモークインセンス)や植物標本、観賞用植物などの名目で売られている。これらはいわゆる「脱法ドラッグ」あり、含有される成分が麻薬や覚せい剤、医薬品などの化合物とその構造が類似するものも多く、食薬区分では「専ら医薬品」に分類されるべきものである。また、これらが植物(ハーブ)であることでその受けるイメージが優しくなり、比較的安易な使用がなされる可能性があるため、青少年における麻薬・覚せい剤乱用への入り口となる恐れが大変強い。近年、これら脱法系植物ドラッグの一つであったマジックマッシュルームが麻薬原料植物として規制されたことは記憶に新しい。この規制によってマジックマッシュルームが脱法ドラッグ市場から姿を消したが、それに代わる脱法系植物ドラッグとしてアヤワスカやベニテングタケ、カバカバ、ハワイアン・ベビー・ウッドローズなどが今なお売られている。その中で幻覚性サルビアはスモッキングハーブとしてマリファナの代用品としてパイプで喫煙するなどして乱用されるようになってきている。

幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) は海外では Diviner's sage 若しくは magic mint と呼ばれるメキシコ原産の植物であり、一般の園芸品種とは異なる種である。もともと南部メキシコ高地の原住民が祈祷の儀式などで用いていたものであり、1960年頃にアメリカの R. Gordon Wasson らによりその存在が発見された。そして近年、アメリカなどを中心として乱用目的に流通するようになり、今日、日本国内においても売買されるようになってきている。1982年になってこの幻覚性サルビアの活性本態

として neo-clerodane 型ジテルペンである salvinorin A が同定された。この salvinorin A は、天然起源の幻覚性物質としては最も強い活性を有し、人の喫煙時では 200-1000  $\mu\text{g}$  で効果があるとされる。また、この salvinorin A が非含窒素型の  $\kappa$ -オピオイドレセプター選択的アゴニストであるため、アルツハイマー病治療薬の開発素材としても注目されている。幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) および salvinorin A は、日本ではまだ麻薬としての規制対象とはなっていないが、既に韓国、オーストラリアでは *Salvia divinorum* および salvinorin A が、ベルギーでは salvinorin A を、デンマークでは *Salvia divinorum* を麻薬として規制している。

このような背景の下、幻覚性サルビアは、食薬区分の判断を求められた場合、通知別添 1 の「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」と判断され、「専ら医薬品」に分類されるものと考えられる。本研究では、将来的に判断が行われた場合、分



Salvinorin A

析指標となる成分と考えられる salvinorin A について得ることを目的とし、遠心分配クロマトグラフ法 (Centrifugal Partition Chromatography: CPC) を用いた salvinorin A の簡易精製法を確立することとした。

## B. 研究方法

### 1. 試料および装置

幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) は、インターネットを通じ、Ethnogen.com (アメリカ) より入手した。

遠心分配クロマトグラフ装置は旧 SANKI 製の Model LLB-M (全セル数 2136、全セル容量 240 mL) を用いた。

### 2. 高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) による分析

HPLC システム: 島津製 Prominance シリーズ  
HPLC カラム: Inertsil Prep ODS; 4.6 x 250mm  
移動相: 45 % アセトニトリル

流速: 1 mL/min

検出: 210 nm

注入量: 10  $\mu$ L

この条件下、salvinorin A の保持時間は約 26 min であった。

### 3. 薄層クロマトグラフ法 (TLC) による分析

TLC 板: Merck Silica gel 60F<sub>254</sub>

展開溶液: n-ヘキサン/酢酸エチル = 1:1

検出試液: バニリン-リン酸試液、加熱 110  $^{\circ}$ C

この条件下、salvinorin A の  $R_f$  値は約 0.41 であった。

### 4. CPC 分取用試料の調製

*Salvia divinorum* の乾燥葉 50 g を 500 mL のメタノールと共に家庭用ジューサーミキサーに入れ、数十秒間の粉碎の後、ろ過した。残渣に 500 mL のメタノールを加え、同じ操作を2回繰り返した。計3回で得たメタノール溶液を減圧下、約 100 mL まで濃縮した後、これを遠沈管に移し、遠心することで不溶物を除いた。得られたメタノールエキスを濃縮乾固し、CPC 分取用試料とした。通常、この試料調製条件で得られたメタノールエキスは乾燥重量で約 4 g であった。

### 5. 分配係数の算出

各二層系溶媒の上層および下層をそれぞれ 5 mL を分液ロートに取り、salvinorin A 2 mg を加え、良く混和・分配した。上層および下層をきれいに分けて濃縮後、それぞれ 5 mL アセトニトリルに溶解

して HPLC 分析サンプルとした。分配係数  $k$  は、[固定相(有機層)に溶解している salvinorin A] / [移動相(水層)に溶解している salvinorin A]、として求めた。

### 6. 遠心分配クロマトグラフ法 (CPC) による salvinorin A の粗精製

今回の salvinorin A の粗精製では、固定相に有機層、移動相に水層を用いた下降法により分離を行った。まず、低速回転した CPC のセルに固定相を 5 mL/min にて充填し、次に回転数を設定して移動相を 2 mL/min にて流し始め、固定相の溶液に溶解したメタノールエキスを注入した。ローター総体積の約2倍量の移動相を流した後、今度は固定相により反転溶出させた。最後にメタノールにて洗浄した。サンプル注入後 10 分以降、フラクションコレクターにて 10 mL ずつ分取した。各フラクションは TLC により分析を行った。

## C. 研究結果

今回 salvinorin A の簡易精製法確立の為に用いた遠心分配クロマトグラフ法 (Centrifugal Partition Chromatography: CPC) は、互いに混じり合わない二層の溶媒系への化合物の分配係数の差を利用して混合物を分離する方法の一つである。CPC では遠心力により分配セル中に固定相が保持され、移動相がその中を微小な液滴となって通過することで分配クロマトグラフィーを行う。この手法は、シリカゲルの様な固型の充填剤を用いないので吸着による試料のロスや不安定化合物の分解が起きづらいこと、高分子から低分子まで、また、高極性化合物から低極性化合物までの幅広い化合物に応用出来ること、特別な前処理が不要で、粗試料をそのまま分離することが可能であることなどの利点がある。その反面、化合物を分離できる二層系溶媒の条件を設定することに、多少の経験・試行錯誤が必要と言われている。

幻覚性サルビアのメタノールエキスから salvinorin A を粗精製するにあたり、如何に多量のエキスを一度に分離に用いられるか、また、エキス中に多く含まれるクロロフィルを如何に除くか、を考慮にいれ、分離条件の設定を行うこととした。まず、如何に多量のメタノールエキスを一度に分離に用いられるかについては、このメタノールエキスを溶解しやすいジクロロメタン/メタノールの入った系を使うことにした。さらに、如何にクロロフィルを除くかについては、逆相系の TLC (ODS) においてクロロフィルが原点に留まることから、固定相に有機層を、移動相に水層を用いる系で分離すること

