

201034024A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に
関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

(H21-医薬-一般-011)

研究代表者 大塚 英昭

平成23(2011)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・分析及び有害性評価に関する研究 大塚 英昭 | 1 |
|---------------------------------------|---|

II. 分担研究報告書

1. 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

| | |
|---|----|
| 合田 幸広 | |
| 「いわゆる健康食品」から検出されたシルデナフィル構造類似体について 若菜 大悟 | 9 |
| 「いわゆる健康食品」より検出された勃起不全 (ED) 治療薬類似化合物の構造 若菜 大悟 | 15 |
| 「いわゆる健康食品」より検出された勃起不全 (ED) 治療薬類似化合物の分析法に ついて 鎌倉 浩之 | 23 |
| 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 栗原 正明 | 27 |
| 電子たばこ吸入蒸気中のニコチン簡易分析法 最所 和宏 | 33 |
| 鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別 徳本 廣子 | 43 |
| 市場に流通するキャットクロー製品の原料植物と成分について 丸山 卓郎 | 51 |
| シャタバリ (<i>Asparagus racemosus</i>) における asparagamine A 含有の真偽について 丸山 卓郎 | 63 |
| 2. 無承認無許可医薬品の調査と分析に関する研究 大塚 英昭 | |
| 「専ら医薬品」の調査に関する研究 大塚 英昭・合田 幸広 | 71 |
| 無承認無許可医薬品の調査と分析に関する研究 大塚 英昭 | 91 |

| | |
|---------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 95 |
|---------------------|----|

厚生労働科学研究費補助金（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）
総括研究報告書

無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に関する研究

研究代表者 大塚英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

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21年2月20日付薬食発第0220001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）により無承認無許可医薬品と判断されるべき成分本質について、調査と分析、有害性評価を行うものである。上記通知では、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）は、320成分（植物由来233、動物由来21、その他66）ある。これらの成分本質のうち、近年、その他（化学物質）の分類で、成分本質が専ら医薬品として判断されるものが急増している。これは主に、合成されたED治療薬類似成分である。本研究では、実態調査の際、新規に出現したこのような成分について、構造決定を行った。さらに、MacroModelを用いドッキングスタディを実行し、Phosphodiesterase (PDE) 5 酵素阻害活性を予測し、専ら医薬品であるかどうかの判断根拠を提示するとともに、以後、迅速に監視・指導が行えるように分析法の開発を行った。さらに、電子たばこ吸入蒸気中のニコチン検出法を確立した。また通常のルートを通じ、新規に申請のあった成分本質（原材料）についても、医薬品としての使用実態、麻薬用作用、薬理活性等を調査し、専ら医薬品に分類するべきであるかどうか検討した。さらに、強い生理活性を持つにもかかわらず、専ら医薬品の判断が求められないまま、販売されている成分本質について調査・研究を行うとともに、痩身用の健康食品に含まれるセンナ由来粉末中の小葉、葉柄、葉軸（以上専ら医薬品）と茎（非医薬品）の形態学的な分別方法についても検討した。本研究は、厚生労働省監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、健康危機管理に直結するものは迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知される。

分担研究者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

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、このような製品の流通により、様々な健康被害が予想されるため、薬事法により、その製造、販売、授与、広告が禁止される。本研究は、厚生労働

省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下、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。近年、健康食品中での出現が急増している無承認無許可医薬品成分に ED 治療薬類似物質がある。このような化合物は、①医薬品としての禁忌や用量について何も考慮されず使用されること、②構造類似体として、ターゲット酵素でない類縁酵素への阻害活性を持つ可能性が否定できないこと、③そのものに含まれる不純物や他の食品との相互作用等が全く考慮されず使用される事等、様々な有害性が予想される。本研究では、これらの化合物の迅速な取締りに対応するため、専ら医薬品として指定するための要件（構造決定、活性予測等）を準備する。さらに、指定以後の迅速広範囲な取締りに対応できるよう分析法を確立する。また、有害性を評価するため、PDE6 活性を測定する。一方で、痩身用健康食品で使用される緩下作用を持つ植物由来の成分本質について、無承認無許可医薬品として取り締まるための鑑定法の確立を行う。さらに、新規に申請のあった成分本質（原材料）についても、国民の健康・安全確保を念頭に、調査研究を行う。さらに強い生理活性を持つにもかかわらず、専ら医薬品の判断が求められないまま、違法薬物市場で、無承認無許可医薬品として販売されている成分本質について実態調査を行う。このような研究は、世界的にも国立の研究機関と大学との共同研究で実施されているが、各国の法体系に即した研究が必須である。申請者らは、監視指導・麻薬対策課が主催する医薬品の成分本質に関する WG のメンバーであり、この分野での日本の状況を良く理解している。さらに分担研究者は、これまで 10 数種の ED 治療薬アナログを構造決定しており、このような情報交換

を諸外国の担当者と常時行っているだけでなく、医薬品監視の拠点である地方衛生研究所とも緊密に交流しており、得られた成果を直ちに、国民の健康保護に還元できる立場にある。以上、本研究は、無承認無許可医薬品に関連して、厚生労働行政に直接貢献することを目的としたものである。

B. 研究方法

買い上げ調査等で強壮や痩身を標榜する製品から未知物質が検出された場合、未知物質を単離し、機器分析による構造決定を行う。次いで、本物質について文献調査を実施するとともに、予想されるターゲットタンパク質がある場合には、*MacroModel* を用いドッキングスタディを実施する。もし、PDE5 阻害活性が予想された場合には、標準的な分析法の開発を行う。さらに、必要な場合には有害性を評価するため、PDE6 活性を測定する。

