

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

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

協力研究者 熊坂 謙一 神奈川県衛生研究所主任研究員

「いわゆる健康食品」から分離された抗勃起不全 (ED)化合物  
キサントアントラフィルの分析及び構造研究

要旨 神奈川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、TLC、HPLC、LC-MS及びNMR測定による分析及び構造解析を行った。その結果、本化合物は過去に藤沢薬品工業(現アステラス製薬)により抗ED作用を有する新規化合物として開発され、論文発表されたFR226807であり、その構造からキサントアントラフィルと命名された。同時に本化合物は、平成18年5月に「専ら医薬品として使用される成分本質」として新規収載され、厚生労働省並びに神奈川県から報道発表された。

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17年度、神奈川県における買い上げ調査において、「いわゆる健康食品」より、既知のED治療薬成分及びその類似化合物とは、HPLC保持時間及びLC-MSスペクトル等が一致しない未知化合物が検出された。そのため、神奈川県衛生研究所より国立医薬品食品衛生研究所生薬部に協力を依頼し、共同で本未知化合物の構造解析を行った。

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、新たに「専ら医薬品として使用される成分本質」に収載された新規抗ED化合物、キサントアントラフィルについて、HPLC、LC-MS、NMRを始めとした各種分析により、光学活性を含めた構造解析を行い、その含量を定量したので報告する。

B. 研究方法

試料及び試薬

試料はインターネットを介して購入されたいわゆる健康食品である。NMR溶媒はクロロホルム(CDCl<sub>3</sub>、Isotec製)を用いた。FR226807標準品はアステラス製

薬株式会社より提供された。その他の試薬類は和光純薬工業製を使用した。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。

試料溶液の調製

検体カプセル内容物についてメタノール抽出により試料溶液を調製した。

TLC

薄層板としてHPTLC silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck製)、展開溶媒に酢酸エチル/メタノール/強アンモニア水混液(9:1:0.1)を用いた。

HPLC

装置としてAlliance 2695及び2996PDA検出器(Waters製)を使用した。カラムはUnison US-C18(150mm×4.6mmφ、インタクト製)、移動相は0.02mol/mL酢酸アンモニウム(pH4)及びアセトニトリルのグラジエント送液(流量1.0mL/min)とした。PDA検出器の波長はUV210-600nmとした。

LC-MS

装置としてAgilent 1100HPLC(Agilent製)及びQtrap LC/MS/MS system(Applied Biosystems製)を使用した。カラムはCadenza CD-C18(150mm×2mmφ、インタクト製)、移動相は0.01mol/L酢酸アンモニウム(pH4)/アセ

トニトリルのグラジェント送液 (流量 0.2 mL/min) とし、イオンソースは ESI、スキャンモードは EMS、極性はポジティブ及びネガティブとした。

#### 精密質量測定

濃縮した試料溶液について、直接導入法により精密質量測定を行った。装置は GCmate II (日本電子製)、イオンソースは EI、昇温条件は 100°C~250°C、分解能は 5000 とし、キャリブレーターには PFK を用いた。

#### NMR

HPLC 分取により精製、濃縮した試料について分析を実施した。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  $\delta$  値 (ppm) で示した。本未知化合物を CDCl<sub>3</sub> 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 (<sup>1</sup>H 観測 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 2D 隣接相関) 及び HMBC (<sup>1</sup>H 観測 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>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 <sup>1</sup>H-NMR 及び <sup>13</sup>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。

#### 旋光度測定

検体より単離した未知化合物及び FR226807 標準品について、クロロホルムに溶解して旋光度を測定した。装置として P-1020 旋光度計 (日本分光製) を使用し、光源にはナトリウムランプを使用した。

#### 定量

試料溶液及び FR226807 を標準品として調製した標準溶液について、HPLC 法により分析した。なお、移動相は 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH4.0)/アセトニトリル混液 (65:35) とし、検出波長は UV 390nm とした。

### C. 研究結果

試料溶液を分析した結果、TLC では可視光下 Rf 値 0.65 に黄色スポットが検出された。また、HPLC 分析では保持時間 18.4 分に UV 391nm 付近に特徴的な極大を有するピークが検出された (Fig.1)。シルデナフィル、バルデナフィル及びタダラフィルといった既知医薬品成分及びその類似化合物では、現在のところ可視光下にて有色スポットを示すものは無く、また、HPLC ピークの UV スペクトルが一致するものもない。そのため、本未知化合物は過去に検出事例が無い化合物である可能性が示唆された。LC-MS の測定結果では保持時間

14.0 分にピークを認めた。そのピークのマススペクトルにおいて、ポジティブモードでは  $m/z$  428、151 等、ネガティブモードでは、 $m/z$  388 等のイオンピークが測定された (Fig.2)。このうち、 $m/z$  428 は  $[M+K]^+$ 、 $m/z$  388 は  $[M-H]^-$  と推定されたことから、本ピーク成分の分子量は 389 であると考えられた。本分子量はタダラフィルと同一であるが、上記の分析では、タダラフィルと異なった結果となっている。また、本未知成分の精密質量を測定した結果、 $m/z$  389.1594 ( $M^+$ ) が得られ、誤差範囲 3 milli amu 以内、窒素ルール等を適用した結果、分子式 C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 及び C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> が推定された。次に NMR により本未知化合物の構造について各種測定を行った。<sup>1</sup>H-NMR において、 $\delta$  3.89 (3H, s) 及び  $\delta$  3.90 (3H, s) より二つのメキシ基、 $\delta$  1.31 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz) より 2 級メチル基、 $\delta$  6.77 (d,  $J = 9.6$  Hz), 8.15 (dd,  $J = 2.3, 9.6$  Hz), 8.31 (d,  $J = 2.3$  Hz)、及び  $\delta$  6.87 (d,  $J = 7.8$  Hz), 6.89 (d,  $J = 2.3$  Hz), 6.91 (dd,  $J = 2.3, 7.8$  Hz) より二つの 1,2,4 置換ベンゼン環を含む 20 個のプロトンが観測された。また、 $\delta$  6.48 (br s) 及び  $\delta$  8.90 (br d,  $J = 7.7$  Hz) に、アミノプロトンと考えられる特徴的なシグナルが観測された。<sup>13</sup>C-NMR では、二つのメキシ基、メチル基及び酸素原子に結合した炭素 ( $\delta$  66.2) を含む 2 つのメチレン、7 つのメチン及びカルボニル基 ( $\delta$  167.8) を含む 19 個の炭素が観測された。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 及び HMQC スペクトルでは 2 つのメキシ基及びカルボニル基に加え、4 つの部分構造の存在が明らかになった (Fig. 3A-D)。これらの相関は HMBC スペクトルにより決定した (Fig. 3)。以上の結果より、本未知化合物は Fig. 4 に示すとおり、*N*-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-(1-hydroxypropan-2-ylamino)-5-nitrobenzamide と決定した。<sup>1</sup>H- 及び <sup>13</sup>C-NMR シグナルを Table 1 に示す。本構造の分子式 C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> は上記精密質量の測定結果と一致した。本化合物について文献検索を行ったところ、その平面構造は藤沢薬品工株式会社 (現アステラス製薬株式会社) により開発された、PDE-5 阻害作用を有する化合物 FR226807 であることが確認された<sup>1)</sup>。その <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR 測定結果は、本化合物の結果と一致した。また、FR226807 は不斉炭素を 1 つ有する光学活性体であるため、製品より単離された本成分および FR226807 標準品について旋光度を測定した。その結果、両者の旋光度はほぼ一致した。よって、検体より検出された未知化合物は FR226807 と同一の R 体、即ち