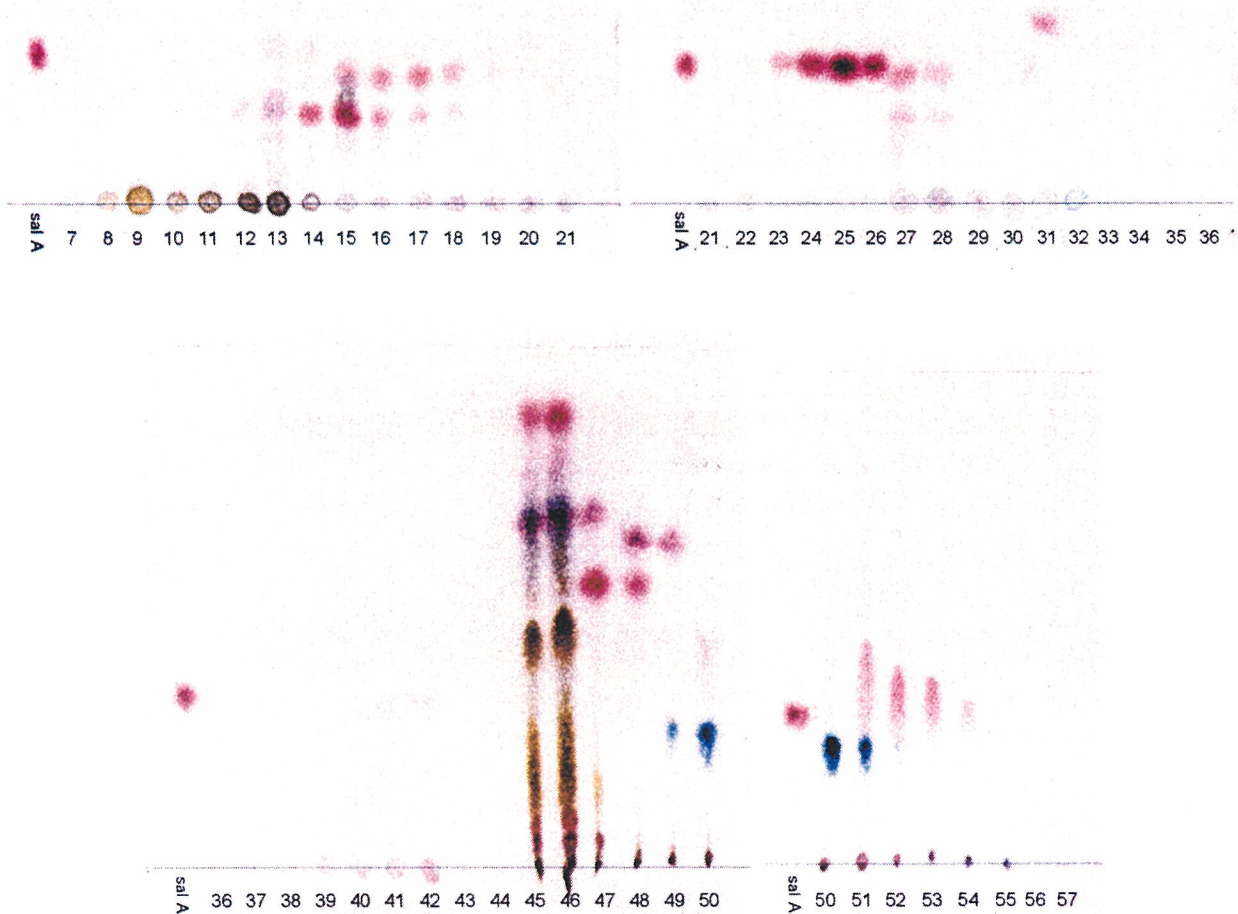


図1. CPC 分離フラクションの TLC 分析

sal A: salvinorin A、No. 22~26: salvinorin A 溶出フラクション、No. 45~: 反転溶出フラクション

にした。これらの条件を満たす二層溶媒系を探索したところ、ジクロロメタン/メタノール/水/ヘキサンを見出し、最終的に分配係数  $k$  が約1となるジクロロメタン/メタノール/水/ヘキサン=8:9:2:8を分離条件に設定した。なお、この二層溶媒系では、有機層が上層に、水層が下層に分離した。

上記条件で実際に CPC により salvinorin A の分離を行ってみた。調製したメタノールエキスを固定相溶媒(有機層)約 5 mL に溶解して注入した。フラスコの残量から注入量は1回につきメタノール

エキスで約 2.8 g であった。CPC により分離したフラクションの TLC 分析の結果を図1. に示す。Fr. No. 7 からサンプルの溶出が始まり、Fr. No. 45 から反転溶出を行った。この TLC において、Fr. No. 22~26 に salvinorin A が綺麗にワンスポットで検出されていることが分かる。この salvinorin A 溶出フラクションを集め、TLC 上での原点にあたる重合物の色素を取り除く目的でシリカゲル・ショートカラムに付して  $n$ -ヘキサン/酢酸エチル=1:1にて溶出し、メタノールにて再結晶をすることで、salvinorin A の無色針状結晶を

113.5 mg (乾燥葉中に 0.29 %) 得た。別途、HPLC 法により定量したところ、試料として用いた乾燥葉中に salvinorin A が 0.36 % 含有されることが分かったので、CPC を用いた簡易精製法による salvinorin A の回収率は 80 % 以上であることが判明した。また、CPC 分離の TLC 分析から、反転溶出直後から固定相に保持されていた多量のクロロフィルが溶出(Fr. No. 45, 46)することが分かる。さらに、繰り返しこの簡易精製法の操作をすることで、この CPC 条件による salvinorin A の分離精製に再現性があることが確かめられた。

#### D. 考察

今回、CPC 法を用いて幻覚性サルビアの活性本態である salvinorin A の簡易精製法の確立を目指した。一度に多量のメタノールエキスを分離に供するため、ジクロロメタン/メタノールが入った系を用い、メタノールエキス中に多量に含有されるクロロフィルを除くために逆相系モードの下降法にて分離を行った。分離は極めて良好で、TLC 上で salvinorin A のスポットが原点を除いてワンスポットとして観察された。シリカゲル処理により原点の夾雑物を除き再結晶することで、収率良く salvinorin A

の無色針状結晶をえることができた。これにより salvinorin A の簡易精製法が確立された。

#### E. 結論

今回、CPC 法を用いて幻覚性サルビアの活性本態である salvinorin A の簡易精製法を確立した。この手法により、幻覚性サルビアから 80 % 以上の salvinorin A を結晶として単離することができる。その工程もメタノールエキスをそのまま CPC によって分離し、重合色素類をシリカゲルにて除去し、再結晶するというシンプルな操作である。これにより、salvinorin A の標品が供給可能となった。

#### F. 健康危険情報

緊急を要する健康危険情報は特になし。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究課題 「専ら医薬品」の有効性及び安全性等の評価に関する調査及び実証的研究  
並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 部長  
研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

「いわゆる健康食品」から検出された勃起不全（ED）治療薬類似化合物について

研究要旨 大阪府、佐賀県並びに愛知県より問い合わせを受けた製品に含まれていた化合物は、4種のED治療薬類似化合物であった。本研究では、これらの化合物がどの程度の活性を持つか明らかにするため、4化合物を単離しphosphodiesterase 5 (PDE5) 阻害活性試験を行った。その結果、これら4化合物は、PDE5阻害活性を持ち、1錠で、充分バルデナフィル等のED治療薬と同程度の活性を示しうることが明らかとなった。次に、これら4化合物のLC-PDA-MSによる分析法の検討を行い、10分以内に対象とした4化合物が良好に分離、検出できる系を確立した。

#### A. 研究目的


強壯を謳う健康食品では、当初、ED治療薬（医薬品成分）であるシルデナフィル（商品名バイアグラ）、バルデナフィル（商品名レビトラ）、タダラフィル（商品名シアリス 国内未承認）等を偽って意図的に添加した事例が多くみられた。しかし近年、摘発の目を逃れるために、これらの医薬品成分を一部改変した構造をもつ脱ジメチルシブトラミン、ヒドロキシホモシルデナフィル、ホモシルデナフィル、ホンデナフィル等新規な成分を添加する事例が目立つようになってきた。