痩身用健康食品で使用される緩下作用を持つ植物（センナ及び *Cassia* 属）については、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターより標準的な植物を入手し、それぞれの種、部位について鏡検上特徴的となる要素について検討する。特にセンナについては、小葉、葉柄、葉軸（以上専ら医薬品）と茎（非医薬品）について、どの要素が両者の鑑別の要点となるか検討する。

新規に申請のあった成分本質（原材料）については、まず基原植物の学名、和名、生薬名等について調査するとともに、医薬品としての使用実態を調査する。さらに、RTECS, Chemical Abstract, PubMed, 上記通知に記載されている参考文献等を利用しながら、毒性データ、二次代謝成分や生理活性、麻薬、向精神薬、覚せ

い剤様作用があるかどうか調査する。これらのデータを一元的に判断して、専ら医薬品に分類すべきであるかどうか検討する。

また、従来区分されているにもかかわらず、文献情報等が少ない品目について、対象物入手し、成分検索を行う。また、毒性アルカロイド等の存在が報告されているキャツクローやシャタバリ等について、含有アルカロイドの精査を行うとともに、市販品の基原種の同定を行う。また、強い生理活性を持つ化合物の確認が行われた場合には、これらの化合物について定量分析を行う。

<倫理面への配慮>

本研究では、ヒト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ないと考えられる。

C. 結果と考察

C.1 無承認無許可医薬品に関する分析及び有害性評価

地方衛生研究所より問い合わせを受けた強壯を標榜する「いわゆる健康食品」に含まれていた不明成分について、各種機器分析を行い、同成分は、国内では「いわゆる健康食品」から検出された事例のない、メチソシルデナフィル methisosildenafil (aildenafil, dimethylsildenafil) であることを明らかにした。さらに、別に問い合わせを受けた成分は、分子式 $C_{27}H_{35}N_9O_5S_2$ を示し、アイルデナフィルが分子式 $C_4H_4N_3OS$ のユニットで化学修飾された構造を持つことを明らかにした。本化合物は、以下にのべるような酸性条件下でアイルデナフィルを生成すること、アイルデナフィルとの NMR の化学シフト値の比較から、 $C_4H_4N_3OS$ ユニットの結合位置は、プリン環の 3 カ所の窒素原子あるい

は、環外の酸素原子である可能性が高いものと推定された。最近になって本化合物と同様の分子式を持つアイルデナフィル誘導体として、環外の酸素原子に $C_4H_4N_3OS$ ユニットの結合した構造を持つ nitroso-prodenafil が報告されているが、nitroso-prodenafil の構造について確定的ではなく、今後合成等により、本化合物の構造を確定する必要があると考えられる。

また、上記の化合物について LC-PDA-MS による分析法を検討した。本化合物は、0.1% 酢酸 (0.02 mol/L , pH 3 程度) の生理的条件下で、アイルデナフィルを生成することを確認した。

さらに、強壯を標榜する健康食品より同定されたメチソシルデナフィル及びアセチルアシッドについて 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、活性について検討したところ、同化合物は、PDE5 と結合し、阻害活性を示すものと考えられた。

また別に、電子たばこ吸入蒸気中のニコチンの簡易分析法を開発し、カートリッジ内容物よりニコチンが検出された 20 銘柄すべてにおいて、吸入蒸気中から、専ら医薬品成分であるニコチンが検出されることを明らかにした。

C.2 鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別

昨年度の研究で、センナの茎には、規則的に気孔が分布する部位があり、この部位はほぼ方形～等径性多角形の表皮系細胞より形成されている一方、気孔周辺の表皮細胞の長軸方向の径は、ほとんど全て、気孔のものより小さいこと、これに対し葉軸では、主として長軸方向に長い長方形～長六角形の表皮細胞より形成されており、気孔周辺の表皮細胞は近接した気孔よりも長軸方向の径が大きいことを明らかに

し、気孔周辺の表皮細胞の形状を観察することで、センナ茎粉末中に混入した「専ら医薬品成分」である葉軸粉末を容易に確認できることを示した。本年度は、鑑定のための上記の特徴が、系統や栽培環境によらず、普遍的なものであることを示すため、系統及び栽培環境の異なった株を入手し、比較検討を行なった。

その結果、アレキサンドリアセンナ (*Cassia acutifolia*)、チンネベリセンナ (*C. angustifolia*) の両種において、種子島栽培品及び、富山大学付属薬用植物園栽培品ともに、同様の内部形態を示し、系統及び栽培環境の異なる株においても、茎および葉軸を鑑別するための形態的特徴に違いのないことを確認した。さらに、茎、葉軸の粉末を作成し、種々の割合で混合した試験粉末を作成し、鑑定の可否および精度について検討した結果、葉軸の混合割合を5%程度であっても、気孔より大型の長楕円形の表皮細胞からなる表皮片は特徴的であり、粉末状の試料であっても葉軸が混入していることを明確に判別できることが明らかとなった。

C.3 新規に調査依頼があった成分・本質について

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、依頼のあった新規な植物由来物質3品目、化学物質4品目の本質について、文献調査等を行った。このうちED治療薬類似成分等である化学物質2品目（アセチルアシッド、緩やかな酸性条件下でメチソシルデナフィルとなる分子量629と推定される成分）は、ED治療薬を期待して合成したという構造の類似性、計算による活性予測等から、専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した。また、アフリカマンゴノキは、食経験は十分にあるものの、

痩身作用があることが論文報告されておりまた、脂質形成を抑制作用に関して米国でPCTパテント出願がおこなわれていることから、フーディアと同じく、専ら医薬品として取り扱うべき物となる可能性が考えられた。また、別に「医薬品の成分本質に関するワーキンググループ」のための資料を作成した。

