

分担研究課題：「専ら医薬品」の規制範囲と見直しに関する研究

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

－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。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ている。本年度は、チオデナフィル、ノルホンデナフィルと Human phosphodiesterase 5 (PDE5) とのコンピュータシミュレーションによる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デナフィル類似物質（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

シルデナフィル、ホンデナフィルは、生体内で環状グアノシンリン酸（cGMP）の分解を行っている 5 型ホスホジエステラーゼ（PDE5）の酵素活性を阻害する。（図 1，図 2）これが NO 作動性神経に作用して血管を拡張させ、血流量が増えることによって機能すると考えられている。昨年度と同様に、シルデナフィル類似物質と Human Phosphodiesterase 5 (PDE5) との結合モデルを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）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。

本年度はチオデナフィル、ノルホンデナフィルについて行った。

C. 研究結果と考察

1. チオデナフィル、ノルホンデナフィルと PDE5 の結合モデル

チオデナフィル、ノルホンデナフィルと PDE5（1UDT）の結合モデルをそれぞれ構築した。（図 4，5）その結果、これらはシルデナ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、シルデナ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、これらも同様に Gln817 と水素結合を形成する

ことが示された。(図4、5) このことにより、これら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を阻害することが予測される。

#### D. 結論

チオデナフィル、ノルホンデナフィル両化合物がPDE5と結合し、阻害活性を有することを定性的に予測した。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. 関連研究発表等

W. Hakamata, Y. Sato, H. Okuda, S. Honzawa, N. Saito, S. Kishimoto, A. Yamamoto, T. Sugiura, A. Kittaka, M. Kurihara  
(2S,2' R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 120-123(2008)

S. Honzawa, Y. Yamamoto, A. Yamashita, T. Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A. Kittaka  
The 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D3 analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu)  
*Bioorg. Med. Chem.*, 16, in press

M. Tanaka, Y. Demizu, M. Nagano, M. Hama, Y. Yoshida, M. Kurihara, H. Suemune

Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered Ring  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acid  
*J. Org. Chem.*, 72, 7750-7756 (2007)

T. Satoh, N. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, R. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki  
Structural basis for recognition of high-mannose type glycoproteins by mammalian transport lectin VIP36  
*J. Biol. Chem.*, 282, 28246-28255(2007)

M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, Y. Demizu, M. Nagano, N. Kawabe, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune  
Computational Study on Conformation of Oligopeptides Containing Chiral Cyclic  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids.  
*Peptides 2006*, 546-547(2007)

M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune  
Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides.  
*Peptides 2006*, 268-269(2007)

Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H.: Controlling the Helical Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids  
*Peptides 2006*, 476-477(2007)

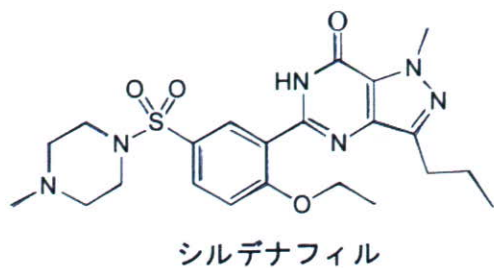


図 1

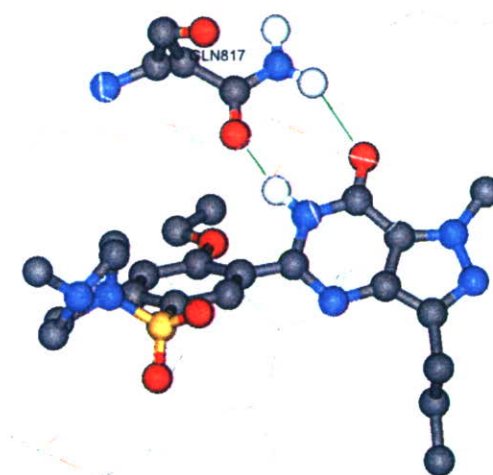
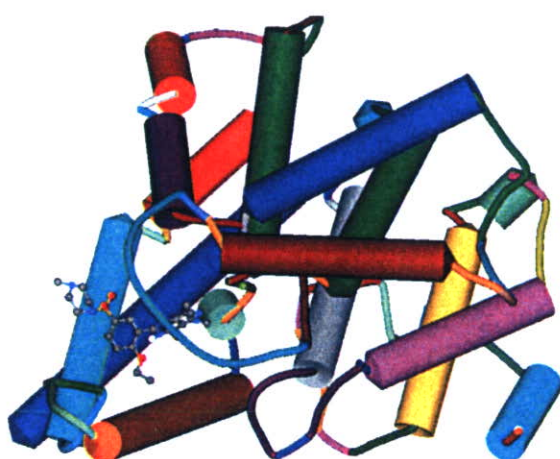