平成17年度、大阪府公衆衛生研究所、佐賀県衛生薬業センター及び愛知県より厚生労働省を通して、構造決定等の協力依頼があった無承認無許可医薬品の疑いのある健康食品中の未知不純物は、いずれもED治療薬に類似した構造を持つ化合物であった。これらの化合物のヒト Phosphodiesterase 5 (PDE5)の活性部位との結合シミュレーショ

ンの結果（栗原、本研究班）からは、これらの化合物は、ED治療薬と同様のPDE5阻害活性を有すると推定されたが、実証的な研究は存在していない。そこで本研究では、これらの化合物がどの程度の強壯活性を持つか明らかにするため、4化合物を単離しphosphodiesterase 5 (PDE5) 阻害活性試験を行った。さらに、これらの化合物の分析法についても合わせて検討を行ったので報告する。

#### B. 研究方法

試料：アミノタダラフィル（ATDF. 1）含有試料は大阪府公衆衛生研究所より、ブソイドバルデナフィル（PVDF. 2）含有試料及び2-(2-ethoxyphenyl)-5-methyl-7-propylimidazo [1,5-*f*][1,2,4]triazin-4(3*H*)-one (DEPS. 3) 含有試料は愛知県より、5-(5-acetyl-2-ethoxyphenyl)-1-methyl-3-propyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one (DESHo. 4) は佐賀県衛

生薬センターより提供されたものを用いた。各 ED 治療薬及びその類似化合物 1-4 の構造を  1 に示した。

**試薬・試液**：アセトニトリル，メタノールは LiChrosolv gradient grade LC 用 (Merck 社) を，その他の試薬は特級品を用いた。

### 1. 化合物の単離

ATDF は，試料内容粉末 0.25 g をねじ口試験管にとり、アンモニア水 0.5 mL を加え、2.5 mL の酢酸エチルで 3 回振とう抽出を行い、有機層を合わせて溶媒留去し、残渣を得た。これに少量の酢酸エチルを加え、ソニケーション後静置し、上清を除いた。さらに 2 回同様に操作し、結晶性の白色粉末として得た。

PVDF 及び DEPS は，試料粉末 1 g をねじ口試験管にとり、アンモニア水 2 mL を加え、5 mL の酢酸エチルで 3 回振とう抽出を行い、有機層を合わせて溶媒留去し、残渣を得た。これを少量のメタノールに溶かし、分取 TLC に供した。それぞれの化合物に相当するスポットをかき取り，メタノールで抽出し，減圧乾固し，それぞれの化合物を得た。

得られた各化合物及び佐賀県衛生薬業センターより提供された DESHo の一部は NMR 測定等の機器分析に供した。

### 分取 TLC 条件

薄層板：Merck Silica gel 60 F254, 2 mm

展開溶媒：クロロホルム：メタノール (10/1)

### 2. Phosphodiesterase 5 (PDE5) 阻害活性試験<sup>1,2)</sup>

ヒト血小板由来 PDE5 を用い，基質 cGMP

の加水分解産物 5' GMP をさらにヌクレオチダーゼでグアノシンとし，反応液を陰イオン交換樹脂カラムに供し，流出液のグアノシン量を測定することにより，阻害活性を測定した。

40 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM 2-mercaptoethanol を含む酵素液に，10<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-7</sup> M の試料溶液を加え，さらに 1 μM の基質溶液を加え 30°C 30 分間反応させた，反応を停止させた後，ヘビ毒溶液を加え，さらに加水分解を行った後，陰イオン交換樹脂に供し流出液を集めグアノシン量を測定した。

### 3. LC-PDA-MS 測定

#### 装置

LC 部：ACQUITY UPLC システム (Waters 社)

MS 部：LCT Premier oa-TOF 型マス検出器 (Waters 社)

#### LC 条件

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 mm x 100 mm (Waters 社), 40 °C

移動相：0.1%ギ酸溶液 (A 液) 及び 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (B 液)

グラジエント条件：0 分 (20% B) -10 分 (50% B)

流速：0.4 mL/min

フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)：200 ~ 600nm, 1.2nm 間隔でスキャン

注入量：1 μL

#### MS 条件

キャピラリー電圧：3.0 kV, コーン電圧：50 V

ソース温度：100°C, 脱溶媒温度：300°C

イオン化法：ESI ポジティブ

測定モード：Wモード ( $m/z$  100-1,000)

ロックマス：ロイシンエンケファリン (0.4 ng/ $\mu$ L 0.1%ギ酸含有 50%アセトニトリル溶液), 5  $\mu$ L/min

#### 試料調製

試料粉末 0.2 g をねじ口試験管に量り取り, これに 28%アンモニア水 0.5 mL を加え混和した後, 酢酸エチル 5 mL を加え, 10 分間振とう抽出した. 遠心分離後, 酢酸エチル層を分取し, 残渣にさらに酢酸エチル 5 mL を加え, 同様に操作した. ATDF ではさらに 3 回同様に操作した. 酢酸エチル層を合わせて減圧下, 溶媒留去した. 残渣をデシケーター中で減圧乾燥した後, メタノールで正確に 10 mL とし, これを試験原液とした. これをメタノールで適宜希釈し, 分析を行った.

### C. 研究結果

#### PDE5 阻害活性試験

図 2 に, それぞれの化合物の対数濃度-PDE5 阻害活性曲線を示した. 各濃度における阻害活性率を● (ATDF), ■ (PVDF), ◆ (DEPS) 及び▲ (DEPHo) で示した. また, 表にそれぞれの化合物及び対照に用いたジピリダモールの IC<sub>50</sub> 値を示した.

#### 分析法の検討

UV 285 nm, 275 nm, 254 nm におけるクロマトグラム及び全イオン強度クロマトグラムを図 3 に示した. 10 分以内に全ての化合物が良好に分離, 検出された. 保持時間 5.82 分には ATDF が, 6.82 分には DEPS が, 8.84 分には DEPHo が, 9.11 分には PVDF のピークがそれぞれ観測された. また, それぞれの化合物の UV スペクトル及びマススペク

トルを図 4 に示した. 4 化合物の UV スペクトルのうち, ATDF 及び PVDF は, それぞれタダラフィル及びバルデナフィルの UV スペクトルと相似性の高いものであった. マススペクトルは, コーン電圧 50 V では, 分子関連イオン[M+H]<sup>+</sup>を主としたスペクトルであった. コーン電圧 120 V で Skimmer CID を試みたが, ATDF でわずかに  $m/z$  269 のフラグメントが生成するのみで, 他の 3 化合物ではフラグメントは認められなかった.

### D. 考察

文献によれば ED 治療薬であるシルデナフィル, バルデナフィル及びタダラフィルの IC<sub>50</sub> 値は実験系によって多少ばらつくが, それぞれ 3.5-4 nM<sup>3-8)</sup>, 0.091-0.7 nM<sup>7-10)</sup>, 0.9-1.8 nM<sup>7, 8, 11)</sup>程度である. 本研究で得られた IC<sub>50</sub> 値は, ATDF が 18 nM でタダラフィルの 1/10 程度, PVDF が 0.48 nM でバルデナフィルの 1/3 程度, DEPS が 4.5 nM でバルデナフィルの 1/30 程度, DEPHo でシルデナフィルの 1/4 程度であった. これらの化合物は, 250 mg 程度のカプセルまたは錠剤に含まれており, ED 治療薬製品に含まれるシルデナフィル量 25-100 mg, バルデナフィル量 2.5-20 mg, タダラフィル量 5-20 mg と比較すると, 1 錠 (カプセル) で, 十分に同程度の活性を示すことができることが明らかとなった.