C.4 植物系成分・本質の調査と分析及び有害性評価

健康食品素材として使用され、本研究班の前身である「専ら医薬品としての規制の範囲に関する研究」において、専ら医薬品として取り扱うべきと考えられたシャタバリ (*Asparagus racemosus*) 中の含有 polycyclic pyrrolizidine アルカロイドについて、文献を詳細検討した。その結果、報告されている毒性アルカロイド asparagamine A の単離は、*Stemona* 属植物を誤同定したことによるものである可能性が高いことが明らかになった。一方で、*A. racemosus* と *Stemona* 属植物を誤同定したと思われる文献は、他にも見出された。シャタバリそのものは、インドのアユルベーダ薬として最も重要な生薬であること、子宮がん等のガンリスクを増大させるステロイドサポニン等、比較的強い生理活性を持つ化合物の単離が別に報告されていること、また、今回の研究結果を鑑みれば市場で利用されるシャタバリには、誤同定された *Stemona* 属植物が混入する危険性も十分存在すること等を考慮して、引き続き、食薬区分を実施するなら、専ら医薬品として対応することが適切と考えるが、範囲の規定について議論が必要となろう。

キャッツクロー (cat's claw) は、非医薬品としてリストに存在するものの、専ら医薬品であるチョウトウコウ (カギカズラ、トウカギ

カズラ)と同様に oxindole alkaloid 類を特徴的な二次代謝成分として含む成分本質である。また、基原植物は、*Uncaria tomentosa* とされているが、*U. tomentosa* の主産地であるペルーでは、同属植物である *U. guianensis* も分布し、両者は、しばしば混同される。そこで本研究では、食薬区分に関しより正確な情報入手するため、国内の市場に流通するキャクロー製品を購入し、遺伝子解析による原料植物の同定を行うとともに、LC-PDA-MS 分析による含有アルカロイドの調査を行った。その結果、市販製品には、本来の原料である *Uncaria tomentosa* の他に、別の植物の混入が認められた。さらに、含有アルカロイドのパターンにも違いが見られた他、一日摂取目安量に換算したアルカロイド摂取量も、各製品により、大きく異なる事が明らかとなった。

サルサ(サルサパリラ)は、以前は専ら医薬品リストに記載されていたが、平成19年4月17日の通知の一部改正により、サルトリイバラ科のシオデ属(サンキライの塊茎・根茎を除く)として、非医薬品リストに記載となった。一方、インドでは、サルサパリラ(小さなブドウのような蔓性の低木)とは、ガガイモ科の *Hemidesmus indicus* を意味しており、本植物は、日本ではインディアン(インド)サルサパリラと呼ばれる場合が多い。本植物の根は、アユルベータ医薬品であり、現在、日本では、本植物由来製品は、食薬区分の判断が行われないまま、ネット販売が行われている。本研究では、インドの研究者より入手したインディアンサルサパリラについて成分研究を行い、新たに、新規プレグナン配糖体、比較的まれな構造を有するフェニルプロパノイド配糖体を単離構造決定した。

D. 結論

本研究は、厚生労働省の基準(医薬品の範囲に関する基準)に直接対応した研究である。無承認無許可医薬品成分の同定、活性予測、専ら医薬品への指定、分析法の提示といった本研究で行われる一連の成果が監視指導行政で利用されることで、薬事法による無承認無許可医薬品の迅速な取締りが行われ、国民の健康被害を防止することが可能となる。

本研究では、強壯を標榜する健康食品由来の ED 治療類似薬成分等について構造推定を行うと共に、*in silico* で PDE5 阻害活性を予測した。さらに、電子たばこ吸入蒸気中のニコチンの簡易分析法を開発し、カートリジ内容物よりニコチンが検出された 20 銘柄すべてにおいて、吸入蒸気中から、専ら医薬品成分であるニコチンが検出されることを明らかにした。また、昨年度確立したセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別法に普遍性があり、精度高い方法であることを示した。上記のように、実態調査に本研究のような化学的、植物学的な研究を組み合わせることで、初めて有効な法規制が行えることになる。

さらに、市場で流通するグレーゾーンの植物体として考えられるシャタバリや、インディアンサルサ等について、食薬区分に関する正確な情報入手するため、成分検討を行うとともに、基原種の確認等を実施した。また、新たに申請を受けた成分本質(原材料)等について、専ら医薬品に分類すべきかどうか検討した。これらの研究成果は、今後、医薬品の成分本質に関する WG での議論に反映させることで、直接厚生労働行政に貢献することが出来る。

以上、本研究は、厚生労働省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究で

あり、本研究の成果で、厚生労働省の健康危機管理に直結するものは、迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知される。また、食薬区分の判断等、様々な形で施策に反映される。

E. 健康危機情報

本研究で取り扱った ED 治療類似物質は以下のとおりである。メチソシルデナフィル（アイルデナフィル）、アセチルアシッド及び分子式 $C_{27}H_{35}N_9O_5S_2$ を示し、アイルデナフィルが分子式 $C_4H_4N_3OS$ のユニットで化学修飾された構造を持ち、穏和な酸性条件下でアイルデナフィルを生成する化合物。これらの化合物は、既に専ら医薬品として判断が行われている。

F. 研究発表等

論文発表

- 1) Takahashi, K., Hasegawa, T., Saijo, M., Nagata, T., Wakana, D., Goda, Y., "Identification of sildenafil analogues found in a dietary supplement." *Annual Report of the Chiba Prefectural Institute of Public Health* **58**, 55-60 (2009).
- 2) Kamakura, H., Maruyama, T., Sugimura, K., Iida, O., Goda, Y., "The source plants and the chemical composition of the passion flower products available as dietary supplements." *Jpn. J. Food Chem. Safety* **17**, 198-206 (2010).
- 3) Wakana, D., Kawahara, N., Goda, Y., "Three new triterpenyl esters, codonopilates A-C, isolated from *Codonopsis pilosula*." *J. Nat. Med.* **65**, 18-23 (2011).