図 2 シルデナフィルが結合した PDE5 の X線構造 (左), シルデナフィルと PDE5 との水素結合



図 3

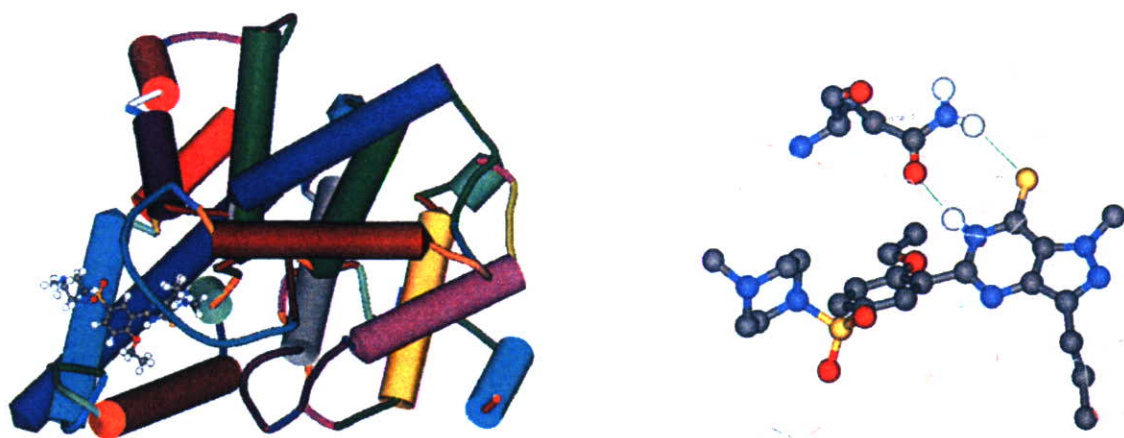


図4 チオデナフィルと PDE5 との結合モデル

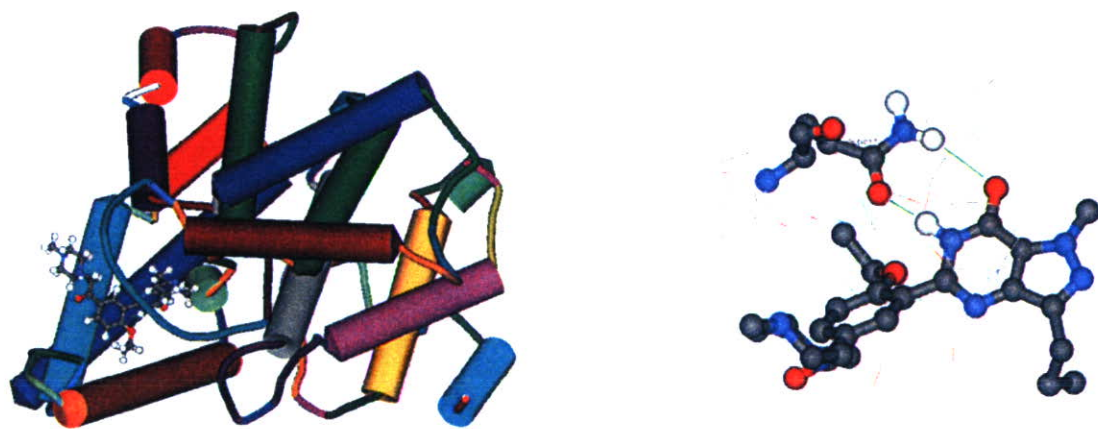


図5 ノルホンデナフィル (右) と PDE5 との結合モデル

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 専ら医薬品の規制範囲と見直しに関する研究

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 川原 信夫 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長

ダミアナ (*Turnera diffusa* Willd) の成分研究

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より、詳細な成分検索が必要と判断がなされたダミアナの含有成分を明らかにすることを目的とし、成分研究に着手した。この結果、分画の一部にドラーゲンドルフ試薬に陽性反応を示す呈色スポットが確認され、アルカロイド系化合物の存在を示唆された。そこでドラーゲンドルフ試薬陽性成分の精製を試み、得られた化合物はアルカロイド系脂肪酸関連化合物の可能性が示唆された。また、他に4種のフラボノイド誘導体1-4を単離した。

協力研究者

花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部  
室長

金 益輝 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

A. 研究目的

人が経口的に服用する物が薬事法に規定する医薬品に該当するか否かについては、昭和46年6月1日付、薬発第476号厚生省薬務局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」<sup>2)</sup>（以下、食薬区分）により判断し、医薬品と判断された成分本質（原材料）については、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」（専ら医薬品リスト）に例示として掲げられている（注：大改正 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「医薬品の範囲に関する基準の改正について」、一部改正 平成14

年11月15日付、医薬発第1115003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」、平成16年3月31日付、薬食発第0331009号厚生労働省医薬品局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」）。国立医薬品食品衛生研究所を中心とする研究班では、平成15年度より、上記「専ら医薬品リスト」に掲載された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、まず文献調査を行い、最終的に5段階の評価を行っている。

ダミアナ (*Turnera diffusa* Willd) は、「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」において、C評価が下されており、その処遇に関してはさらに検討の必要があると見なされた<sup>1)</sup>。問題とされてい

るのは、わが国において使用実績がないこと及び Web 上で大麻様の幻覚作用を有するとの報告があることに起因している。前者に関しては現在も使用実績はなく、健康被害に関しても報告がない。加えて、長期間にわたり大量に摂取すると、肝臓を害するとの説があるが、これに該当する研究報告も認めることは出来なかった。後者に関しては、海外においてその効果を実証するべく試用報告が、非公式に Web 上に記載されているが、大多数のものはその様な効果は得られなかったとしている。

他方成分に関する報告では、CHCl<sub>3</sub> 抽出物及び MeOH 抽出物においてアルカロイドの存在を示唆する結果が得られ、それらはダミアナ由来の既知化合物である cyanogenic glycoside (Tetraphyllin B) とは別のものであるとの記載があった<sup>2)</sup>。またこれとは別に、フラボノイド、テルペン、サッカライド等の二次代謝産物 35 種を単離・構造決定した報告例もあった<sup>3)</sup>。

最近ダミアナに関し報告されているものは、どれも興味深いものであり、生理活性に関しては直接健康被害に関与し兼ねないものでもある。性行動に関する報告は、ヒトに置き換えた際健常者に対しての影響は軽微であることが想像される。しかし、抗不安作用に関しては、近年興味本位での抗不安薬の悪用が取り立たされており、楽観視することは出来ない。ただし、どちらの報告に関しても、活性本態の特定は出来ていない事から、今後の展開を注視する必要があるものと思われる。一方含有成分に関する報告ではアルカロイドの存在は注目に値する。アルカロイドは総じて強い生物活性を有し、医薬品として利用されるものも多く、また激しい生理作用や生物活性のために、有毒物質として存在することも多い。故にアルカ

ロイドを含むものに関しては細心の注意を払う必要のある場合もある。本研究班にて報告している詳細データにおいても、アルカロイドの存在有無に関し調査内容を記載しており、無視することは出来ない。

本研究では、昨年度に引き続き、専ら医薬品として区分されるダミアナ *Turnera diffusa* Willd (ツルネラ科) について、食薬区分の見直しが必要かどうか成分化学的な情報を入手する目的で、本植物の成分探索、特にアルカロイドの存在を確認すべく研究に着手したので報告する。