次に, LC-PDA-MS による分析法を検討したところ, 10 分以内に対象とした 4 化合物が良好に分離, 検出が可能となった. 試料からの抽出については, ATDF は, 酢酸エチルに比較的溶けにくく, 試料中の含量にもよるが, アンモニアアルカリ性条件での



酢酸エチル抽出が2回では、十分な回収率が得られない可能性があり、定量を行う際には抽出回数の検討が必要であると考えられた。

4 化合物のなかでタダラフィル及びバルデナフィルの UV スペクトルと相似性の高い UV スペクトルを示した ATDF 及び PVDF は、構造の類似性の強さを反映したものと考えられた。

#### E. 結論

1. 健康食品より単離された ED 治療薬の類似化合物 **1-4** について PDE5 阻害活性試験を行った。その結果、これらの化合物は、医薬品成分よりは活性は弱いものの、1錠(カプセル)に含まれる量をコントロールすることで、十分に同程度の活性を示すことができることが明らかとなった。

2. ED 治療薬類似化合物の UPLC/MS による分析法の検討を行い、10分以内に4化合物の分離・同定が可能な方法を示した。

#### 参考文献

- 1) Weishaar, R. E., Burrows, S. D., Kobylarz, D. C., Quade, M. M., and Evans, D. B.: Multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in cardiac and smooth muscle and in platelets. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 787-800 (1986).
- 2) 実験は Cerep 社 (Poitiers, France) で行われた。
- 3) Ballard, S. A., Gingell, C. J., Tang, K., Turner, L. A., Price, M. E. and Naylor, A. M.: Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phospho-

diesterase isozymes, *J. Urolol.*, **159**, 2164-2171 (1998)

- 4) Turko, I. V., Ballard, S. A., Francis, S. H. and Corbin, J. D.: Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol. Pharmacol.*, **56**, 124-130 (1999).
- 5) Kotera, J., Fujishige, K., Michibata, M., Yuasa, K., Kubo, A., Nakamura, Y. and Omori, K.: Characterization and effects of methyl-2-(4-aminophenyl)-1,2-dihydro-1-oxo-7-(2-pyridinylmethoxy)-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-3-isoquinoline carboxylate sulfate (T-1032), a novel potent inhibitor of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1333-1341 (2000).
- 6) Wang, P., Wu, P., Myers, J. G., Stamford, A., Egan, R. W. and Billah, M. M.: Characterization of human, dog and rabbit corpus cavernosum type 5 phosphodiesterases. *Life Sci.*, **68**, 1977-1987 (2001).
- 7) Weeks II, J. L., Zoraghi, R., Beasley, A., Sekhar, K. R., Francis, S. H. and Corbin, J. D.: High biochemical selectivity of tadalafil, sildenafil and vardenafil for human phosphodiesterase 5A1 (PDE5) over PDE11A4 suggests the absence of PDE11A4 cross-reaction in patients. *Int. J. Impotence Res.*, **17**, 5-9 (2005).
- 8) Blount, M. A., Beasley, A., Zoraghi, R., Sekhar, K. R., Bessay, E. P., Francis, S. H. and Corbin, J. D.: Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays

- potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 144–152 (2004).
- 9) Corbin, J. D., Beasley, A., Blount, M. A. and Francis, S. H.: vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochem. Int.*, **45**, 859–863 (2004).
- 10) Keating, G. M. and Scott, L. J: Vardenafil. A review of its use in erectile dysfunction. *Drugs*, **63**, 2673-2703 (2003).
- 11) Curran, M. P. and Keating, G. M.: Tadalafil. *Drugs*, **63**, 2203-2212(2003).
- F. 健康危機情報  
なし.
- G. 研究発表  
1. 論文発表  
なし.  
2. 学会発表等  
日本薬学会第126年会 (2006.3.29)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし.