- 4) Matsumoto, T., Anjiki, N., Arifuku, k., Kawahara, N., Goda, Y., "Metabolome analysis of Setsucha products (*Thamnia vermicularis* Ach.) based on 1H NMR spectroscopy." *Jpn. J. Food Chem. Safety* **18**, in press (2011).
- 5) Tokumoto, H., Shimomura, H., Iida, O., Hakamatsuka, T., Goda, Y., "Morphological discrimination of powdered senna stem and powdered senna leaf rachis." *Jpn. J. Pharmacog.* **65**, accepted (2011).
- 6) Zhao, Z., Matsunami, K., Otsuka, H., Kumar, A., Negi, A., Negi, D.S. A condensed phenylpropanoid glucoside and pregnane saponins from the roots of *Hemidesmus indicus*. *J. Nat. Med.*, in preparation

学会発表等

- 1) 趙志敏, 松浪勝義, 大塚英昭, Devendra S. Negi, インドのインディアンサルサパリラの根の成分研究, 日本薬学会第130年会 (2010年3月, 岡山).
- 2) 栗原正明, 出水庸介, 佐藤由紀子, 花尻瑠理, 合田幸広, 奥田晴宏, 定量的構造活性相関 (QSAR) 等による違法薬物の活性予測, 第54回日本薬学会関東支部大会 (2010年10月, 東京).
- 3) 鎌倉浩之, 最所和宏, 合田幸広, ED治療薬類似化合物のPDE6阻害活性について, 第16回日本食品化学学会総会・学術大会 (2010年6月, 大阪).

- 4) 合田幸広, 食薬区分と違法ドラッグ, 漢方薬・生薬認定薬剤師研修会 (2010年9月, 東京).
- 5) 合田幸広, 食薬区分と生薬, 東京農工大学講義 (2010年10月, 東京).
- 6) 高橋市長, 長谷川貴志, 西條雅明, 小倉誠, 元木裕二, 永田知子, 若菜大悟, 合田幸広, いわゆる健康食品中から検出されたシルデナフィル構造類似体について, 第47回全国衛生化学技術協議会 (2010年11月, 神戸).
- 7) 最所和宏, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 電子たばこ吸入蒸気中のニコチンの簡易分析法について, 日本薬学会第131回年会 (2011年3月, 静岡)
- 働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000000cmh6.html>
- 2) スーパーエックス, 酸性条件下で「メチソシルデナフィルとなる成分」(2010年12月20日) 神奈川県、千葉県、大阪府、浜松市
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>
- 3) BS30, 酸性条件下で「メチソシルデナフィルとなる成分」(2010年12月21日, 24日) 大阪府、広島県 <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>

報道発表等

- 1) 平成21年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について (2010年7月16日) 厚生労

分担研究課題 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

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

「いわゆる健康食品」から検出されたシルデナフィル構造類似体について

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 若菜大悟

研究要旨 地方衛生研究所より問い合わせを受けた「いわゆる健康食品」から検出されたシルデナフィル構造類似体の同定を行った。DART-TOF-MS 及び NMR 分析の結果から当該不明成分は国内では「いわゆる健康食品」から検出された事例のない，メチンシルデナフィルであることが明らかになった。

協力研究者

鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部主任研究官

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部室長

試料及び試薬

NMR 測定用重溶媒は DMSO- d_6 99.96 % (ISOTEC 製) を用いた。

装置及び測定条件

MS スペクトルは JEOL 製 JMS-T100LC 型質量分析計を用い，ESI ポジティブモードで測定した。

NMR スペクトルは JEOL 製 ECA-800 型核磁気共鳴装置で測定し，化学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。スピン結合定数は Hz で表示し， $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおけるピークの開裂様式は singlet, doublet, triplet, quartet, multiplet, および, broad をそれぞれ, s, d, t, q, m, および, br と略記した。以下に各測定手法の略称を記載する。Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY), Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC), Heteronuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC) 及び Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

A. 研究目的

「いわゆる健康食品」に無承認無許可医薬品が添加される例が増加している。その中でも ED 治療薬類似化合物はヒドロキシホモシルデナフィルや *N*-オクチルノルタダラフィルなどといった，既知 PDE-5 阻害剤の一部を化学修飾した物質が検出されている^{1), 2)}。このような ED 治療薬構造類似体の同定に関して，地方衛生研究所から協力依頼があった。当該物質は強壯を謳う「いわゆる健康食品」からチオアイルデナフィルとともに検出された化合物で，ホモシルデナフィルと同じ分子イオンピークを持ち，かつ，UPLC-PDA 分析において異なる保持時間を示した。我々はその同定を目的とし，各種機器データによる構造決定を試みた。

B. 研究方法

(NOESY)