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

ダミアナ (*T. diffusa*) は海外より地上部を入手した。オープンカラムの担体は、Kieselgel 60 (Merck 製) を用い、アルカロイドの検出は、蛍光剤入り TLC plates Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck 製) にて各画分を展開後、ドラーゲンドルフ試薬にて確認を行った。なお、ドラーゲンドルフ試薬は第十五改正日本薬局方に従い用時調製した。NMR 溶媒は Methanol-*d*<sub>4</sub> 99.8%、Chloroform-*d*<sub>1</sub> 99.5% (Merck 製) を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。本研究において、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

### 装置及び測定条件

分取 HPLC は島津製作所製 Shimadzu LC-8A system (ポンプ: LC-8A, 紫外可視検出器: SPD6AV, カラムオープン: TOSO RE8000) に、インテグレーターとして Shimadzu CR-5A を接続したものを用いた。

## ダミアナ (*T. diffusa*) の分画操作

### ダミアナの抽出及び分画

ダミアナ (*T. diffusa*) の地上部 400 g を MeOH 3.0 L にて温浸し、この操作を三回繰り返す、得られた抽出液を減圧下濃縮することにより、抽出物 92.4 g を得た。抽出物は MeOH 1.5 L に溶解させ、MeOH/CHCl<sub>3</sub> 混液を用いた活性炭カラムに付し、4 画分 (fr. A - D) を得た (Chart 1)。

更に fr. C 分画をシリカゲルカラムクロマトに付し、クロロホルム/メタノール (10:1, 9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 0:1) の順に溶出し、14 画分 (fr. 1-14) を得た。そのうち、fr. 8 (900.0 mg) について H<sub>2</sub>O/MeOH (1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1) 混液を用いた HP 20 カラムに付し、3 画分 (fr. 1-3) を得た。その fr.1 (525.4 mg) 及び fr. 2 (161.0 mg) を ODS-HPLC で分離している。また、fr. C 分画から得た fr. 9 (300.0 mg) を充填剤に ODS を用いた HPLC で分離し、さらに HPLC またはシリカゲルカラムクロマトで分離、精製した。その結果、fr. 1 から化合物 1 (7.3 mg)、fr. 2 から化合物 2 (121.1 mg)、fr. 3 から化合物 3 (2.6 mg)、4 (2.0 mg) 及び 5 (1.5 mg) を単離した (Chart 2)。

また、fr. D 分画をシリカゲルカラムクロマトに付し、クロロホルム/メタノール (1:0, 6:1, 3:1, 0:1) の順に溶出し、6 画分 (fr. 1-6) を得た (Chart 3)。

### C. 研究結果

#### ドラーゲンドルフ試薬によるアルカロイド様成分の検出

本検討にて得られた全ての画分は、その一部を取り、TLC にて展開・乾燥した後、ドラーゲンドルフ試薬にディップすることにより、アルカロイドの有無を確認した。その結果、MeOH 抽出物及

び fr. A-D においてその存在を示唆する反応は見られなかったが、さらに fr. C を分画した fr. 4-14 からは Rf 値の異なる 3 種の陽性反応が検出された。そのうちドラーゲンドルフ試薬に強い陽性反応を示した fr. 9 に対し分離、精製操作を行い、5 種の化合物 (1-5) を単離した。NMR 解析の結果、化合物 1-4 はフラボノイド誘導体と考えられ、各種データと文献値との比較により化合物 1 は eriodictyol-7-*O*-glucoside<sup>9)</sup>、化合物 2 は luteolin 8-*C*-β-[6-deoxy-2-*O*-(α-L-rhamnopyranosyl)-xylo-hexopyranos-3-uloside]<sup>3)</sup> とそれぞれ同定された (Figure 1)。また、化合物 3 及び 4 については、化合物 1 及び 2 の類縁体と推定され、現在詳細な構造解析を行っている。

また、単離した化合物群を TLC 上においてドラーゲンドルフ試薬で確認したところ、化合物 5 のみが陽性反応を示した。本化合物は<sup>1</sup>H-NMR において、脂肪族関連化合物と推定されたが、微量であったため、今回の検討では構造決定に到らなかった。

### D. 考察

ダミアナに含まれるドラーゲンドルフ試薬陽性のスポットは、精製段階の向上に伴い、明確になってきていることから、その存在は微量であることが示唆された。また、fr. A 及び B は現状では陽性反応を示していないが、今後継続的に精製を行うことにより、陽性反応を示すことも想像される。さらにアルカロイドの存在が示唆されている fr. C の分画 fr. 4-14 の内、ドラーゲンドルフ試薬に強い陽性反応を示した fr. 9 について陽性成分の精製を行った。この結果、得られた化合物は<sup>1</sup>H-NMR データより、脂肪族関連化合物と推測された。比較対照として、オレイン酸等、数種の既

知脂肪酸標準品についてドラーゲンドルフ試薬で確認したところ、陽性反応を示すものは存在しなかった。以上のことからドラーゲンドルフ試薬に陽性反応を示す成分はアルカロイド系脂肪酸関連化合物の可能性が示唆された。また、ドラーゲンドルフ試薬には偽陽性反応を示す化合物の存在も報告されていることから<sup>4)</sup>、真偽も含めて検討を行う必要があるものと考えられる。

#### E. 結論

専ら医薬品として使用される成分本質（原料）の有効性及び安全性等の評価に関する研究より、詳細な成分検索が必要と判断がなされたダミアナの含有成分を明らかにすることを目的とし、成分研究に着手した。この結果、分画の一部にドラーゲンドルフ試薬に陽性反応を示す呈色スポットが確認され、アルカロイド系化合物の存在を示唆された。そこでドラーゲンドルフ試薬陽性成分の精製を試み、得られた化合物はアルカロイド系脂肪酸関連化合物の可能性が示唆された。また、他に4種のフラボノイド誘導体1-4を単離した。

今後はこれら呈色成分の構造を決定すると共に、未着手の画分に関しても同様の手法を用い、単離、精製を行う予定である。また幻覚性成分の存在が確認された場合、指定医薬品として収載すべきであるかの判断に関しても検討する必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### 参考文献