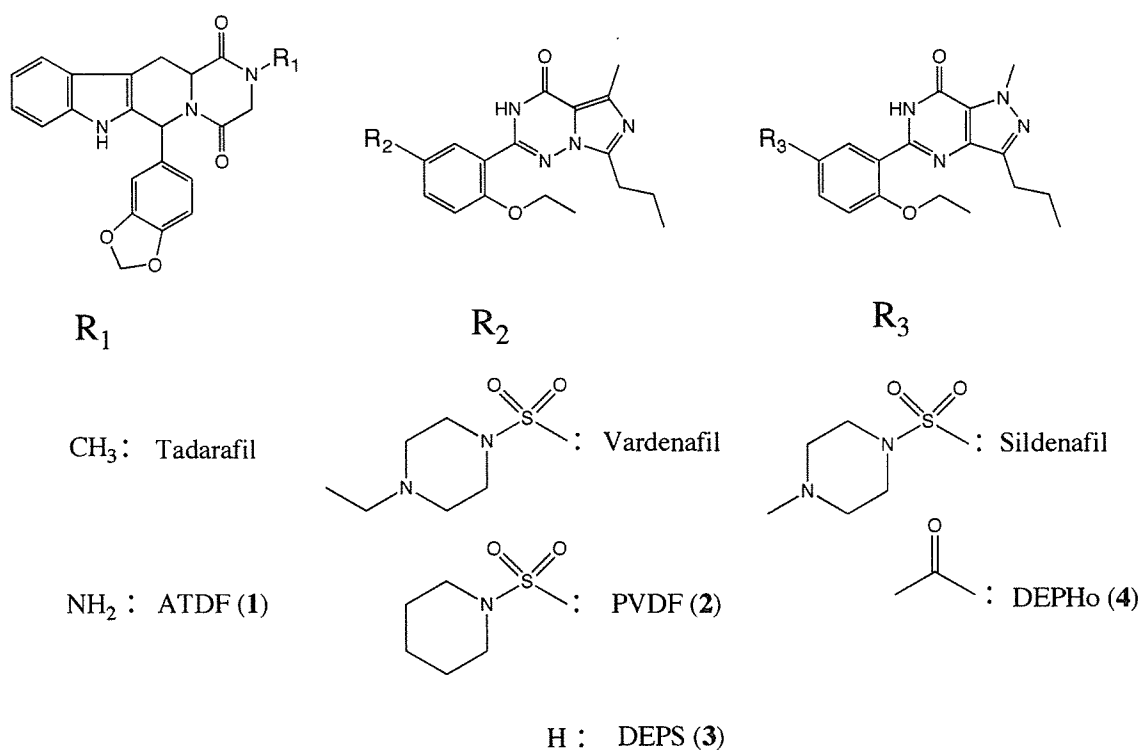


図1 ED治療薬及びその類似構造化合物

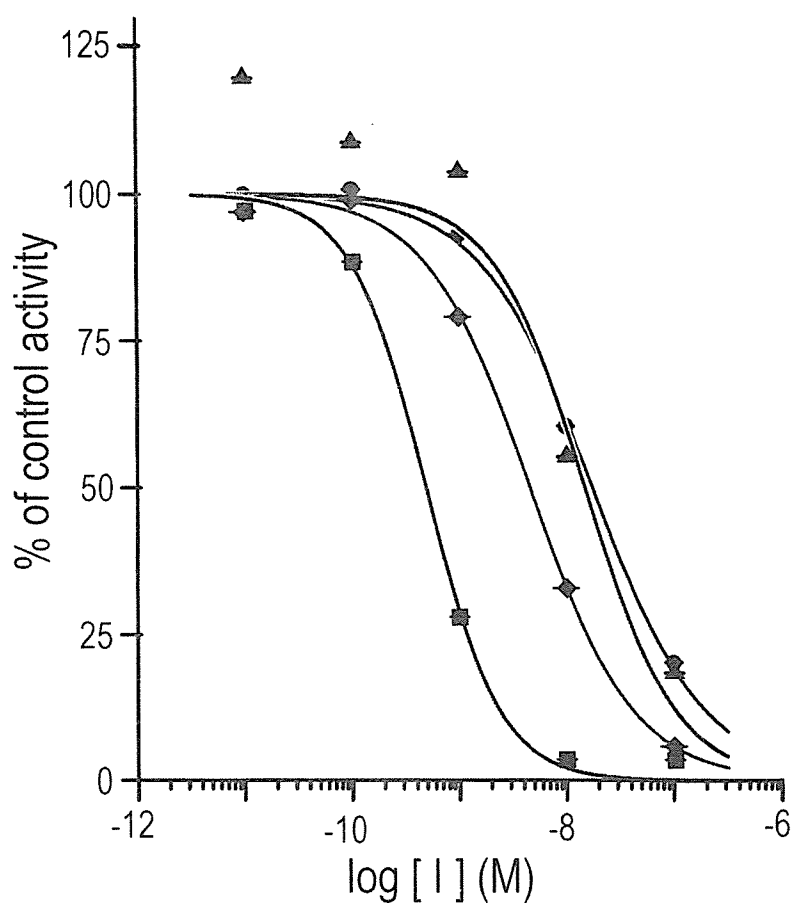


図 2 ATDF (●), PVDF (■), DEPS (◆) 及び DEPHo (▲) それぞれの対数濃度-PDE5 阻害活性曲線

表 1 ED 治療薬類似化合物及び対照(dipyridamole)の PDE5 の 50%阻害活性値 (IC50) と Hill 定数 (nH)

	IC50 (nM)	nH
ATDF	18	0.8
PVDF	0.48	1.3
DEPS	4.5	0.9
DEPHo	15	1.0
dipyridamole	660	0.9

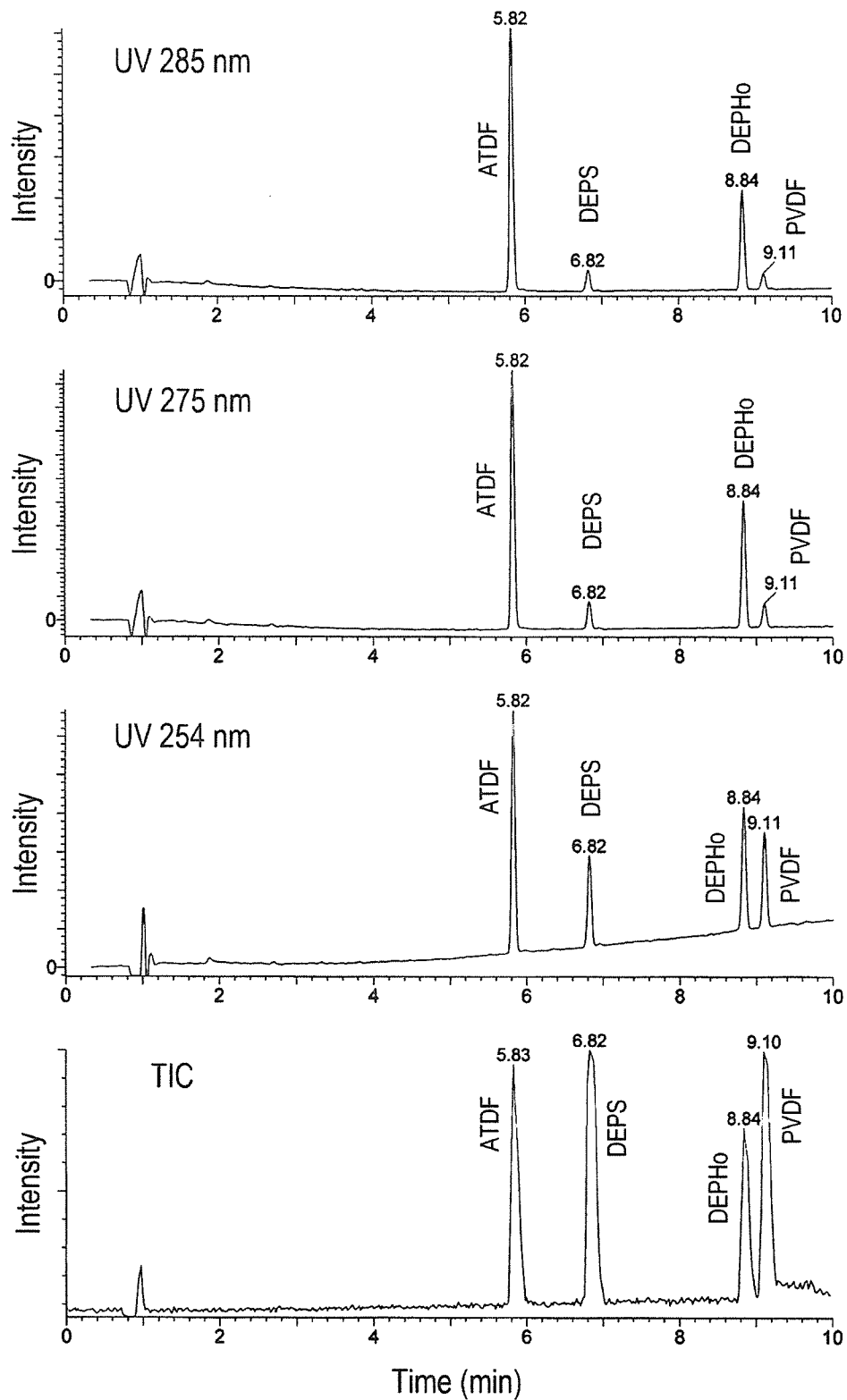


図3 ED治療薬類似構造化合物の各UV波長によるクロマトグラム及び全イオンクロマトグラム (TIC)