FR226807であることが判明した。なお、製品1カプセル当たりの本化合物含量は、約31mgであった。

#### D. 考察

本成分は、製薬会社によりPDE-5阻害作用を有する化合物であることが報告されているものの<sup>1)</sup>、その後、医薬品としての販売、流通は無い。現在までの強壮・強精を謳った「いわゆる健康食品」より検出される医薬品成分は、シルденаフィル、タダラフィル等の既存医薬品成分及びその類似化合物であったが、今回の検出事例は、開発中の新薬（あるいは開発が中断された化合物）が検出された、初の事例となった。このことは、このような製品への添加成分として、既知の医薬品成分等だけでなく、論文等でのみ報告されたPDE-5阻害化合物も対象となっていること示しており、今後、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

神奈川県において強壮を謳った「いわゆる健康食品」から検出された新規抗ED化合物について、HPLC、LC-MS及び各種NMR測定をはじめとして、その立体異性を含めた構造解析を行い、また含量を定量した。本化合物は分子中にアントラニル酸構造を有し、その色調が黄色であったことから、アステラス製薬の同意のもとで「キサントアントラフィル」と一般名として新たに命名された。なお、今回、検体より検出された化合物は(R)-キサントアントラフィルとなる。

#### 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な

い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kenichi Kumasaka, Nobuo Kawahara, Kayo Doi, Takashi Kojima, Yukihiro Goda: Determination of (R)-Xanthoanthrafil, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, in a Dietary Supplement Promoted for Sexual Enhancement, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **56** (2), 227-230, (2008)

##### 2. 学会発表

- 1) 熊坂謙一、土井佳代、小島尚、川原信夫、合田幸広:いわゆる健康食品より検出されたキサントアントラフィルの分析事例 日本薬学会第127年会(2007年3月、富山)

#### 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) Hosogai N. et al., FR226807: A Potent and Selective Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor. *Eur J Pharmacol*, **428** (2), 295-302, (2001)

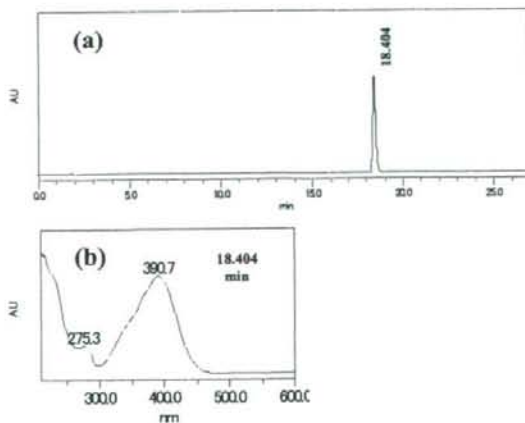


Fig. 1. HPLC chromatogram of the sample solution and the UV Spectrum of the detected peak. Representative chromatogram of the sample solution monitored at UV 254 nm (a). The UV spectrum is obtained by PDA slicing from the detected peak of the sample solution (b).

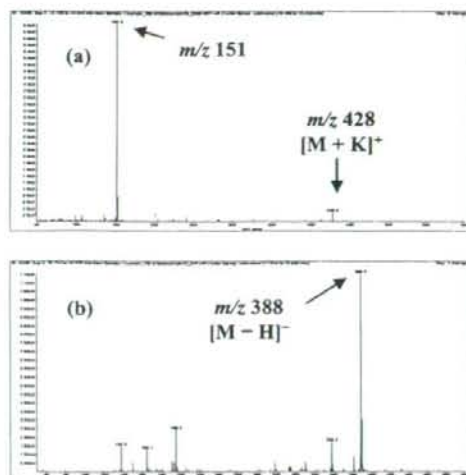


Fig. 2. Mass spectra of the detected peak by Qtrap LC/MS/MS analysis. Positive (a) and negative (b) EMS scans

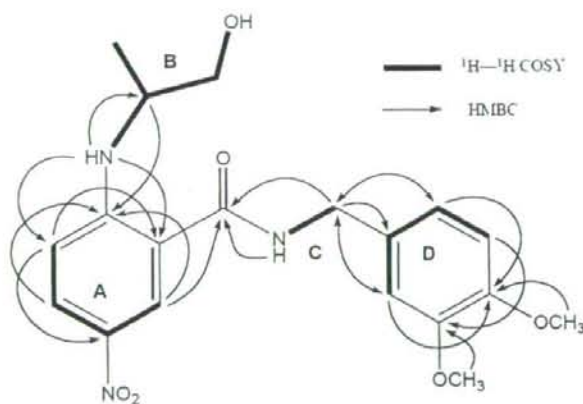


Fig. 3.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and major long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations of the unknown compound.

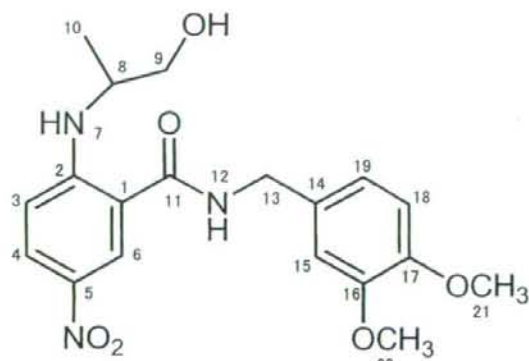


Fig. 4. Structure of xanthoanthrafil.

Table 1  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts of the unknown compound

Position	$^1\text{H}^{(a)}$	$^{13}\text{C}^{(b)}$
1		113.2
2		153.9
3	6.77 d (9.6)	111.2
4	8.15 dd (2.3, 9.6)	128.8
5		135.4
6	8.31 d (2.3)	124.7
7	8.90 br d (7.7)	
8	3.84 m	50.0
9 (a)	3.69 br dd (5.5, 10.6)	66.2
(b)	3.78 br d (10.6)	
10 (3H)	1.31 d (6.9)	17.1
11		167.8
12	6.48 br s	43.9
13 (2H)	4.53 m	129.8
14		129.8
15	6.89 d (2.3)	111.3
16		149.3
17		148.8
18	6.87 d (7.8)	111.4
19	6.91 dd (2.3, 7.8)	120.4
20 (3H)	3.90 s	56.0
21 (3H)	3.89 s	56.0

(a)  $J$  values (in Hz) in parentheses. (b) Assignments were made from the HMQC spectrum.