- 1) 専ら医薬品として使用される成分本質の有効性及び安全性等の評価に対する研究。平成 17 年度 総括・分担研究報告書、P179
- 2) Kumar S, Taneja R, Sharma A, J Med Food, **9**(2), 254-260 (2006)
- 3) Zhao J, Pawar RS, Ali Z, Khan IA, J Nat Prod., **70**(2), 289-292 (2007)
- 4) Furgiuele AR, Farnsworth NR, Buckley JP, J. Pharm. Sci., **51**(12), 1156-1162 (2006); Akaike S, Sumino M, Sekine T, Seo S, Kimura N, Ikegami F, Chem. Pharm. Bull., **51**(2), 197-199 (2003)
- 5) Zhang YJ, Abe T, Yang CR, Kouno I, Chem. Pharm. Bull., **50**(6), 841-843 (2002)



***Turnera diffusa* (400 g)**

extracted with hot MeOH

**MeOH ext. (92.4 g)**

Activated charcoal filtration eluted with MeOH: CHCl<sub>3</sub>= 1: 0 ~ 0: 1

fr. A (48.1 g)

fr. B (7.7 g)

fr. C (11.1 g)

fr. D (0.8 g)

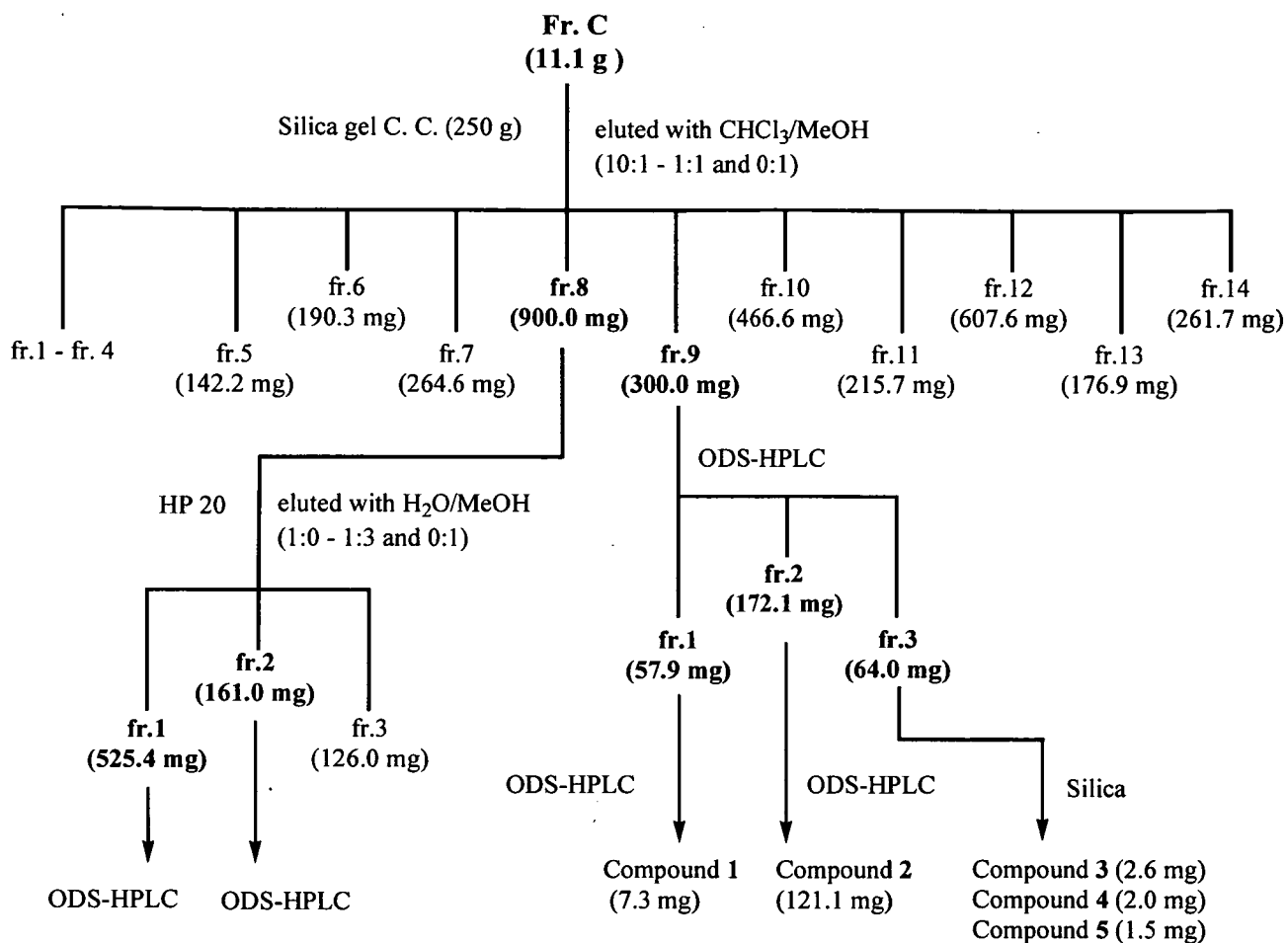
**1) fr. C (11.1 g)**

- 1) Silica gel column eluted with CHCl<sub>3</sub>: MeOH= 1: 0 ~ 0:1
- 2) Dragendorff's reagent is used to detect the presence of alkaloid

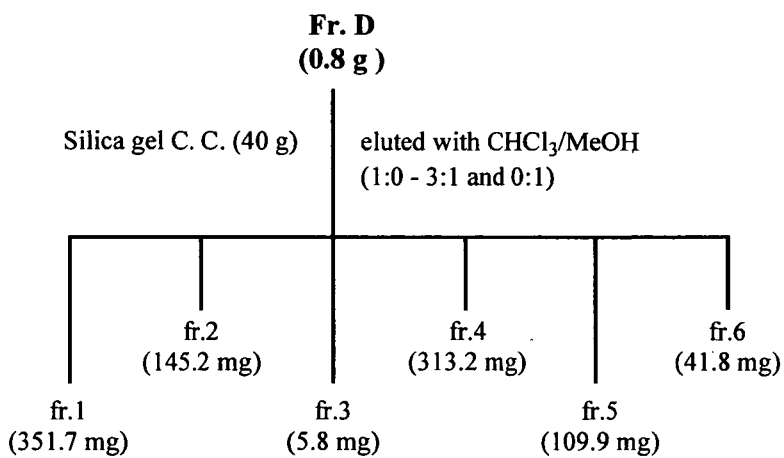
**2) fr. D (0.8 g)**

- 1) Silica gel column eluted with CHCl<sub>3</sub>: MeOH= 1: 0 ~ 0:1
- 2) Dragendorff's reagent is used to detect the presence of alkaloid