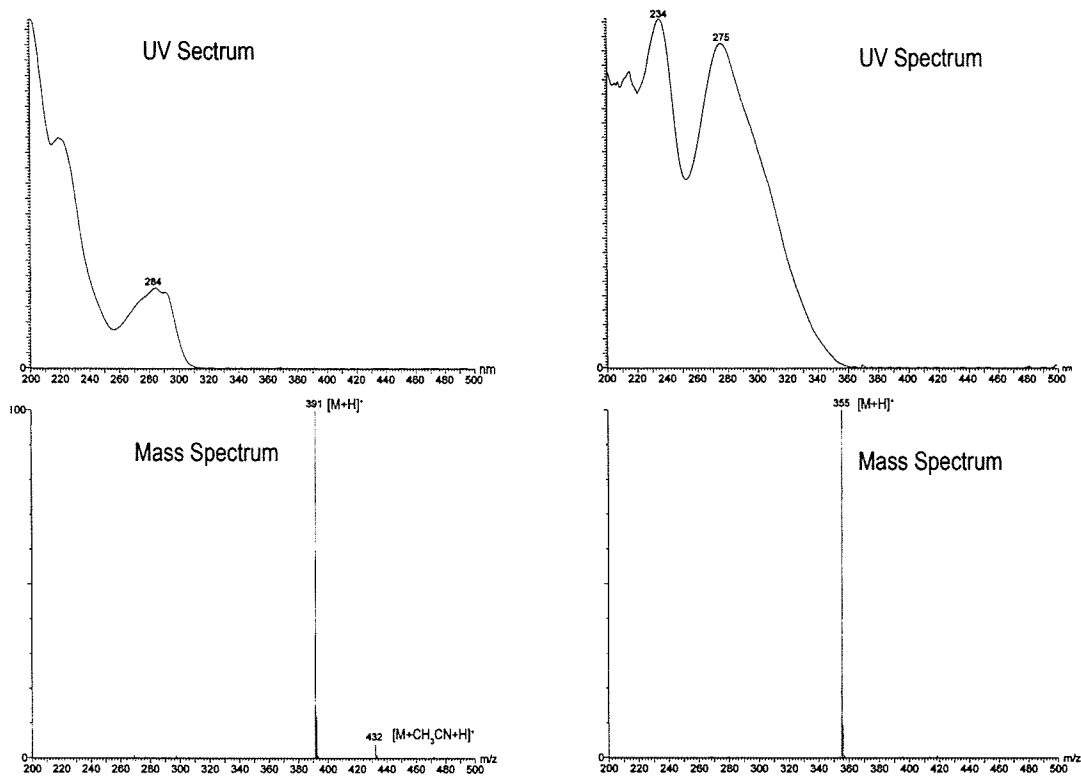


図 4-1 ATDF の UV 及びマススペクトル

図 4-3 DEPHo の UV 及びマススペクトル

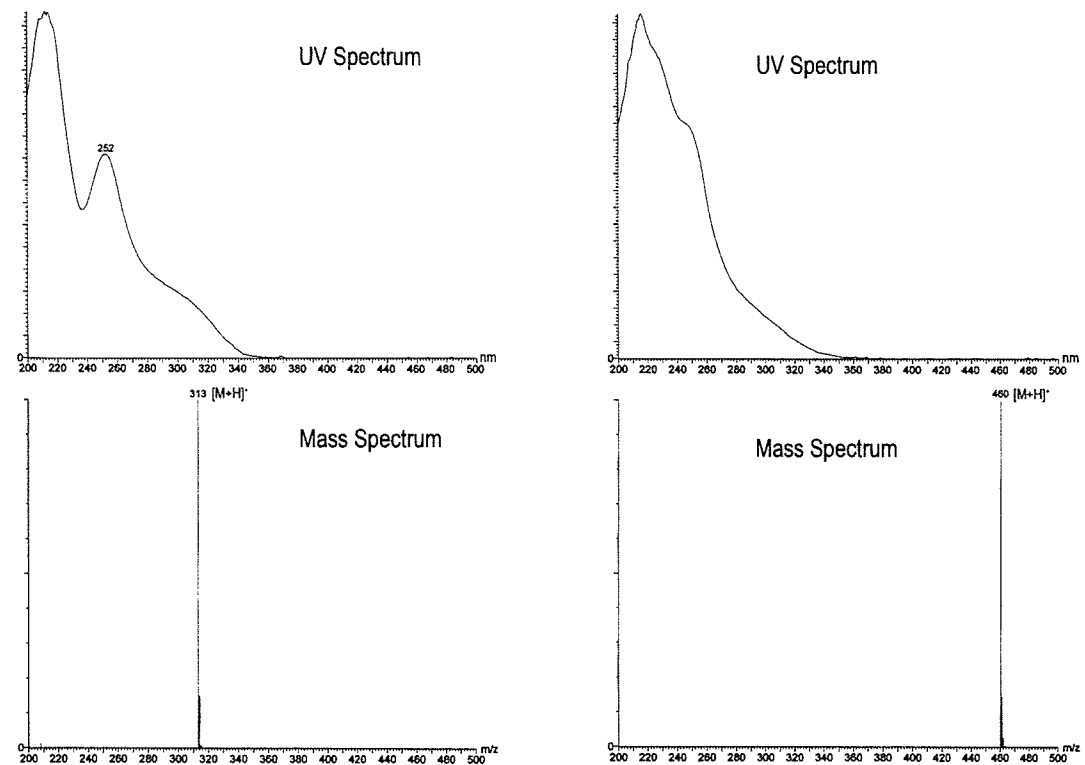


図 4-2 DEPS の UV 及びマススペクトル

図 4-4 PVDF の UV 及びマススペクトル

分担研究課題 「専ら医薬品」の有効性及び安全性等の評価に関する調査及び実証的研究並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長  
研究協力者 栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

－無承認無許可医薬品の規制のためのインシリコ評価法に関する研究－

無承認無許可医薬品を迅速に規制、検挙するためには、これら不適切な化合物の迅速な活性評価スクリーニングが必要である。しかし、*in vitro*, *in vivo* 試験では時間がかかり、迅速な対応が困難である。そこで本研究では *in silico* による評価法の開発に関する研究を行った。コンピュータシミュレーションにより、当該化合物と Human phosphodiesterase 5 (PDE5) との結合モデルを構築し、活性について考察した。

A. 研究目的

健康食品等に含まれる無承認無許可医薬品であるシルденаフィル類似物質 (PDE5 阻害剤) が健康被害の危険性があり、大きな問題となっている。これら無承認無許可医薬品を迅速に規制、検挙するためには、これら不適切な化合物の迅速な活性評価スクリーニングが必要である。しかし、*in vitro*, *in vivo* 試験では時間がかかり、迅速な対応が困難である。そこで本研究では *in silico* による評価法の開発を目的とする。

B. 研究方法

コンピュータシミュレーションにより薬物と酵素がどのように結合しているかを予測し、薬物の評価を検討することとした。薬物と Human Phosphodiesterase 5 (PDE5) との結合モデルは、以下のようにして構築した。PDE5 の三次元構造は X 線構造 (PDB ID: 1UDT, 1UDU) を用いた。タンパク質内の薬物のコンフォメーションは、プログラム *MacroModel* (Schrodinger,

Inc.) のコンフォメーションサーチ (条件: Mixed MCMM / Low Mode, Amber\*) を用いて求めた。コンフォメーションサーチで得られた最安定構造を結合モデルとした。水素結合を中心に結合モデルの評価を行った。

C. 研究結果と考察

1. ホンデナフィル (Hongdenafil) と PDE5 の結合モデル

シルденаフィル (Sildenafil) とホンデナフィルの最安定構造を比較した結果、両化合物は極めてよく重なり合うことがわかった。(図1) ホンデナフィルと PDE5 (1UDT) の結合モデルを構築した。(図2) その結果、ホンデナフィルはシルденаフィルが結合した部位にほぼ同一の配向性で結合することが明らかとなった。さらに、シルденаフィルは活性ドメインにおいて Gln817 と水素結合を形成するが、ホンデナフィルも同様に Gln817 と水素結合を形成しうることが示された。このことに

より、ホンデナフィルは同一の作用機序でシルデナフィルの標的分子である PDE5 を阻害しうることを極めて強く示唆する。

## 2. アミノタダラフィル (Aminotadalafil) と PDE5 の結合モデル

タダラフィル (Tadalafil) と PDE5 が結合した X線構造 (1UDU) を基にして、アミノタダラフィルと PDE5 の最安定構造を構築した。その結果、アミノタダラフィルはタダラフィルと同様な結合様式をとり、Gln817 との水素結合も維持されている。(図 3) アミノタダラフィルは PDE5 を阻害することが予測される。

## 3. その他の化合物の結合モデル

ホンデナフィルとアミノタダラフィル以外の化合物 (1~3) についても PDE5 との結合モデルを構築した。(図 4) その結果、1 についてはバルデナフィルと同様に結合することが予測され、活性も予測された。2, 3 に関しては、分子構造が小さいので、最安定な結合モデルが活性型結合モデルとは異なった。これは、阻害活性が弱い可能性を示唆する。これは実際の生物活性とも定性的に一致した。

## D. 結論

定性的にはコンピュータシミュレーションにより予測した結合モデルは有効であることが明らかとなった。最安定構造を結合モデルとすることの妥当性が示せた。今後、定量性を得るためにはさらなる検討が必要である。