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

研究分担者 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  
研究協力者 長谷川貴志 千葉県衛生研究所医薬品研究科

「いわゆる健康食品」から分離された勃起不全 (ED) 治療薬類似化合物  
シクロペンチナフィル及び*N*-オクチルノルタダフィルの構造研究

強壯効果を謳った「いわゆる健康食品」から、新規シルデナフィル（商品名バイアグラ）類似化合物であるシクロペンチナフィルと新規タダフィル（商品名シアリス、国内未承認）類似化合物である *N*-オクチルノルタダフィルを単離し、HPLC-PDA、LC-ESI-MS、高分解能 MS、各種 NMR、CD スペクトルによる構造解析を行い、その絶対立体配置を含めた構造を決定した。その結果、両化合物は 5-[2-ethoxy-5-(4-cyclopentylpiperazin-1-ylsulfonyl)phenyl]-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one 及び (6*R*,12*aR*)-2-octyl-6-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-*b*]indol-1,4-dione と決定された。近年、健康食品から多くの PDE-5 阻害薬やその誘導体が検出されているが、両化合物は、「いわゆる健康食品」からは国内外を通じて初めて検出された成分であり、かつ文献未記載の新規化合物であった。また、シクロペンチナフィル及び *N*-オクチルノルタダフィルについて定量試験を行ったところ、それぞれ 130 mg/錠 (301 µg/mg) 及び 27 mg/錠 (64.1 µg/mg) であった。なお、これらの化合物の発見については、平成 20 年 6 月 11 日、厚生労働省並びに千葉県より同時に報道発表され、両化合物は「専ら医薬品」として指定されることとなった。

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

A. 研究目的

近年、消費者の健康意識の高まりとともに、「いわゆる健康食品」の消費が増加している。これらの商品の中には、効果をより高めようと医薬品成分が添加される事例も報告されており、強壯

効果を謳った「いわゆる健康食品」からは ED 治療薬であるシルデナフィル、タダフィル (Fig. 1) 及びバルデナフィルの検出事例が報告されている<sup>1-3)</sup>。また、これらの製品を摂取することによる健康被害も懸念される。

筆者らは以前、新規 ED 治療薬類似化合物としてタダフィルの合成前駆体<sup>4)</sup>であるクロロプレタダフィルの検出事例について報告したが<sup>5)</sup>、

今までに数多くのシルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィルの類縁化合物の報告がなされている<sup>6-23)</sup>。さらに、近年、全く新しい骨格を有し、PDE-5 阻害作用を有するアントラニル酸誘導体のキサントアントラフィル<sup>24)</sup>やイミダゾキナゾリン誘導体のチオキナピペリフィル<sup>25)</sup>の検出事例も報告されている。キサントアントラフィルは藤沢薬品工業株式会社 (現アステラス製薬株式会社) で ED 治療の治験薬 (FR226807) として合成された化合物であり PDE-5 阻害作用が報告されているが<sup>26)</sup>、現在は医薬品としての開発は中止されている。また、チオキナピペリフィルは協和発酵工業株式会社で KF31327 として合成された成分であり、シルデナフィルより選択性の高い PDE-5 阻害活性を持つことが報告されている<sup>27-29)</sup>。

千葉県では違法に医薬品成分を添加した「いわゆる健康食品」による健康被害を未然に防止するため試買検査を行っているが、平成 19 年度に試買した製品より新規シルデナフィル類似化合物及び新規タダラフィル類似化合物が検出された。本研究では、両化合物について単離精製を行い、HPLC-PDA、LC-MS、高分解能 MS 測定、各種 NMR 測定、CD スペクトル測定による構造解析を行い、立体配置を含めた構造を決定したので報告する。

## B. 研究方法

### 試薬及び試液

アセトニトリルは HPLC 用 (和光純薬工業製) を用い、重クロロホルム (99.96%) 及び重メタノール (99.96%) は Isotec 製を、その他市販の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。

### 試料

「ハイパーウォルナップ 2」は、くるみ抽出物加工食品として販売されていた褐色の錠剤である。一箱四錠入りで販売されており、インターネットを通じて平成 19 年 12 月 28 日に購入した。

### 試験溶液の調製

錠剤を粉砕し、その粉末 100 mg に 70%メタノール 10 ml を加え 15 分間超音波抽出を行い、遠心した。その上澄液を 0.45  $\mu$ m メンブランフィルターでろ過し、HPLC 用試験溶液とした。また、HPLC 用試験溶液を 10 倍に希釈し、LC/MS 用試験溶液とした。

### HPLC 分析

機器には日本分光製 PU-2089 型ポンプ、同 CO-2065 型オープン、同 AS-2055 型オートサンプラー、同 MD-2015 型 PDA 検出器から構成される装置を用いた。測定条件は以下のとおり。

カラム : TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, 粒径 5  $\mu$ m, 東ソー製)、移動相 A : 5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有アセトニトリル/水/リン酸 (100:900:1) 混液、移動相 B : 5 mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有アセトニトリル/水/リン酸 (900:100:1) 混液、グラジエント条件 : 0 分 (A : B = 90 : 10)  $\rightarrow$  25 分 (A : B = 55 : 45)  $\rightarrow$  44-49 分 (A : B = 10 : 90)、流速 : 1.0 ml、注入量 : 20  $\mu$ L、カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C、検出波長 : 200-400 nm、モニター : マックスプロット (200-400 nm)

### LC-ESI-MS 分析

装置は Waters 製 2695 型セパレーションモジュール、同 ZQ4000 型質量分析計を用いた。測定条

件は以下のとおり。

カラム：Atlantis dC18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 粒径 3 μm, Waters 製)、移動相 A：0.1%ギ酸溶液、移動相 B：0.1%ギ酸含有アセトニトリル、グラジエント条件：0分 (A : B = 95 : 5) → 15分 (A : B = 80 : 20) → 30-35分 (A : B = 20 : 80)、流量：0.2 ml/min、注入量：10 μL、カラム温度：40℃、イオン化法：ESI ポジティブ及び ESI ネガティブ、キャピラリー電圧：3 kV、ソース温度：120℃、デソルベーション温度：350℃、コーンガス流量：50 l/hr、デソルベーション流量：600 l/hr、コーン電圧：30, 60 V (ESI ポジティブ)、-60V (ESI ネガティブ)、測定質量範囲：*m/z* 100-800

#### 単離・精製

試料粉末 300 mg を水 20 mL を加え、40 ml のジエチルエーテルで 3 回振とう抽出 (10 分間) した。ジエチルエーテル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで 1 時間脱水し、ろ紙でろ過を行った。そのろ液を蒸発乾固させ 3 mL のメタノールに再溶解し、遠心分離を行い上清と沈殿に分離した。その沈殿を減圧乾燥させ化合物 **1** (18.8 mg) を得た。また、上清をシリカゲル 60F<sub>254</sub>TLC プレートにスポットし、ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 (50 : 50 : 1) で展開し、UV 254 nm で検出した。次いで *R<sub>f</sub>* 値 0.39 部分を掻き取りメタノール 120 mL で抽出し、0.45 μm フィルターでろ過を行った。ろ液を蒸発乾固し、ジエチルエーテルで溶解し、その溶解液を減圧乾燥して化合物 **2** (4.4 mg) を得た。

#### 高分解能 MS 測定

装置は Thermo Fisher Scientific 製 LTQ Orbitrap XL を使い、ESI ポジティブの直接導入で測定した。装置条件は以下のとおり。

流速：5 μL/min、シーガス流量：20 arb、aux ガス流量：10 arb、スプレー電圧：5 kV、キャピラリー温度：275℃、キャピラリー電圧：4 V、チューブレレンズ電圧：60 V

#### NMR 測定

装置は ECA 800 (日本電子製) を用いた。化合物 **1** は重クロロホルム (99.96%) に、化合物 **2** は重メタノールに溶解させ、<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 (<sup>1</sup>H 観測 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 2D 隣接相関)、HMBC (<sup>1</sup>H 観測 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 2D 遠隔相関)、NOE (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>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 <sup>1</sup>H-NMR 及び <sup>13</sup>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。