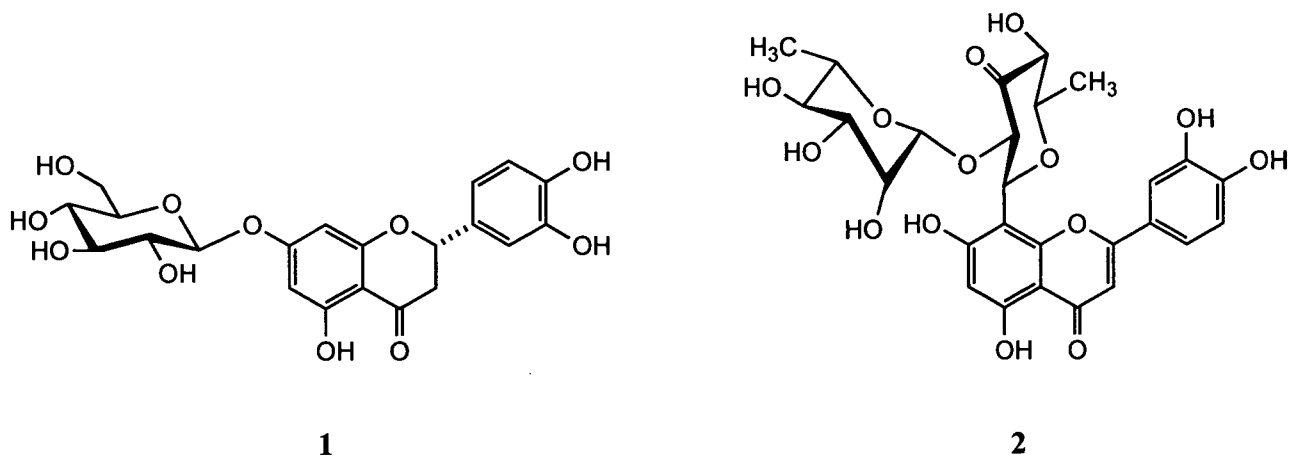
**Chart 1.** Procedures for extraction of the dried aerial parts of *T. diffusa*



**Chart 2.** Procedures for separation and isolation of fr. C



**Chart 3.** Procedures for separation of fr. D



**Figure 1. Structure of compounds 1 and 2**

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 専ら医薬品の規制範囲と見直しに関する研究

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 川原 信夫 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

—「いわゆる健康食品」から分離された未知化合物の構造研究—

千葉県において強壯を謳った「いわゆる健康食品」から検出された未知化合物について、各種 NMR 測定による構造解析を行い、その構造を決定した。本化合物は当該製品に含有されているコショウ科植物、キンマの主要成分である demethyleugenol と決定された。

A. 研究目的

近年、強壯を謳う「いわゆる健康食品」より多数の ED 治療薬類似化合物が検出され、社会的な問題になってきている。平成 19 年度、千葉県における買い上げ調査により、「いわゆる健康食品」から 2 種の化合物が検出され、LC-MS 分析の結果、これらのうち 1 種はそれぞれ人工甘味料であるアスパルテームと同定された。しかし、残り 1 種の化合物は HPLC 分析において、現在までに検出された医薬品類似化合物とは全く異なる保持時間を示す未知成分であった。本未知成分の構造解析について、千葉県衛生研究所より厚生労働省を通じて、国立医薬品食品衛生研究所生薬部に協力依頼があった。

当該製品の名称には、キンマ加工食品と記載されていた。キンマ（蒟醬 *Piper betle* L.）はコショウ科コショウ属の蔓性の常緑多年草で、ハート型のつやのある葉に白い花をつける。マレーシア、インド、インドネシア、スリランカ等の東南アジア諸国に自生している。

本研究では、「専ら医薬品」の安全性評価の一環として、「いわゆる健康食品」から検出された未知化合物について、各種 NMR 測定による構造解析を行い、その構造を決定したので報告する。

B. 研究方法

試料及び試薬

千葉県衛生研究所において分離、精製された未知成分（化合物 1）を試料として用いた。NMR 溶媒は重メタノール（CD<sub>3</sub>OD）99.96%（Isotec 製）を用いた。本研究において、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

装置

NMR 装置は JNM-ECA 800（日本電子製）を用い、<sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C-NMR のケミカルシフト値はテトラメチルシランに対する δ 値（ppm）で示した。構造未知化合物を CD<sub>3</sub>OD 99.96%に溶解し、<sup>1</sup>H-NMR（800 MHz）、<sup>13</sup>C-NMR（200 MHz）、COSY（<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 2D 相関）、

HMQC ( $^1\text{H}$  観測  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  2D 隣接相関) 及び HMBC ( $^1\text{H}$  観測  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  2D 遠隔相関) 等のスペクトル測定を行った。なお、単離された化合物の  $^1\text{H}$ -NMR 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR のデータの帰属は、ケミカルシフト値、上記各種相関 NMR のデータによって行った。

### C. 研究結果

化合物 1 は、GC-MS における測定結果から分子量 150 が得られ、 $^{13}\text{C}$ -NMR データにおける 9 本のシグナルより分子式  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$  が推定された。