<倫理面での配慮>

本研究では、ヒト及び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。

C. 研究結果

当該物質は無色非晶系物質であり、DART (Direct Analysis in Real Time)-TOF-MS から分子式 $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ [489.2279 (M+H)⁺, calcd. 489.2284 for $C_{23}H_{33}N_6O_4S$] と決定した。¹H-NMR スペクトルから、ヘテロ原子に結合しているもの 1 つを含む 5 個のメチル水素 [δ_H 4.16s, δ_H 1.33t ($J = 6.9$ Hz), δ_H 0.93t ($J = 7.5$ Hz), δ_H 0.91d (6H, $J = 6.4$ Hz)], ヘテロ原子に隣接しているもの 2 つを含む 5 つのメチレン水素 [δ_H 4.20q (2H, $J = 6.9$ Hz), δ_H 3.45dd (2H, $J = 10.7, 2.0$ Hz), δ_H 2.77t (2H, $J = 7.5$ Hz), δ_H 1.73qt (2H, $J = 7.5, 7.5$ Hz), δ_H 1.68t (2H, $J = 10.7$ Hz)], メチン水素が 2 つ [δ_H 2.73m (2H)], 及びオレフィン水素 3 つ [δ_H 7.83d ($J = 2.4$ Hz), δ_H 7.81dd ($J = 2.4, 8.7$ Hz), δ_H 7.37d ($J = 8.7$ Hz)] が観測された (Table 1)。以上から、プロピル基、エトキシ基、および、1,2,4-置換ベンゼン環の存在が示唆された。¹³C-NMR スペクトルからメチル炭素 5 つ [δ_C 38.0, δ_C 19.1 (2C), δ_C 14.4, δ_C 14.0], メチレン炭素 5 つ [δ_C 65.0, δ_C 52.0 (2C), δ_C 27.4, δ_C 21.9], メチン炭素 2 つ [δ_C 49.9 (2C)], 水素原子と隣接している sp^2 炭素 3 つ [δ_C 131.6, δ_C 130.0, δ_C 113.4], 4 級 sp^2 炭素が 8 つ [δ_C 159.9, δ_C

153.9, δ_C 148.4, δ_C 145.1, δ_C 138.0, δ_C 126.6, δ_C 124.6, δ_C 123.8] 観測された (Table 1)。

以上のデータから、ホモシルデナフィルの *N*-エチル基が存在せず、メチル基が 2 つ存在する構造と推定された (Fig. 1)。

本物質の構造を決定するため、各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った (Fig. 2)。

¹H-¹H COSY スペクトルから 20 位のメチレン水素と 21 位のメチル水素から成るエトキシ基が確認され、15 位、17 位のオレフィン水素、20 位のメチレン水素から 19 位の炭素へ HMBC 相関が見られた事から、19 位の炭素にエトキシ基が結合していると示唆された。また、¹H-¹H COSY スペクトルからプロピル基 (11-H₂ - 12-H₂ - 13-H₃) の存在を示唆する相関が観測され、12 位のメチレン水素から 1 位の炭素へ、11 位のメチレン水素から 1 位および 8 位の炭素へそれぞれ HMBC 相関が見られた事からプロピル基は 1 位の sp^2 炭素に結合していると決定した。また、10 位のメチル水素から 9 位の sp^2 炭素へ、15 位の芳香族水素から 6 位の sp^2 炭素へ HMBC 相関が見られた事から、シルデナフィル類と同一の母核を持つと決定した。また、硫酸基に結合している側鎖の部分構造に関しては分子式 $C_6H_{13}N_2$ を持ち、メチル基 2 つ、メチレン基 2 つ、および、メチン基 2 つを持つ対称形の一環性構造と示唆された。¹H-¹H COSY スペクトルから、24/28 位のメチレン水素、25/27 位のメチン水素、および、29/30 位のメチル水素がそれぞれ隣接しており、HMBC スペクトルから 24 位のメチレン水素から 28 位の炭素へ相関が観測されたため、側鎖部分は 2,6-ジメチルピペラジン

構造を持つと決定した。この部分構造について、NOESY スペクトルは 24/27-エクアトリアル位の水素と 29/30 位のメチル水素間、24/27-アキシアル位の水素と 25/28 位のメチン水素間の相関を示したことから、メチル基はジアキシアル配置を持つと示唆された。以上のデータを基に、本物質とメチソシルデナフィルの NMR データ³⁾を比較したところ (Table 1)、良い一致が見られたため、本物質の構造をメチソシルデナフィルと決定した。

D. 考察

今回、いわゆる健康食品から検出、単離された物質について、DART-TOF-MS および各種 NMR スペクトルの解析結果から、本物質をメチソシルデナフィルと同定した。

本物質は 2007 年に Reepmeyer らにより初めて食品中からの単離が報告された^{4),5)}。以降、シンガポール⁶⁾や韓国⁷⁾などでも報告が見られたが、我が国での検出報告はこれが初めての例となる。今後、ED 治療薬類似化合物は多様な化学修飾がなされ、その構造が複雑化していくと予想されるため、今後も監視および取り締まりを継続する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究は、無承認無許可医薬品の調査、及び、分析を目的とし、「いわゆる健康食品」に含有されていた ED 治療薬類似構造物質の同定を行った。

DART-TOF-MS から分子式 $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ と決定した。¹H- および ¹³C-NMR スペクトルの解析結果から、シルデナフィル類と同一の母核を持つと

示唆され、硫酸基に結合している側鎖部分に相違点があると考えられた。そこで、各種二次元 NMR スペクトルより、本物質をメチソシルデナフィル (別名：ジメチルシルデナフィル、アイルデナフィル) と決定した。

F. 健康危険情報

直接的な健康危機情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 高橋市長, 長谷川貴志, 西條雅明, 小倉誠, 元木裕二, 永田知子, 若菜大悟, 合田幸広: いわゆる健康食品中から検出されたシルデナフィル構造類似体について, 第 47 回全国衛生化学技術協議会 (2010 年 11 月 11, 12 日, 神戸).

H. 知的所有権の取得状況

特になし

参考文献

- 1) T. Hasegawa, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, Y. Haishima, N. Kawahara, Y. Goda, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **49** (4), 311-315 (2008).
- 2) T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara, *Chem. Pharm. Bull.*, **57** (2), 185-189 (2009).
- 3) D. M. Choi, S. Paek, T. H. Yoon, H. K.