#### CD スペクトル測定

装置は J-720 (日本分光製) を使い、セルは光路長 10 mm のものを用いた。化合物 **2** 及びタダラフィルはメタノールに溶解し、CD スペクトルを測定した。溶液の濃度は、それぞれ 0.041 及び 0.044 mmol/L であった。

#### PDE-5 結合予測実験

化合物 **1** 及び **2** の PDE-5 への結合モデルはコンフォメーションサーチシミュレーション (Mixed MCMM / Low Mod) を用い構築し、力場パラメータには AMBER を使用した。化合物 **1** 及び **2** の PDE-5 の結晶構造への結合モデルの計算には、それぞれ MacroModel (ver. 8.1) IUDT (PDB ID) 及び IUDU を用いた。

#### C. 研究結果及び考察

試験溶液を HPLC で分析したところ、20.9 分

(化合物 1) と 37.2 分 (化合物 2) にピークが確認された (Fig. 2A)。化合物 1 の UV スペクトル (極大吸収波長: 218 及び 290 nm) はシルデナフィルと非常によく類似していたが、その保持時間 (20.9 分) はシルデナフィル (18.3 分) とは異なっていた (Fig. 2B)。また、化合物 2 の UV スペクトル (極大吸収波長: 281 nm) はタダラフィルと非常によく類似していたが、その保持時間 (37.2 分) はタダラフィル (20.0 分) とは異なっていた (Fig. 2C)。さらに、LC-ESI-MS の結果から、化合物 1 はポジティブモードで  $m/z$  529 に  $[M+H]^+$  イオンと推定されるイオンピークが検出され、ネガティブモードで  $m/z$  527 に  $[M-H]^-$  イオンと推定されるイオンピークが検出された (Fig. 3A, 3B)。また、化合物 2 はポジティブモードで  $m/z$  488 に  $[M+H]^+$  イオンと推定されるイオンピークが検出され、ネガティブモードで  $m/z$  486 に  $[M-H]^-$  イオンと推定されるイオンピークが検出された (Fig. 3C, 3D)。

化合物 1 は無色の粉末であり、高分解能 MS の測定結果から  $m/z$  529.2590 (Calcd: 529.2597)  $[M+H]^+$  が得られ、分子式は  $C_{26}H_{36}N_6O_4S$  と推定された。また、 $^1H$ -NMR において 35 個のプロトンが観察され、 $\delta$  4.28 (3H, s) よりメチル基、 $\delta$  1.65 (3H, t,  $J=6.9$  Hz)、 $\delta$  4.37 (2H, q,  $J=6.9$  Hz) よりエトキシ基、 $\delta$  1.01 (3H, t,  $J=7.3$  Hz)、 $\delta$  1.86 (2H, sext,  $J=7.3$  Hz)、 $\delta$  2.92 (2H, t,  $J=7.3$  Hz) より *n*-プロピル基、 $\delta$  7.14 (1H, d,  $J=8.7$  Hz)、 $\delta$  7.83 (1H, dd,  $J=2.3, 8.7$  Hz)、 $\delta$  8.83 (1H, d,  $J=2.3$  Hz) より ABX タイプの芳香族プロトンの存在が示唆された。一方、 $^{13}C$ -NMR スペクトルから、3 つのメチルカーボン、1 つのアルコキシカーボン ( $\delta$  66.1) を含む 11 個のメチレンカーボン、3 つの芳香族カーボン ( $\delta$  113.0, 131.3 及び 131.8) を含む 4 つのメチンカ

ーボン、7 つの芳香族四級カーボン ( $\delta$  121.1, 124.5, 128.6, 138.4, 146.4, 147.0 及び 159.3)、カルボニルカーボン ( $\delta$  153.6) の存在が明らかとなった。基本的な構造はシルデナフィルと非常によく類似していたが、*N*-メチル基に由来するシグナルは観察されず、1 つのメチンプロトン  $\delta$  2.51 (1H, quint,  $J=7.6$  Hz) と  $\delta$  1.53 (2H, m)、1.63 (2H, m)、1.28 (2H, m)、1.83 (2H, m) にそれぞれ二組の等価なメチレンプロトンが観察された。 $^1H$ - $^1H$  COSY 及び HMQC からシクロペンチル基の存在が示唆された。また、HMBC から H-29 ( $\delta$  2.51) のメチンプロトンから C-25 ( $\delta$  51.2) 及び C-27 ( $\delta$  51.2) のメチレンカーボンへの相関がみられた。以上の結果から、化合物 1 は 5-[2-ethoxy-5-(4-cyclopentyl piperazin-1-ylsulfonyl)phenyl]-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-7-one (Fig. 4) と決定され、その構造的特徴からシクロペンチナフィル (cyclopentynafil) と命名された。

化合物 2 は無色の粉末であり、高分解能 MS の測定結果から  $m/z$  510.2362 (Calcd: 510.2363)  $[M+Na]^+$  が得られ、分子式は  $C_{29}H_{33}N_3O_4$  と推定された。また、 $^1H$ -NMR において 32 個の水素が観察され、 $\delta$  0.89 (3H, t,  $J=7.3$  Hz) よりメチル基、 $\delta$  5.85 (2H, d,  $J=6.9$  Hz) よりメチレンジオキシ基、 $\delta$  6.68 (1H, d,  $J=7.8$  Hz)、 $\delta$  6.78 (1H, d,  $J=1.9$  Hz)、 $\delta$  6.79 (1H, dd,  $J=7.8, 1.9$  Hz) より ABX タイプの芳香族プロトン、 $\delta$  7.02 (1H, br t,  $J=7.8$  Hz)、 $\delta$  7.07 (1H, br t,  $J=8.2$  Hz)、 $\delta$  7.27 (1H, d,  $J=8.2$  Hz)、 $\delta$  7.52 (1H, d,  $J=7.8$  Hz) より AB タイプの芳香族プロトンの存在が示唆された。一方、 $^{13}C$ -NMR スペクトルから、1 つのメチルカーボン、1 つのメチレンジオキシ基由来と考えられるカーボン ( $\delta$  102.4) を含む 9 個のメチレンカーボン、7 つの芳香族カーボン ( $\delta$  108.2, 109.0, 111.2, 118.9, 120.3, 121.1 及び 122.8)



を含む9つのメチンカーボン、7つの芳香族四級カーボン ( $\delta$  106.1, 127.4, 134.6, 137.6, 138.3, 148.3 及び 149.2)、2つのカルボニルカーボン ( $\delta$  169.1 及び 169.6) の存在が明らかとなった。基本的な構造はタダラフィルと非常によく類似していたが、*N*-メチル基に由来するシグナルは観察されず、1つの *N*-メチレンプロトン  $\delta$  3.49 (2H, br t,  $J=7.4$  Hz) を含む7つのメチレンプロトンと1つのメチルプロトン  $\delta$  0.89 (3H, t,  $J=7.3$  Hz) が観察された。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 及び HMQC から *N*-オクチル基の存在が示唆された (Fig. 5)。また、HMBC から H-13 ( $\delta$  3.49) のメチルプロトンから C-1 ( $\delta$  169.1) のカルボニルカーボンと C-3 ( $\delta$  51.2) のメチレンカーボンへの相関が観測され、H<sub>2</sub>-3 ( $\delta$  3.94 及び 4.24) のメチレンプロトンから C-13 ( $\delta$  47.2) のメチレンカーボンへの相関も併せて観察された。これらの結果から、化合物2の平面構造を Fig. 5 のように決定した。