## E. 健康危機情報

特になし

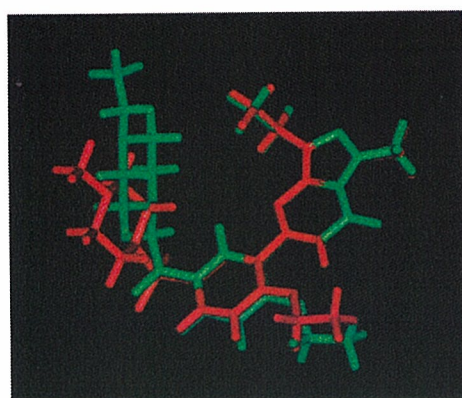
## F. 研究発表等

Tanaka, M.; Anan, K.; Demizu, Y.; Kurihara, M.; Doi, M.; Suemune, M.  
Side-chain chiral centers of amino acid and helical screw handedness of its peptides  
*J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11570-11571 (2005)

Honzawa, S.; Hirasaka, K.; Yamamoto, S.; Peleg, T.; Fujishima, M.; Kurihara, N.; Saito, S.; Kishimoto, T.; Sugiura, K.; Waku, H.; Takayama, A. Kittaka  
Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 Analogues Possessing Aromatic Ring on 2 $\alpha$ -Position  
*Tetrahedron*, **61**, 11253-11263 (2005)

Kurihara, M.; Okuda, H.; Oba, M.; Demizu, Y.; Tanaka, M.; Suemune, H.  
Prediction of Helical Screw Sense of Oligopeptides Containing Chiral  $\alpha$ , $\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids: Computational Study  
*Peptides 2004*, 206-207 (2005)

Sildenafil と Hongdenafil のエネルギー最小構造の重ね合わせ



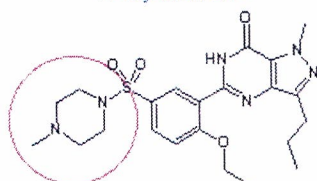
構造の類似性高い  
ピペラジン環も空間的に大きくは変わらない

図 1

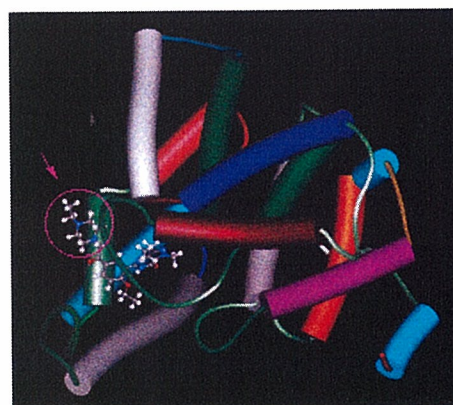
Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules



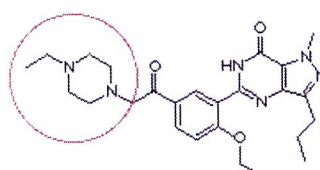
X-ray structure



Sildenafil



Modeling structure



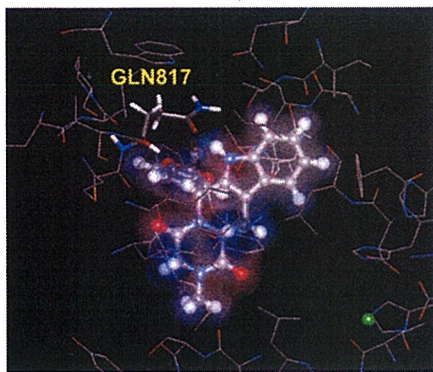
Hongdenafil

X線の構造は *Nature*, 425, 98-102 (2003) より

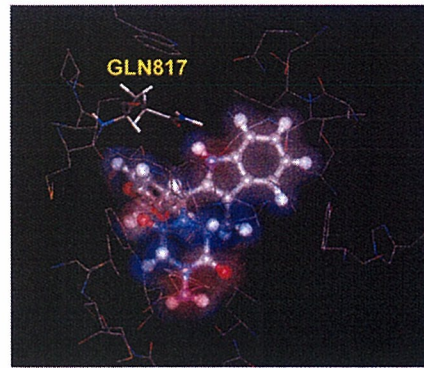
図 2



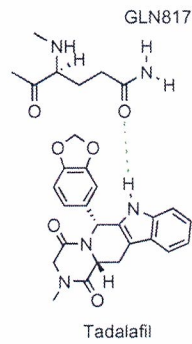
Tadalafil と Aminoadalafil の結合様式



X-ray structure

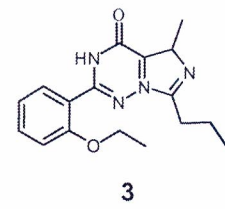
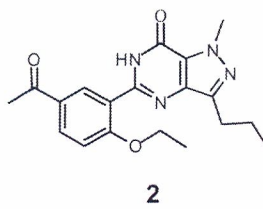
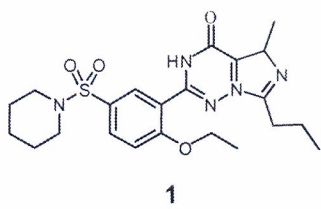
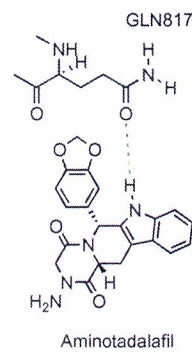


Modeling structure



GLN817と水素結合を形成している

図 3



1 と PDE5 との結合モデル

図 4

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

分担研究課題 「専ら医薬品」の有効性，安全性等の評価に関する調査及び  
実証的研究並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部部長

漢方処方品質指標としての味に関する研究

日本薬局方では、生薬の『味』は、適否の判定基準の一つである。しかし、『味』の表現は非常に曖昧かつ主観的で、再現性よく客観的な描写をすることは困難であると考えられる。本研究では、医薬品の監視等の観点から、品質指標として漢方処方の味を規格化することを目的とし、近年開発された味認識装置を用い、漢方処方の味について一定の数値に基づいた規格化が可能であるか検討を行っている。昨年度は、味認識装置を用いた測定によって漢方処方ごとの味の特徴の数値化が可能であることを報告した。今年度は、最も繁用されている漢方処方の一つである葛根湯について検討を行い、その結果、葛根湯独自の味に大きく寄与しているのはマオウであり、さらにカクコンの旨味とカンゾウの渋味が加わって、処方である葛根湯の味を構成していることが示された。従って、医薬品としての漢方処方を味認識装置により規格化する場合、生薬により、味への影響差があること認識して、規格化することが、重要であると考えられた。

協力研究者

川原 信夫 国立医薬品食品衛生研究所 生薬  
部室長

安食菜穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬  
部

水上 元 名古屋市立大学大学院薬学研究科  
生薬学分野 教授

然物を基原とする生薬は、日本薬局方の各条において性状の項に記載される「味」が適否の判定基準のひとつであることが示されている。従って生薬や生薬より調製される漢方処方における味の表現は、化学的合成医薬品と比べてより重要と考えられる。一方、味には客観的な基準が無く、試験者の感覚に基づいてこれまで表現されてきており、客観性のある評価基準の設定が重要であると考えられる。

A. 研究目的

現行の日本薬局方において、収載される医薬品の適否は、その医薬品各条の規定、通則、生薬総則、製剤総則及び一般試験法の規定によって判定される。各条において性状の項に記載されるに及び味の記載は参考に供したもので、適否の判定基準を示すものではないとされているが、そこには「ただし、生薬を除く」との記載があり、天

本研究では、医薬品の監視等の観点から漢方処方の味を規格化することを目的として、近年開発され、食品分野での品質評価に用いられ始めている味認識装置を用いて、漢方処方の味について一定の数値に基づいた規格化が可能であるか検討を行っており、昨年度は味認識装置を用いた味測定によって、漢方処方ごとの味の特徴の数値化が