- Jeong, J. S. Pyo, J. Park, D. Kim, S. W. Kwon, J. AOAC INT., **91**(3), 580-588 (2008).
- 4) J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, D. A. d' Avignon, *J. Food. Biomed. Anal.*, **43**(5), 1615-1621 (2007).
- 5) J. C. Reepmeyer, J. T. Woodruff, *J. Food. Biomed. Anal.*, **44**(4), 887-893 (2007).
- 6) D. M. Choi, S. Park, T. H. Yoon, H. K. Jeong, J. S. Pyo, J. Park, D. Kim, S. W. Kwon *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, **91**(3), 580-588 (2008).
- 7) X. Ge, M.-Y. Low, P. Zou, L. Lin, S. O. Sze Yin, B. C. Bloodworth, H.-L. Koh, *J. Pharm. Biom. Anal.*, **48**(4), 1070-1075 (2008).

Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR chemical shifts of methisosildenafil and homosildenafil in DMSO-*d*₆.

| No. | measured | | methisosildenafil ^{a)} | | homosildenafil ^{b)} | |
|-------|----------------|--|---------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | δ _c | δ _H (J in Hz) | δ _c | δ _H (J in Hz) | δ _c | δ _H (J in Hz) |
| 1 | 145.1 | - | 144.9 | - | 144.9 | - |
| 4 | 153.9 | - | 153.9 | - | 153.8 | - |
| 5-NH | | 12.21 brs | | | | 12.22 brs |
| 6 | 148.4 | - | 148.3 | - | 148.2 | - |
| 8 | 138.0 | - | 137.8 | - | 137.8 | - |
| 9 | 124.6 | - | 124.5 | - | 124.4 | - |
| 10 | 38.0 | 4.16s | 37.9 | 4.16s | 37.8 | 4.16s |
| 11 | 27.4 | 2.77t (7.5) | 27.3 | 2.77m | 27.1 | 2.77t (7.3) |
| 12 | 21.9 | 1.73qt (7, 5, 7, 5) | 21.6 | 1.71m | 21.7 | 1.73m |
| 13 | 14.0 | 0.93t (7.5) | 13.9 | 0.82m | 13.8 | 0.93t (7.3) |
| 14 | 126.6 | - | 126.3 | - | 126.0 | - |
| 15 | 130.0 | 7.83d (2.4) | 130.0 | 7.83s | 129.9 | 7.83d (2.0) |
| 16 | 123.8 | - | 123.7 | - | 123.7 | - |
| 17 | 131.6 | 7.81dd (2.4, 8.7) | 131.4 | 7.81d (8.4) | 131.5 | 7.82dd (2.5, 8.3) |
| 18 | 113.4 | 7.37d (8.7) | 113.2 | 7.36d (8.4) | 113.2 | 7.37d (9.0) |
| 19 | 159.9 | - | 159.8 | - | 159.9 | - |
| 20 | 65.0 | 4.20q (6.9) | 64.8 | 4.21q (6.8) | 64.8 | 4.21q (7.0) |
| 21 | 14.4 | 1.33t (6.9) | 14.1 | 1.22t (6.8) | 14.2 | 1.33t (7.0) |
| 24/28 | 52.0 | 1.68t (ax, 10.7) 3.45dd (eq, 2.0, 10.7) | 51.9 | 1.75d 3.44d | 45.9 | 2.89m |
| 25/27 | 49.9 | 2.73m | 49.8 | 2.77m | 51.2 | 2.41m |
| 29 | 19.1 | 0.91d (6.4) | 18.9 | 0.82m | 51.0 | 2.29q (7.3) |
| 30 | 19.1 | 0.91d (6.4) | 18.9 | 0.82m | 11.8 | 0.92 t (7.0) |

a) D. M. Choi, S. Paek, T. H. Yoon, H. K. Jeong, J. S. Pyo, J. Park, D. Kim, S. W. Kwon, *J. AOAC INT.*, **91**(3), 580-588 (2008)

b) M. H. Shiny, M. K. Hongz, W. S. Kimy, Y. J. Leey, Y. C. Jeoung, *Food Additives and Contaminants*, **20**(9), 793- 796 (2003)

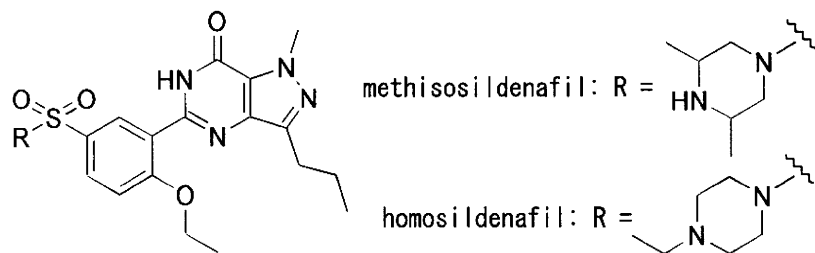


Fig. 1 Structures of methisosildenafil and homosildenafil.

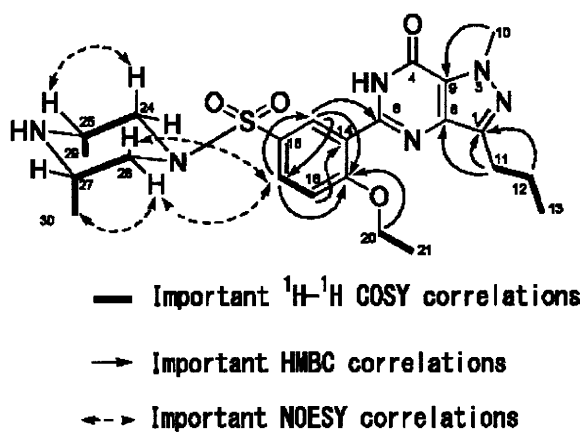


Fig. 2 ^1H - ^1H COSY and important HMBC correlations.