NOE 測定の結果から、H-6 のメチンプロトンと H-12a のメチンプロトンとの間に NOE 相関がみられ、化合物2の相対立体配置はシスであることが明らかとなった。さらに、化合物2の CD スペクトルがタダラフィルと完全に一致したことから (Fig. 6)、化合物2はタダラフィルと同一の絶対立体配置であることが明らかとなった。以上の結果から、化合物2は (6*R*,12*aR*)-2-octyl-6-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2,3,6,7,12,12*a*-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-*b*]indol-1,4-dione と決定され、その構造的特徴から *N*-オクチルノルタダラフィル (*N*-octylnortadalafil) と命名された。

また、化合物1及び2について、当該錠剤を用いた HPLC による定量を行った結果、含有量はそれぞれ 130 mg/錠 (301  $\mu$ g/mg) 及び 27 mg/錠 (64.1  $\mu$ g/mg) であった。

さらに、化合物1及び2の PDE-5 に対する結合モデルを作成した結果から、化合物1及び2はシルデナフィルやタダラフィルと同様、PDE-5 に結合することが予測され、PDE-5 阻害活性を有することが示唆された。

#### D. 結論

日本国内で販売されていた強壮効果を謳った「いわゆる健康食品」から新規シルデナフィル類似化合物であるシクロペンチナフィルと新規タダラフィル類似化合物の *N*-オクチルノルタダラフィルが単離され、HPLC-PDA、LC-MS、高分解能 MS、NMR、CD により構造決定を行った。最近、Toque らによって、シクロヘキシルタイプの新規シルデナフィル類似化合物が合成され、その PDE-5 に対する IC<sub>50</sub> はシルデナフィルと同程度であることが報告されている。一方、文献未記載の新規化合物であるシクロペンチナフィル及び *N*-オクチルノルタダラフィルの PDE-5 に対する阻害活性は当然ながら未知である。そこで、これらの化合物について PDE-5 との結合予測実験を行ったところ、シルデナフィルやタダラフィルと同様、PDE-5 に結合することが予測され、PDE-5 阻害活性を有することが示唆された。

なお、これらの化合物の発見については、平成20年6月11日、厚生労働省並びに千葉県より同時に報道発表され、両化合物は「専ら医薬品」として指定されることとなった。

#### E. 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。

#### F. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Hasegawa T., Takahashi K., Saijo M., Ishii T., Nagata T., Kurihara M., Haijima Y., Goda Y., Kawahara N. Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and *N*-octylnortadalafil found in a dietary supplement. *Chem. Pharm. Bull.*, **57** (2) 185-189 (2009).

## 2. 学会発表

- 1) 長谷川貴志、高橋市長、西篠雅明、石井俊靖、永田知子、齋島由二、川原信夫、合田幸広：いわゆる健康食品から検出された新規シトルデナフィル類縁化合物及び新規タダラフィル類縁化合物について 第96食品衛生学会 学術講演会(2008年9月18-19日、兵庫)
- 2) 長谷川貴志、高橋市長、西篠雅明、石井俊靖、永田知子、齋島由二、川原信夫、合田幸広：いわゆる健康食品から検出された強壮成分について 第45全国衛生化学技術協議会 年会(2008年11月13-14日、佐賀)

## 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) Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare, websites: listed in <<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>> [in Japanese].
- 2) Moriyasu T., Shigeoka S., Kishimoto K., Ishikawa F., Nakajima J., Kamimura H., Yasuda I., *Yakugaku Zasshi*, **121**, 765-769(2001).
- 3) Zhu X., Xiao S., Chen B., Zhang F., Yao S., Wan Z., Yang D., Han H., *J. Chromatogr. A*, **1066**, 89-95 (2005).
- 4) Jefferson D. R., Natarajan S., Ganesan A., *Synlett*, 1428-1430 (2004).
- 5) Hasegawa T., Saijo M., Ishii T., Nagata T., Haishima, Y., Kawahara N., Goda Y., *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, **49** (4), 311-315 (2008).
- 6) Venhuis B. J., Barends D. M., Zwaagstra M. E., De Kaste D., RIVM Report 370030001/2007, National Institute for Public Health and the Environment, the Netherlands (2007).
- 7) Shin M. H., Hong M. K., Kim W. S., Lee Y. J., Jeoung Y. C., *Food Addit. Contam.*, **20**, 793-796 (2003).
- 8) Shin C., Hong M., Kim D., Lim Y., *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 1060-1062 (2004).
- 9) Park H. J., Jeong H. K., Chang M. I., Im M. H., Jeong J. Y., Choi D. M., Park K., Hong M. K., Youm J., Han S. B., *Food Addit. Contam.*, **24**, 122-129 (2007).
- 10) Blok-Tip L., Zomer B., Bakker F., Hartog K. D., Hamzink M., ten Hove J., Vredenburg M., de Kaste D., *Food Addit. Contam.*, **21**, 737-748 (2004).
- 11) Hou P., Zou P., Low M. Y., Chan E., Koh H. L., *Food Addit. Contam.*, **23**, 870-875 (2006).
- 12) Zou P., Hou P., Low M. Y., Koh H. L., *Food Addit. Contam.*, **23**, 446-451 (2006).
- 13) Zou P., Hou P., Oh S. S., Low M. Y., Koh H. L., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3488-3490 (2006).
- 14) Gratz S. R., Flurer, C. L., Wolnik K. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**, 525-533 (2004).
- 15) Gratz S. R., Gamble B. M., Flurer R. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 2317-2327 (2006).

- 16) Lai K. C., Liu Y. C., Tseng M. C., Lin J. H., J. *Food Drug Anal.*, **14**, 19-23 (2006).
- 17) Reepmeyer J. C., Woodruff, J. T., *J. Chromatogr. A.*, **1125**, 67-75 (2006).
- 18) Reepmeyer J. C., Woodruff J. T., d'Avignon D. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1615-1621 (2007).
- 19) Reepmeyer J. C., Woodruff J. T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 887-893 (2007).
- 20) Lam Y. H., Poon W. T., Lai C. K., Chan A. Y. W., Mak T. W. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**, 804-807 (2008).
- 21) Zou P., Hou P., Oh S. S., Chong Y. M., Bloodworth B. C., Low M. Y., Koh H. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 279-284 (2008).
- 22) Cho E. Y., Chung S. H., Kim J. H., Kim D. K., Jin C., *J. Appl. Pharmacol.* **11**, 232-237 (2003).
- 23) Kim J. H., Kim Y., Choi K., Kim D. H., Nam G., Seo J. H., *PCT Int. Appl.*, WO2002102802 (2002).
- 24) Kumasaka K., Kawahara N., Doi K., Kojima T., Goda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 227-230 (2008).
- 25) Uchiyama N., Saisho K., Kikura-Hanajiri R., Haishima Y., Goda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1331-1334 (2008).
- 26) Hosogai N., Hamada K., Tomita M., Nagashima A., Takahashi T., Sekizawa T., Mizutani T., Urano Y., Kuroda A., Sawada K., Ozaki T., Seki J., Goto T., *Eur. J. Pharm.*, **428**, 295-302 (2001).
- 27) Fujino K., Takami H., Atsumi T., Ogasa T., Mohri S., Kasai M., *Org. Process Res. Dev.*, **5**, 426-433 (2001).
- 28) Onoda Y., Nomoto Y., Ohno T., Yamada K., Ichimura M., *PCT Int. Appl.*, WO9808848 (1998).
- 29) Hirose R., Okumura H., Yoshimatsu A., Irie J., Onoda Y., Nomoto Y., Takai H., Ohno T., Ichimura M., *Eur. J. Pharm.*, **431**, 17-24 (2001).
- 30) Toque, F. H. A., Priviero, F. B. M., Teixeira, C. E., Perissutti, E., Fiorino, F., Severino, B., Frecentese, F., Lorenzetti, R., Baracat, J., Santagada, V., Caliendo, G., Antunes, E., De Nucci, G., *J. Med. Chem.*, **51**, 2807-2815 (2008).