1 の  $^1\text{H}$ -NMR において d 6.65 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), d 6.59 (1H, d,  $J=1.8$  Hz) 及び d 6.47 (1H, dd,  $J=7.8, 1.8$  Hz) より 1, 2, 4 置換ベンゼン環の存在が示唆された。さらに d 3.20 (2H, d,  $J=6.4$  Hz), d 4.97 (1H, dd,  $J=10.1, 0.9$  Hz), d 5.01 (1H, dd,  $J=17.0, 0.9$  Hz), d 5.90 (1H, ddt,  $J=17.0, 10.1, 6.4$  Hz) よりベンゼン環に結合した 2-プロペニル基 (アリル基) に特徴的なシグナルパターンが観測された。

一方、 $^{13}\text{C}$ -NMR において観測された 2 つの芳香族炭素 (d 146.2 及び d 144.5) のシグナルより、1 は 2 つの水酸基を有するアリルベンゼン誘導体と推定された。さらに HMBC スペクトル解析の結果、1 の構造を最終的に demethyleugenol と決定した (Fig. 1, 2)。

本化合物は既にキンマの主要成分として分離報告がなされている<sup>1)</sup>。

### D. 考察

1 はキンマに含有されるフェニルプロパノイド誘導体であり、他に本植物より chavicol, estragole, eugenol, methyleugenol 等、多種のアリルベンゼン系化合物が報告されている。従って今回、本化合物がキンマを含有した「いわゆる

健康食品」から検出されたことは、本製品中にキンマエキスが含有されている間接的な証明となりうると考えられる。

しかしながら近年、製造販売業者が摘発の目を逃れるために監視体制が強化されている医薬品成分並びに主要 ED 治療薬等を添加せず、それらの化合物の一部を化学変換させた類縁化合物を意図的に添加し、流通させる事例が全国各地で増加しており、さらなる監視体制の強化、確立が重要であると考えられた。

### E. 結論

千葉県において強壯を謳った「いわゆる健康食品」から検出された未知化合物について、各種 NMR 測定による構造解析を行い、その構造を決定した。本化合物は当該製品に含有されているコショウ科植物、キンマの主要成分である demethyleugenol と決定された。

### F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### H. 知的所有権の取得状況

1. 取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

3. その他

なし

参考文献

- 1) Hwang, L. S., Wang, C. K., Sheu, M. J., Kao, L. S., 1993. *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*. American Chemical Society, Washington D. C., pp. 186-191.

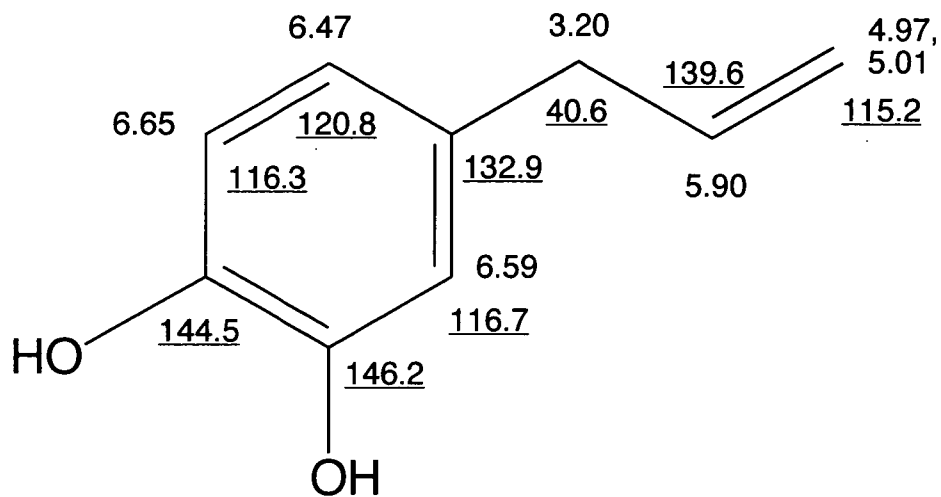


Fig. 1  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

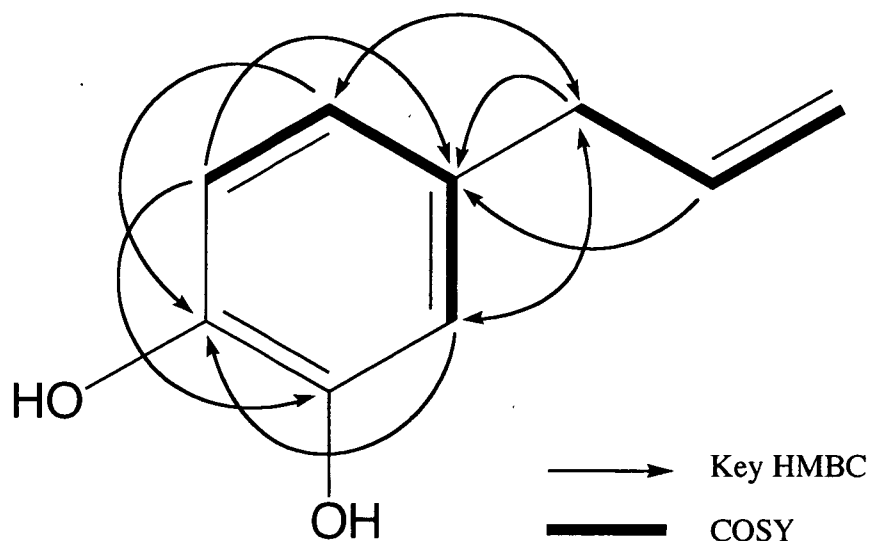


Fig. 2  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  and Long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations of compound 1

分担研究課題 専ら医薬品の規制範囲と成分に関する研究

分担研究者 大塚 英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨 営実は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と判断されたが、輸入品は寫下活性が弱いとの情報があり、現在市場にある営実（エイジツ）の評価を行った（第一部）。また、医薬品としての使用実態に乏しく、含有成分等からも食薬区分の見直し対象となる可能性があるが、ptaquiloside 分解物を含むため、最終的に、引き続き調査が必要と判断された鳳尾草（ホウピソウ、別名イノモトソウ）の成分研究を行った（第二部）。