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と分析，有害性評価に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

「いわゆる健康食品」より検出された勃起不全(ED)治療薬類似化合物の構造

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 若菜大悟

研究要旨 地方衛生研究所より問い合わせを受けた「いわゆる健康食品」から検出されたシルデナフィル構造類似体の構造解析を行った。各種機器分析の結果から当該不明成分はアイルデナフィルが化学修飾された構造を持つと決定した。

協力研究者

鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部主任研究官

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部室長

装置及び測定条件

MS スペクトルは Thermo Fisher Scientific 製 LTQ OrbiTrap XL 型質量分析計を用い，ESI ポジティブモードで測定した。

NMR スペクトルは JEOL 製 ECA-800 および ECA-600 型核磁気共鳴装置で測定し，化学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。スピン結合定数は Hz で表示し，¹H-NMR スペクトルにおけるピークの開裂様式は singlet, doublet, triplet, quartet, multiplet, および, broad をそれぞれ, s, d, t, q, m, および, br と略記した。以下に各測定手法の略称を記載する。Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY) , Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) , Heteronuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC) 及び Incredible Natural-Abundance Double-Quantum Transfer Experiment (INADEQUATE)

A. 研究目的

強壯を謳う健康食品に無承認無許可医薬品が添加される例が増加している。その中でも既存の PDE-5 阻害剤の一部を化学修飾したヒドロキシホモシルデナフィルや *N*-オクチルノルタダラフィルなどといった ED 治療薬構造類似体が検出されている^{1), 2)}。このような ED 治療薬構造類似体に関して，複数の地方衛生研究所から同一の構造を持つと推定される物質の照会があった。今回，我々はその同定を目的とし，各種機器データによる構造決定を試みた。

B. 研究方法

試料及び試薬

NMR 測定用重溶媒は chloroform-*d*₃ 99.96 % および DMSO-*d*₆ 99.96% (ISOTEC 製) を用いた。

<倫理面での配慮>

本研究では，ヒト及び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。

C. 研究結果

当該物質 (1) を便宜上、チアゾアイルデナフィルと命名した。化合物 1 は無色非晶系物質であり、高分解能 MS スペクトルから、分子式 $C_{27}H_{35}N_9O_5S_2$ [$630.2272 (M+H)^+$, calcd. 630.2275 for $C_{27}H_{36}N_9O_5S_2$] と決定した。化合物 1 は酸性条件下で速やかに分解を受けアイルデナフィル (2: Fig. 1, 別名: メチソシルデナフィル, ジメチルシルデナフィル) を産生するため、2 が化学修飾された構造と推定された。 1H -NMR スペクトルから、ヘテロ原子に結合しているもの 2 つを含む 6 つのメチル水素 [δ_H 4.37s, δ_H 3.78s, δ_H 1.32t ($J = 6.9$ Hz), δ_H 0.96d (6H, $J = 6.3$ Hz), δ_H 0.95t ($J = 7.3$ Hz)], ヘテロ原子に隣接しているもの 2 つを含む 5 つのメチレン水素 [δ_H 4.06q (2H, $J = 6.9$ Hz), δ_H 3.47dd (2H, $J = 11.0, 2.8$ Hz), δ_H 2.94t (2H, $J = 7.6$ Hz), δ_H 1.84 (2H, m), δ_H 1.71t (2H, $J = 11.0$ Hz)], メチン水素が 2 つ [δ_H 2.88m (2H)], 及びオレフィン水素 4 つ [δ_H 7.86s, δ_H 7.79d ($J = 2.7$ Hz), δ_H 7.60dd ($J = 9.2, 2.7$ Hz), δ_H 6.99d ($J = 9.2$ Hz)] が観測された (Table 1)。以上から、エトキシ基、および、1,2,4-置換ベンゼン環の存在が示唆された。 ^{13}C -NMR スペクトルからメチル炭素 6 つ [δ_C 39.1, δ_C 33.0, δ_C 18.9 (2C), δ_C 14.3, δ_C 13.8], メチレン炭素 5 つ [δ_C 64.7, δ_C 51.7 (2C), δ_C 27.7, δ_C 21.9], メチン炭素 2 つ [δ_C 50.1 (2C)], 水素原子と隣接している sp^2 炭素 4 つ [δ_C 139.2, δ_C 131.5,

δ_C 130.0, δ_C 113.1], 4 級 sp^2 炭素が 10 個 [δ_C 160.7, δ_C 154.6, δ_C 150.1, δ_C 149.0, δ_C 146.7, δ_C 143.5, δ_C 128.2, δ_C 127.3, δ_C 126.6, δ_C 115.2] 観測された (Table 1)。以上のデータから、1 の 1H - および ^{13}C -NMR データは 2 の NMR データと相似した値を示しており、1 は 2 の誘導体と示唆された。

以上を基に本物質の構造を決定するため、各種二次元 NMR スペクトルの測定を行った (Fig. 2)。2D-INADEQUATE スペクトルより、14 位, 15 位, 16 位, 17 位, 18 位および 19 位の炭素からなるベンゼン環とその 14 位の炭素に隣接する 6 位の炭素からなる部分構造, 13 位から連続した 12 位, 11 位, 1 位, 8 位, 9 位および 4 位の炭素からなる部分構造, 20 位と 21 位の炭素からなるエトキシ基, および, 24 位, 25 位, および, 29 位の炭素からなるジメチルピペリジン環を構成する部分構造が示唆された。HMBC スペクトルからは、20 位のメチレン水素から 19 位の炭素へ相関が見られた事から、19 位の炭素上にエトキシ基が存在すると示唆された。また、10 位のメチル水素から 9 位の sp^2 炭素へ HMBC 相関が見られた。側鎖部分は HMBC スペクトルの解析結果からは、24 位のメチレン水素から 28 位の炭素へ相関が観測されたため、2,6-ジメチルピペラジン構造を持つと決定した。以上のデータから 1 はアイルデナフィル構造を母核として持ち、 $C_4H_4N_3OS$ の部分構造により修飾されていると示唆された。修飾箇所を確認するため、1 と 2 の 1H -NMR スペクトルの比較を行った (Table 2)。1 の 1H -, および ^{13}C -NMR スペクトルのケミカルシフトから 2 の値を引いた値を Fig. 3 に示す。その結