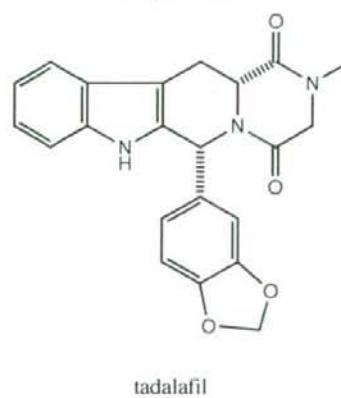
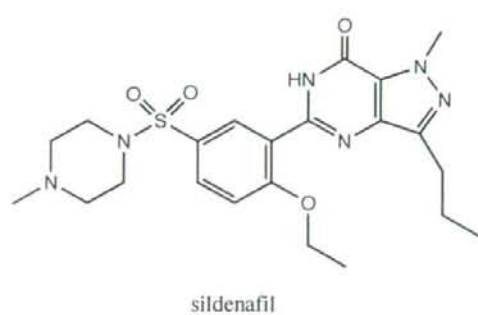
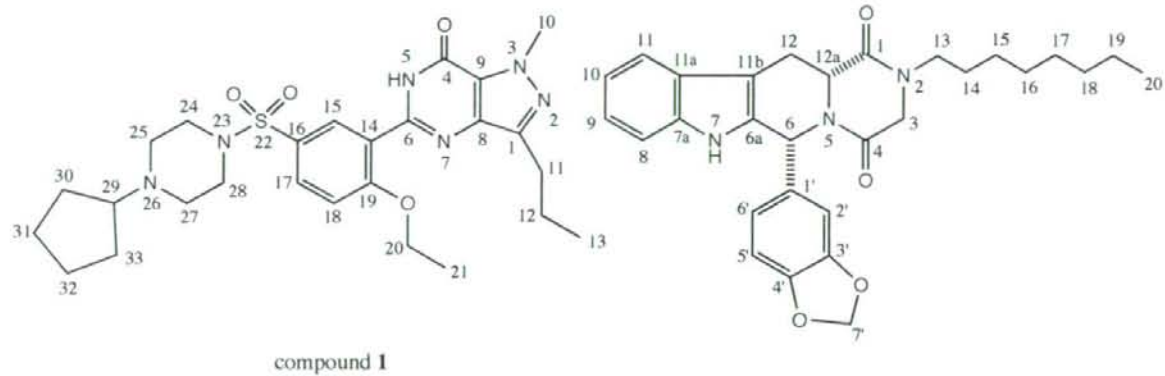


Fig. 1. Structures of compounds 1, 2 and related compounds

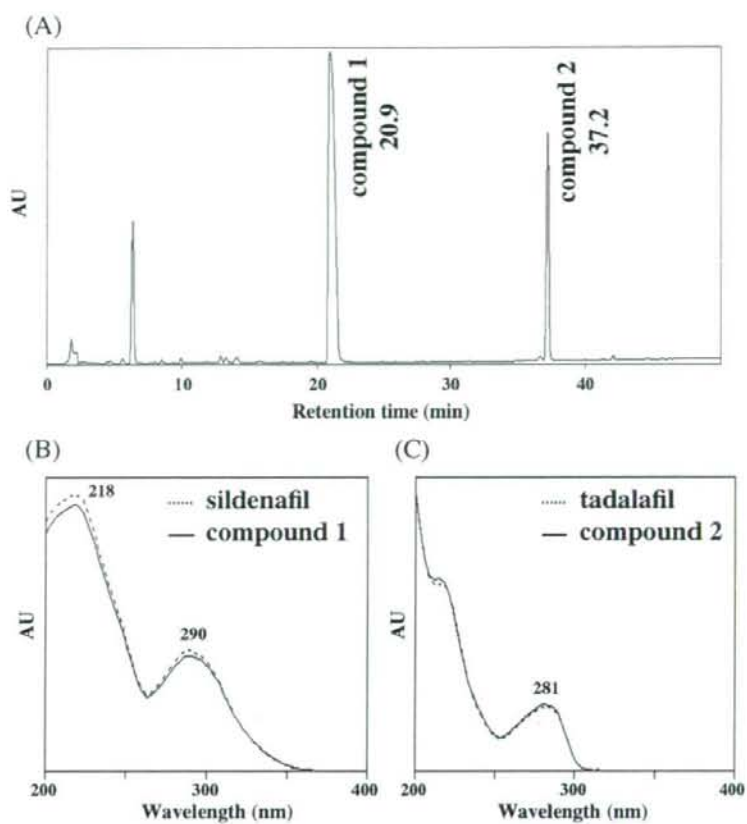


Fig. 2. (A) HPLC chromatogram of the sample solution monitored max plot (200-400 nm) and (B) the overlaid UV spectra of sildenafil and compound 1, and (C) the overlaid UV spectra of tadalafil and compound 2

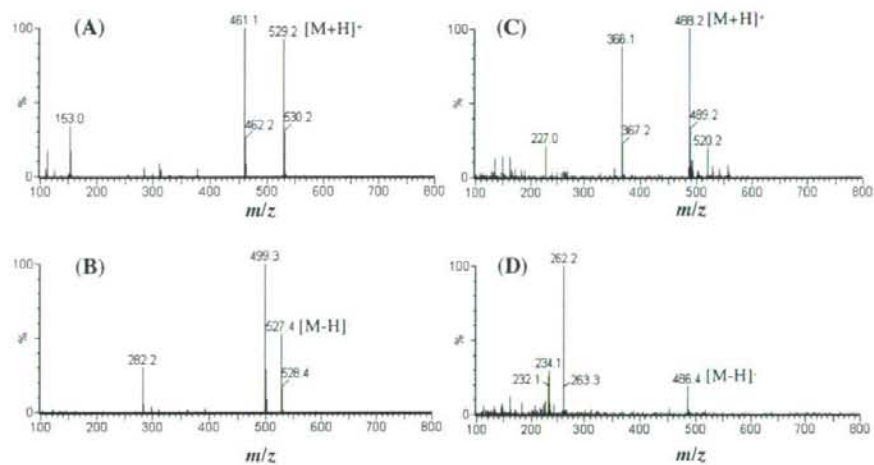


Fig. 3. Mass spectra of compounds **1** and **2** by LC-ESI-MS analysis

(A) compound **1** (positive, cone voltage: 60 V), (B) compound **1** (negative, cone voltage: -60 V),  
 (C) compound **2** (positive, cone voltage: 30 V), (D) compound **2** (negative, cone voltage: -60 V)