可能であることを報告した。今年度は、最も繁用されている漢方処方の一つである葛根湯について、味に関するより詳細な評価検討を行った。

## B. 研究方法

### (1) 実験材料

日局カッコン、日局マオウ、日局タイソウ、日局ケイヒ、日局シャクヤク、日局カンゾウ、日局ショウキョウは株式会社ウチダ和漢薬より入手した。市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末は日本漢方生薬製剤協会より御恵与いただいた。

### (2) 装置

味の測定には、味認識装置 SA402B (株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー) を用いた。また、葛根湯および、生薬の煎出には、自動煎じ器煎治 (株式会社ウチダ和漢薬) を用いた。

### (3) 試料の調製

#### ①葛根湯および葛根湯構成生薬の煎出液

葛根湯一日分量 (構成生薬: 日局カッコン 8g, 日局マオウ 4g, 日局タイソウ 4g, 日局ケイヒ 3g, 日局シャクヤク 3g, 日局カンゾウ 2g, 日局ショウキョウ 1g), および葛根湯の各構成生薬の一日分量に、基準液を水で 6 倍希釈した溶液を 600 mL 加え、自動煎じ器にて、約 300 mL になるまで煎出した。煎出液をろ過し、基準液を水で 3 倍希釈した溶液 (以後、基準液 (1→3) とする) を用いて容量を 300 mL に合わせ、3, 500 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心分離した各上清を基準液 (1→3) にて 10 倍に希釈した液を味認識装置測定用試料液 (以後、試料液 a とする) とした。また、遠心分離した各上清原液をヒトによる味覚試験用試料液 (以後、試料液 b とする) とした。尚、タイソウおよびショウキョウについては、試料液 b についても、味認識装置による測定に用いた。

#### ②葛根湯エキス

市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末 1 検体

(製造原料構成生薬: 日局カッコン 8g, 日局マオウ 4g, 日局タイソウ 4g, 日局ケイヒ 3g, 日局シャクヤク 3g, 日局カンゾウ 2g, 日局ショウキョウ 1g) を、基準液 (1→3) に 0.2 w/v % となるよう懸濁した液を味認識装置による味測定試料液 (以後、試料液 c とする) とした。また、ヒトによる味覚試験には、市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末を試料として用いた。

### (4) 測定方法

#### ① 味認識装置を用いた味測定

味認識装置を用いて、各試料液について味の測定を行い、ウェーバーの法則<sup>1-3)</sup>に基づいて、ヒトが感じる味強度の違いを推定した。ヒトが『味が違う』と認識できるのは、その味が 20 % 濃く (または薄く) なった場合とされており、推定値 1 の差は、この 20 % の差を表している。数値 0 は、基準液 (1→3) の味である。また、マイナスの値は、センサーの閾値が低いために得られる値であり、ヒトでは無感覚であると考えられる領域である。現在、本装置を用いて推定可能な味の要素は、酸味、塩味、旨味、酸性苦味、酸性苦味後味、渋味、渋味後味、塩基性苦味、塩基性苦味後味である。昨年度、測定を行った甘味については、センサーの安定が得られなかったため、今年度は味認識装置による測定は行わず、ヒトによる評価のみを行った。各味の基準となる呈味物質を table 1 に示す。

#### ② ヒトによる味覚試験

葛根湯および葛根湯構成生薬の煎出液と、市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末について、本研究室所属の 5 名 (男性 2 名, 女性 3 名, 年齢 22 ~ 43 歳) によって、ヒトによる味覚試験を行った。葛根湯および葛根湯構成生薬の煎出液については、各試料液について、約 5 mL を数秒間口に含み、味を評価した。市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末については、約 2 mg の乾燥粉末状態の

エキス原末を舌上にのせ、唾液を含ませて溶解しつつ、味を評価した。1回毎に口内を水で漱ぎ、各試料について上記試験を複数回行い、第十五改正日本薬局方原案作成要領<sup>4)</sup>に基づいて味の表現を決定した。

### C. 研究結果

葛根湯および葛根湯の各構成生薬と市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末それぞれの、味認識装置測定用試料液(試料液 a および c)について、味認識装置による測定にて推定された味の分布を Fig. 1 に示す。また、葛根湯および葛根湯の各構成生薬それぞれの、味認識装置測定用試料液の 10 倍濃度の試料液 b, および市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末についての、ヒトによる味覚試験の結果を Table 2 に示す。

葛根湯の試料液 a (味認識装置測定用試料液) は、味認識装置を用いた試験によって得られた値のうち、渋味後味以外の味要素の値が 1 を越えており、これらの味要素は『味がある』と感知された。また、市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末を基準液に 0.2 w/v % となるよう懸濁して調製した試料液 c は、葛根湯の試料液 a とほぼ同じ味の分布を示したが、旨味について、葛根湯の試料液 a と比較して推定値が 1 以上低かった (Fig. 1(A))。一方、ヒトによる味覚試験では、味認識装置測定用試料液(試料液 a) の 10 倍濃度である葛根湯の試料液 b は、『はじめ甘く、後にやや苦く渋い。辛味と酸味がわずかに残る』、と表現され、昨年度の研究において、市販葛根湯エキス製剤用のエキス原末は、『はじめ甘く、後に辛く多少苦い』、と表現されており、両者の味がよく似ていることを示している。しかし、『煎出液の方が、エキス剤と比べてまろやかでおいしい』と感じられる傾向にあった (Table 2)。

マオウの試料液 a は、味認識装置を用いた試験によって得られた値のうち、酸味、塩味、旨味、酸性苦味、渋味、塩基性苦味、塩基性苦味後味に

ついて、『味がある』と感知された (Fig. 1(B))。それらのうち、他の生薬と比較して、マオウはほとんどすべての味で値が上回った。特に、酸味と塩基性苦味については、処方である葛根湯よりも大きな値を示した。今回、単独生薬で葛根湯よりも強い味が感知されたのはマオウのみであった。一方、ヒトによる味覚試験では、マオウの試料液 b は、『酸味およびえぐみがあり、また、葛根湯のような味がする』と表現された (Table 2)。

カッコンの試料液 a は、味認識装置を用いた試験によって得られた値のうち、塩味、旨味、酸性苦味について、『味がある』と感知された (Fig. 1(C))。特に旨味は推定値 6.1 であり、他の味と比較して強いことが判明した。また、塩味も比較的強く、すべての単味生薬の試料液の中で最も高い値を示した。一方、ヒトによる味覚試験では、カッコンの試料液 b は、『甘く、香ばしい』と表現された (Table 2)。

ケイヒの試料液 a および、シャクヤクの試料液 a は、味認識装置を用いた試験によって得られた値のうち、酸性苦味について、『味がある』と感知された (Fig. 1(D, E))。一方、ヒトによる味覚試験では、ケイヒの試料液 b は、『ほのかに甘く、辛く、渋い』、と表現され、シャクヤクの試料液 b は、『ほのかに甘く、わずかにえぐい』、と表現された (Table 2)。

カンゾウの試料液 a は、味認識装置を用いた試験によって得られた値のうち、塩味、旨味、酸性苦味および渋味について、『味がある』と感知された (Fig. 1(F))。特に渋味は他の生薬と比較して強く、マオウより若干大きな値を示した。一方、ヒトによる味覚試験では、カンゾウの試料液 b は、『はじめ甘く、その直後に苦味を感じる』と表現された (Table 2)。

タイソウの試料液 a および、ショウキョウの試料液 a には、味認識装置を用いた試験によって得られた値の中に『味がある』と感知された味の要素は無かった (Fig. 1(G, H))。一方、ヒトによる味