果、10位のメチル水素が最も大きくシフトしており、ピペラジン環の水素は両者ともほぼ同じ値を示した。よって、1は2のプリン環のR¹からR⁴のどれかが修飾された構造と示唆された。

部分構造を決定するため、各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析を行った。HMBC スペクトルでは 33 位のオレフィン水素から 31 位および 32 位の sp² 炭素へ、34 位のメチル水素から 31 位および 33 位の sp² 炭素へ相関が観測された。¹H-¹⁵N HMBC スペクトルからは、33 位のオレフィン水素から 35 位および 36 位の窒素へ、34 位のメチル水素から 35 位の窒素へそれぞれ相関が確認された。しかし、本物質において、これらのデータを満たす構造は、決定されていない。

D. 考察

今回、いわゆる健康食品から単離された物質について、MS スペクトルから分子式 C₂₇H₃₅N₉O₅S₂ を示し、各種 NMR スペクトルの解析結果から、アイルデナフィルを母核とし、分子式 C₄H₄N₃O₅ の部分構造により修飾された構造と決定した。修飾位置はアイルデナフィルとメチソアイルデナフィルの ¹H- および ¹³C-NMR データの差を詳細に検討した結果から、プリン環に置換基が導入されたと決定した。さらに ¹⁵N-NMR データの比較を行う事により、修飾部位は確定できると考えられる。

化合物 1 は酸性条件下でアイルデナフィル (2) を生成する。そのため、経口摂取時に体内で 2 が産生されると考えられる。化合物 2 は、近年、「専ら医薬品として使用される成分本質

(原材料) リスト」に掲載された物質であり (平成 23 年 1 月 20 日、薬食発 0120 第 1 号「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」)、1 の摂取はこれを間接的に摂取する事に繋がるため、慎重に規制に関する検討を行う必要がある。

化合物 1 と類似の構造を持つと考えられる化合物として、venhuis らにより報告されている ニトロソプロデナフィル (Fig. 4) が挙げられる³⁾。本物質はアイルデナフィルアナログであり、*N*-メチル-*N*-ニトロソ-1,3-チアゾール-5-アミン 構造を持つ。化合物 1 が本部分構造を持つと仮定した場合、二次元 NMR スペクトルの結果は良く適合する。しかし、¹H-, ¹³C-, ¹⁵N-NMR データは文献値と異なる部分がある為、さらなる研究を行う必要が考えられる。

E. 結論

本研究は、無承認無許可医薬品の調査、及び、分析を目的とし、「いわゆる健康食品」に含有されていた ED 治療薬類似構造物質の同定を行った。

¹H- および ¹³C-NMR スペクトルの解析結果から、アイルデナフィルを母核とし、ピリミジン環が化学修飾された構造と示唆された。しかし、化学修飾部位の構造は決定されていない。今後、メチソシルデナフィルの ¹⁵N-NMR スペクトルの測定、ニトロソプロデナフィルの化学合成、および、1 とニトロソプロデナフィルの各種機器データの詳細な比較を行う必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

直接的な健康危機情報はない。

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

特になし

参考文献

- 1) T. Hasegawa, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, Y. Haishima, N. Kawahara, Y. Goda, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **49**(4), 311-315 (2008).
- 2) T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara, *Chem. Pharm. Bull.*, **57**(2), 185-189 (2009).
- 3) B. J. Venhuisa, G. Zomerb, M. Hamzinkb, H. D. Meiringb, Y. Aubinc, D. de Kaste, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**(4), 735-741 (2011).

Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data of thiazoidalenafil (1)in chloroform-*d*₁

| | thiazoidalenafil (1) | | |
|-------|----------------------|------------|----------------------------------|
| | δ_C | δ_N | δ_H (J in Hz) |
| 1 | 146.7 | | - |
| 2 | | 327.0 | - |
| 3 | | 163.0 | - |
| 4 | 149.0 | | - |
| 5 | | | - |
| 6 | 154.6 | | - |
| 8 | 143.5 | | - |
| 9 | 128.2 | | - |
| 10 | 39.1 | | 4.37s |
| 11 | 27.7 | | 2.94t (7.6) |
| 12 | 21.9 | | 1.84m |
| 13 | 13.8 | | 0.95t (7.3) |
| 14 | 127.3 | | - |
| 15 | 131.5 | | 7.79d (2.7) |
| 16 | 126.6 | | - |
| 17 | 130.0 | | 7.60dd (2.7, 9.2) |
| 18 | 113.1 | | 6.99d (9.2) |
| 19 | 160.7 | | - |
| 20 | 64.7 | | 4.06q (6.9) |
| 21 | 14.3 | | 1.32t (6.9) |
| 24/28 | 51.7 | | 1.71t (11.0), 3.47dd (2.8, 11.0) |
| 25/27 | 50.1 | | 2.88m |
| 26 | | 63.8 | - |
| 29/30 | 19.2 | | 0.96d (6.3) |
| 31 | 115.2 | | - |
| 32 | 150.1 | | - |
| 33 | 139.2 | | 7.86s |
| 34 | 33.0 | | 3.78s |
| 35 | | 176.5 | - |
| 36 | | 251.8 | - |