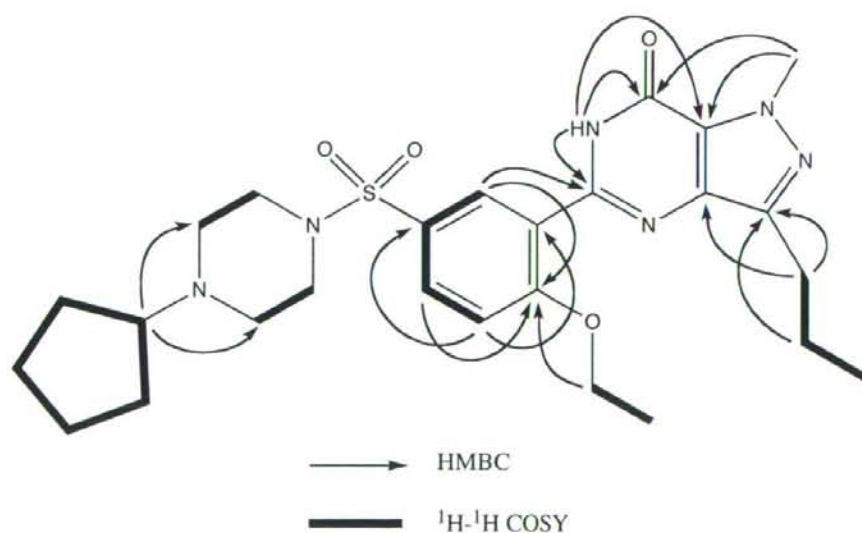


Fig. 4.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and major long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations of compound **1**

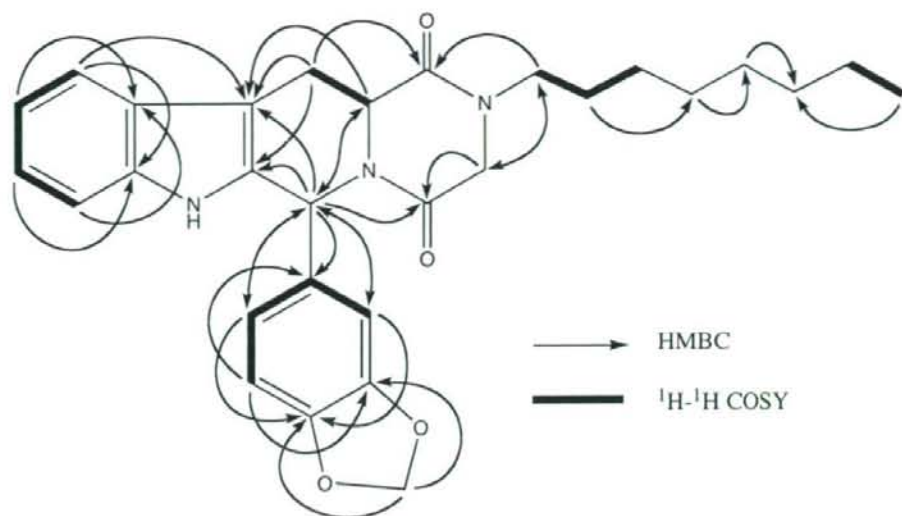


Fig. 5.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and major long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations of compound 2

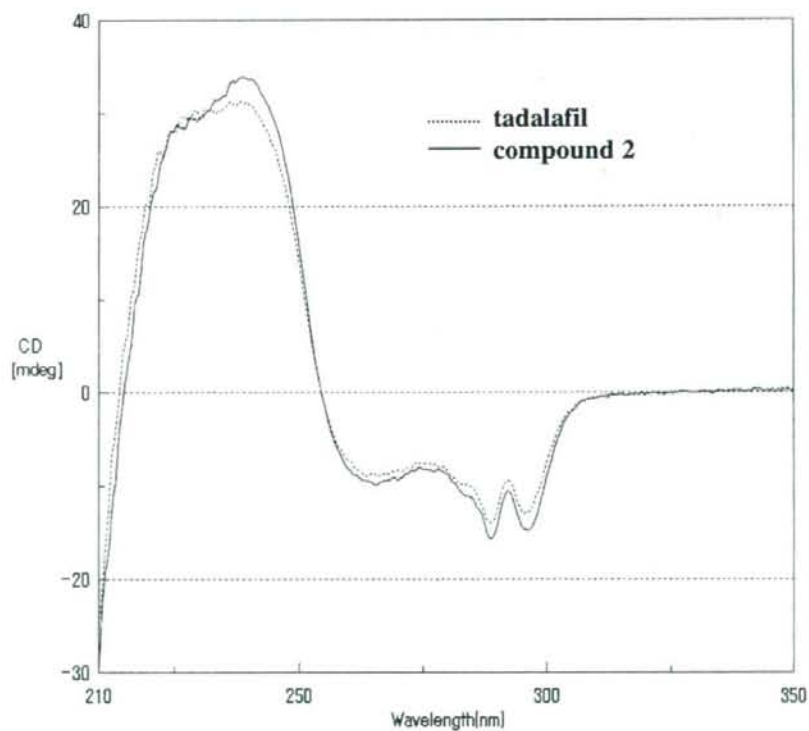


Fig. 6. Overlaid CD spectra of tadalafil and compound 2

Table 1. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts of compound **1** and sildenafil in CDCl<sub>3</sub>

Position	<b>1</b> ( <sup>1</sup> H <sup>a</sup> )	sildenafil ( <sup>1</sup> H <sup>a</sup> )	<b>1</b> ( <sup>13</sup> C <sup>b</sup> )	sildenafil ( <sup>13</sup> C <sup>b</sup> )
1			147.0	146.4
4			153.6	153.6
5	10.80 s	10.82 s		
6			146.4	147.0
8			138.4	138.4
9			124.5	124.5
10 (3H)	4.28 s	4.28 s	38.2	38.2
11 (2H)	2.92 t (7.3)	2.93 t (7.2)	27.8	27.7
12 (2H)	1.86 sext (7.3)	1.86 sext (7.2)	22.3	22.2
13 (3H)	1.01 t (7.3)	1.02 t (7.2)	14.0	14.0
14			121.1	121.1
15	8.83 d (2.3)	8.82 d (2.4)	131.3	131.2
16			128.6	129.0
17	7.83 dd (2.3, 8.7)	7.84 dd (2.4, 8.6)	131.8	131.7
18	7.14 d (8.7)	7.15 d (8.6)	113.0	113.0
19			159.3	159.3
20 (2H)	4.37 q (6.9)	4.37 q (6.9)	66.1	66.1
21 (3H)	1.65 t (6.9)	1.65 t (6.9)	14.6	14.5
24 (2H)	3.10 br s	3.11 br s	46.1	45.9
25 (2H)	2.59 br s	2.50 br s	51.2	54.0
27 (2H)	2.59 br s	2.50 br s	51.2	54.0
28 (2H)	3.10 br s	3.11 br s	46.1	45.9
29	2.51 quint (7.6)	2.28 (3H) s	66.8	45.7
30 (2H)	1.28 m, 1.83 m		30.4	
31 (2H)	1.53 m, 1.63 m		24.0	
32 (2H)	1.53 m, 1.63 m		24.0	
33 (2H)	1.28 m, 1.83 m		30.4	

a) Recorded in 800 MHz and *J* values (in Hz) in parentheses.

b) Recorded in 200 MHz.