研究協力者

広島大学 講師 松浪勝義  
広島大学 助教 末吉恵津子  
広島大学 助教 Liva Harinantenaina

第一部 営実

A. 研究目的

エイジツ（営実）は日本薬局方に収載されており、本品はバラ科植物ノイバラ *Rosa multiflora* Thunberg (= *Rosa polyantha* Sieb. et Zucc.) の偽果又は果実と規定されている。落葉性の小形低木で枝には鋭いとげがあり、盛んに分枝し繁る。葉は楕円形で奇数羽状複葉であり円錐花序に白色の花をつける。偽果は小さい球形で外面は赤～暗褐色、内部に堅果がある。

神農本草経の上品には営實として収録され、その薬能は「瘍疽、悪瘡、結肉、跌筋、云々

を主どる」とされている。

基原植物ノイバラ(バラ科)は日本全土および中国、朝鮮に分布しており、現在日本産、中国産、韓国産、北朝鮮産が市場に出回っており、年間約20トンが輸入されている。薬効として強下剤として用いられ、利尿作用を有するため関節痛、筋肉痛、腎臓病また癰疽、悪瘡などに用いられている。ケンフェロール、クエルセチンをアグリコンとするフラボノイド配糖体、ムルチフロリン類が薬効本体と考えられている。

また TLC、HPLC のパターンは日本産と北朝鮮産の営実は一部類似してはいるが明らかに異なるパターンを示している。現在北朝鮮より輸入されている営実は寫下活性が弱いとの製薬企業からの情報もあり、市場品を用いて比較検討を行った。

B. 研究方法

日本産、韓国産2種、北朝鮮産、中国産



2種、営実の購入、日本で採集などにより資料の収集を行う。日本産営実より標準となる物質を精製する。各地産営実は MeOH で抽出し、マグネシウム塩酸反応、TLC、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等を用いて分析する。

### C. 研究結果

日本産営実より各種クロマトグラフィーを用いて分離精製を行ない標準となる計4種のフラボノイド配糖体を得た（図 1）。化合物 1 から 8 は既知化合物であり、文献値および独立にその構造を決定した。

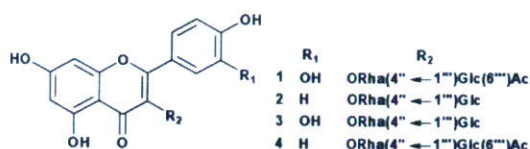
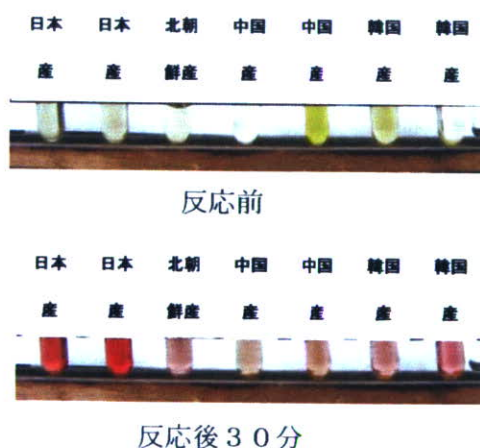


図 1 Multiflorin 類 (1:multiflorin A; 2:multiflorin B; 3:multinoside A; 4:multinoside A acetate.)

#### 1. マグネシウム塩酸反応

第15改正日本薬局方営実の確認試験に従って、各産地の営実 1.00g を粉砕してメタノール 20ml で2分間還流抽出、抽出液の 5ml に対して金属マグネシウム 0.5g および濃塩酸を 0.5ml 加えた。

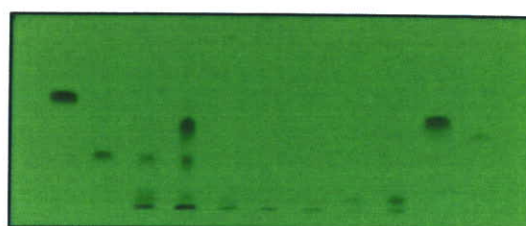


### 2. TLC および HPLC での確認

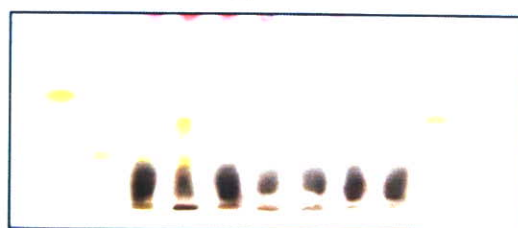
次いで、予め単離構造を確認した標品を使って TLC 及び HPLC で確認することとした。各産地の営実 3.00g を 80ml のメタノールで1時間還流抽出を3回行った。合したエキスはろ過濃縮して 50ml に定容し用いた。

#### A. TLC 法

シリカゲルプレート（Merck Silica gel F254）にてCHCl<sub>3</sub>・MeOH・H<sub>2</sub>Oで展開した。



左から multiflorin A、multinoside A、日本産 A、日本産 B（広島県呉市で採集）、北朝鮮産、中国産 A、中国産 B、韓国産 A、韓国産 B、multinoside A、mutiflorin B。紫外線 254nm を照射。

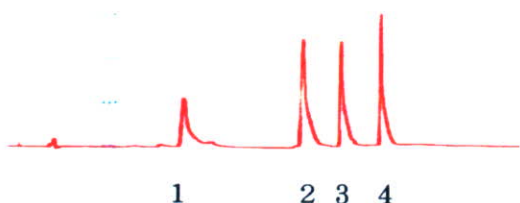


左から multiflorin A、multinoside A、日本産 A、日本産 B、北朝鮮産、中国産 A、中国産 B、韓国産 A、韓国産 B、multinoside A、mutiflorin B。10%硫酸を噴霧後、200℃に加熱。

#### B. HPLC 法

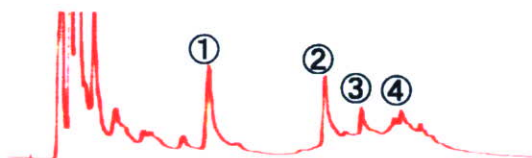
HPLC は東ソー社製 TSK gel ODS-120T（内径 4.6mm、長さ 250mm）を用いた。