Table 2. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts of compound **2** and tadalafil in CD<sub>3</sub>OD

Position	<b>2</b> ( <sup>1</sup> H <sup>a</sup> )	tadalafil ( <sup>1</sup> H <sup>b</sup> )	<b>2</b> ( <sup>13</sup> C <sup>b</sup> )	tadalafil ( <sup>13</sup> C <sup>b</sup> )
1			169.1	168.9
3	4.24 br d (17.4) 3.94 d (17.4)	4.20 br d (17.0) 3.97 d (17.0)	51.2	52.9
4			169.6	169.0
6	6.24 s	6.17 s	57.5	58.0
6a			134.6	134.7
7a			138.3	138.4
8	7.27 d (8.2)	7.25 d (8.3)	111.2	112.2
9	7.07 br t (8.2)	7.06 br t (8.3)	122.8	122.7
10	7.02 br t (7.8)	7.02 br t (7.8)	120.3	120.3
11	7.52 d (7.8)	7.51 d (7.8)	118.9	118.9
11a			127.4	127.4
11b			106.1	106.3
12	3.62 dd (15.6, 5.1) 3.12 br dd (15.6, 11.5)	3.66 dd (15.6, 4.6) 3.11 br dd (15.6, 11.9)	24.2	24.7
12a	4.44 br dd (11.5, 5.1)	4.40 br dd (11.9, 4.6)	57.4	57.6
13 (2H)	3.49 br t (7.4)	3.03 (3H) s	47.2	33.8
14 (2H)	1.59 m		27.9	
15 (2H)	1.30 m		27.8	
16 (2H)	1.26 m		30.4	
17 (2H)	1.32 m		30.4	
18 (2H)	1.28 m		33.0	
19 (2H)	1.31 m		23.7	
20 (3H)	0.89 t (7.3)		14.4	
1'			137.6	137.7
2'	6.78 d (1.9)	6.80 d (1.4)	108.2	108.3
3'			149.2	149.1
4'			148.3	148.2
5'	6.68 d (7.8)	6.68 d (8.2)	109.0	108.9
6'	6.79 dd (7.8, 1.9)	6.82 dd (8.2, 1.4)	121.1	121.3
7' (2H)	5.85 d (6.9)	5.84 d (9.1)	102.4	102.4

a) Recorded in 800 MHz and *J* values (in Hz) in parentheses.

b) Recorded in 200 MHz.

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、ホモチオデナフィル、シクロベンチルナフィル、N-オクチルノルタダラフィル、チオアイルデナフィルと 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

シルデナフィルは、生体内で環状グアノシンーリン酸（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。

本年度はホモチオデナフィル、シクロベンチルナフィル、N-オクチルノルタダラフィル、チオアイルデナフィル（図 3）について行った。

C. 研究結果と考察

1. ホモチオデナフィル、シクロベンチルナフィル、N-オクチルノルタダラフィル、チオアイルデナフィルと PDE5 の結合モデル  
化合物と PDE5 (1UDT) の結合モデルをそれぞれ構築した。（図 4）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G1n817と水素結合を形成するが、これらも同様にG1n817と水素結合を形成しうることが示された。(図4)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

ホモチオデナフィル、シクロペンチルナフィル、N-オクチルノルタダラフィル、チオアイルデナフィルがPDE5と結合し、阻害活性を有することを定性的に予測した。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 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**, 3002-3024(2008)

M. Kurihara, Y. Sato, F. Kaneko, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune  
Computational Study on Secondary Structure of Oligopeptides Containing  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids  
*Peptide Science* 2007, 137-138(2008)

S. Kakuda, K. Okada, H. Eguchi, K. Takenouchi, W. Hakamata, M. Kurihara, M. Takimoto-Kamimura  
Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with a nonsecosteroidal vitamin D3 analogue YR301  
*Acta Crystallogr. F*, **64**, 970-973(2008)

T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara  
Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement  
*Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 185-189(2009)

Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H  
Helical-Screw Directions of Diastereoisomeric Cyclic  $\alpha$ -Amino Acid Oligomers  
*Org. Lett.*, (2009) in press.

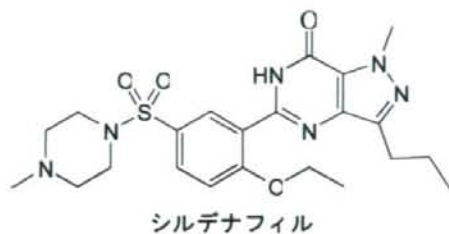


図 1

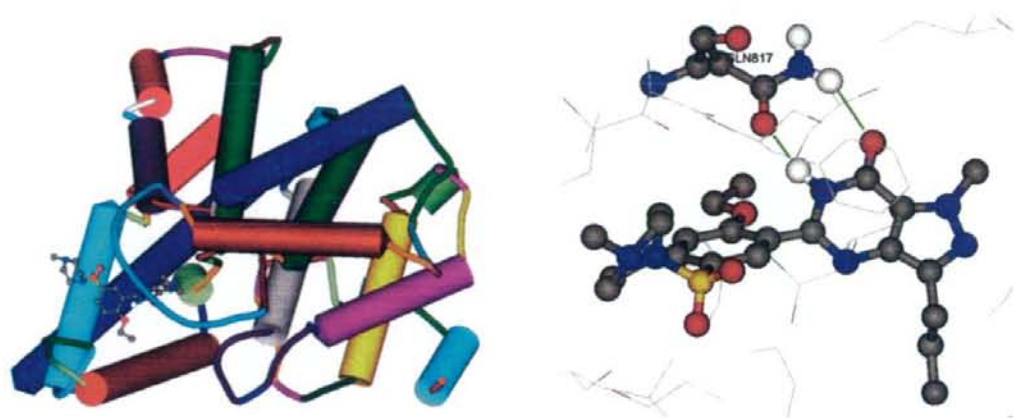


図 2 シルденаフィルが結合した PDE5 の X 線構造 (左), シルденаフィルと PDE5 との水素結合

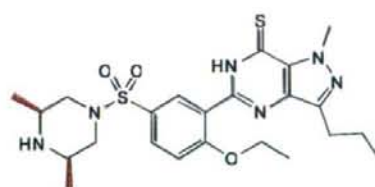
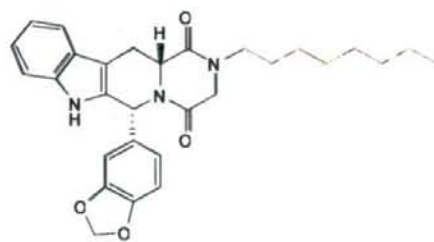
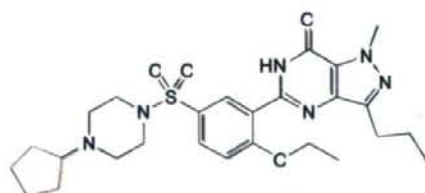
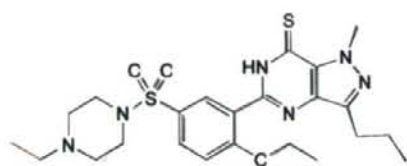


図 3