溶媒は0~20分は18%水性アセトニトリル+0.05%磷酸を用いた。その後20分かけて30%水性アセトニトリル+0.05%磷酸まで直線的に濃度勾配をかけ、その後更に20分同溶媒を送液した。流速は1ml/minとし検出は紫外外部吸収280nmで行った。  
標準品のHPLCプロファイルを示す。

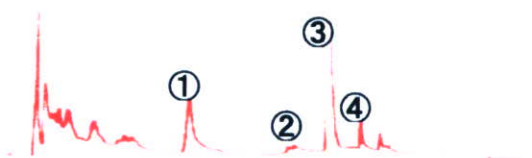


1: multinoside A (保持時間 20 min), 2: multiflorin B (保持時間 35 min), 3: multinoside A acetate (保持時間 39 min), 4: multiflorin A (保持時間 44 min)

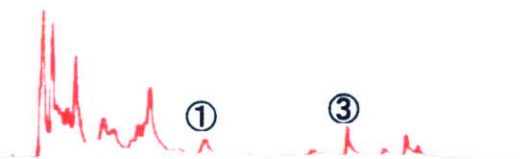
50 ml に定容した、各エキスを 25  $\mu$ l 用いて分析を行った。



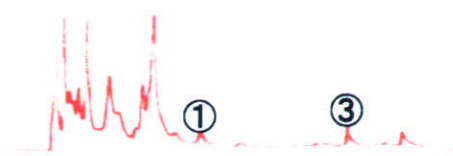
日本産 A



日本産 B



韓国産 A



韓国産 B



中国産 A



中国産 B



#### D. 考察

これまで鋭意努力して、北朝鮮産営実より、薬効本体と考えられているケンフェロール、クエルセチンをアグリコンとするフラボノイド配糖体、マルチフロリン類の単離を試みたが、単離できていない。これは分離技術が未熟なのではなくて、それが入っていないか、存在しても極微量であるためと考えられた。

マグネシウム塩酸反応はフラボノイドの定色反応であるので、ここで明らかのように、日本産営実の抽出液は赤色に呈色したにも拘わらず北朝鮮産、中国産は発色が劣り、フラボノイド含量の低さを物語っている。薄層分析でも同様であり、日本産以外では  
1:multiflorin A; 2:multiflorin B;

3:multinoside A; 4:multinoside A acetate  
のスポットが見られていない。  
同様な結果が TLC 分析、HPLC 分析において得られた。

#### E. 結論

ノイバラの近縁種にテリハノバラが *Rosa wichuraiana* Crepin があり、それにはマルチフロリン類が含有されていないという報告がある [*Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2080 (1992)]。本種は日本では本州以南、中国東部、朝鮮半島に分布しており、北朝鮮産が本種である可能性がある。今後植物遺伝学的考察も必要であるが、製品の品質は TLC で簡便に分析できることが確認された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Chemical evaluation of Rosae Fructus and constituents in Rosae Fructus of

foreign origins

Susumu Kawakami, Katsuyoshi  
Matsunami, Hideaki Otsuka:

*Journal of Natural Medicines* 投稿予定

##### 2. 学会発表等

川上 晋 修士論文発表会

生薬の品質評価に関する研究 ～営実について～

2008年2月5日、講演要旨集25頁

#### G. 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

## 第2部 鳳尾草

### A. 研究目的

鳳尾草の基原植物はイノモトソウ科のイノモトソウ (*Pteris multifida*) (写真1) で葉先が鳳凰の尾の形 (写真2) に似ているのがその名の由来である。鳳尾草は医薬品としての使用実態に乏しく、含有成分等からも食薬区分の見直し対象となる可能性があるが、発がん性のある ptaquiloside の分解物を含むことが知られており、引き続き調査が必要と判断された品目である。台湾では鳳尾草の入った茶を苦茶と称して、疲労回復、便秘、睡眠不足、美肌、ほてりを冷ますなどとして利用されている。イノモトソウ科植物には食用となるワラビも含まれている。ワラビには発がん性成分として ptaquiloside を含有しており、必ず灰汁抜きをして食することになっている。また、イノモトソウという名を冠した植物にオオバイノモトソウ (*Pteris cretica*) (写真3) とリュウキュウイノモトソウ (*Pteris ryukyuensis*) (写真4) があるのであわせて成分研究を遂行することとした。

### B. 研究方法

鳳尾草は市場で調達するのは困難であると判断したため、広島県呉市にて採集した。粉碎した地上部 (800 g) をメタノールで抽出し、抽出液を濃縮乾固して残渣 133 g を得た。本残渣を水に懸濁して、EtOAc で分配、さらに 1-BuOH で分配して 1-BuOH 可溶画分を得た (26.8 g)。本 1-BuOH 可溶画分を順相シリカゲル、逆相中圧シリカゲル、逆相 HPLC で分画、精製を行った。得られた化合物は各種スペクトル分析を行い構造決定するとともに、KB 細胞を用いて細胞

毒性のアッセイを行った。

### C. 研究結果

化合物 3 ~ 14 は既知化合物であり、それぞれ  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucopyranoside (3)、apigenin 7-O  $\beta$ -D-glucopyranoside (4)、luteoli 7-O  $\beta$ -D-glucopyranoside (5)、sucrose (6)、caffeic acid (7)、pterosin C 3-O  $\beta$ -D-glucopyranoside (8)、pteroside C (9)、4,5-dicaffeoyl quinic acid (10)、pteroside A (11)、wallichioside (12) および (2R and 2S)-5,7,3',7'-terahydroxyflavanones (13, 14) と同定した。

化合物 1 はセスキテルペン誘導体、pterosin L の 3-O  $\beta$ -D-glucopyranoside であった。この構造は別紙に示す HMBC スペクトルの結果でも支持された。

化合物 2 は quinic acid の誘導体であった。即ち quinic acid の 3 位の水酸基がメトキシ基になり、4 位に caffeic acid がエステル結合した別紙に示す構造を有していた。

Table 1. Cytotoxicity (IC<sub>50</sub> in  $\mu$ M) of compounds 1, 2 and 8-12 against human cancer cell line (KB cells) *in vitro*

化合物	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	12.3
2	24.7
8	2.35
9	22.9
10	5.38
11	18.8
12	28.3