

抗精神病薬リスペリドンと茶葉カテキンとの相互作用メカニズム  
(1) エピガロカテキンガレートとの不溶性複合体の形成

池田浩人,\* 森脇英恵, 湯川美穂, 岩瀬由紀子, 安藝初美

**Mechanism of Interaction between Risperidone and Tea Catechin**  
**(1) Complex Formation of Risperidone with Epigallocatechin Gallate**

Hirohito IKEDA,\* Hanae MORIWAKI, Miho YUKAWA, Yukiko IWASE, and Hatsumi AKI  
*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma,  
Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan*

(Received May 13, 2010; Accepted July 29, 2010)

The mechanism of complexation between risperidone (RISP) and (–)-epigallocatechin gallate (EGCg) was clarified by <sup>1</sup>H-NMR and molecular modeling studies. RISP and EGCg formed an insoluble complex with a 1 : 1 stoichiometry in aqueous solution. In the <sup>1</sup>H-NMR spectra of RISP in DMSO-d<sub>6</sub>, the chemical shifts of protons neighboring the N atom on the piperazine ring clearly moved downfield upon formation of the complex. In the molecular modeling study, the <sup>1</sup>H-chemical shifts for nine optimized structures of the complex were calculated to compare them with those of the experimental results. Only one conformer with the second minimum energy for the complex supported the downfield shifts of RISP protons. It was found from the structure of the complex that the two hydrogen bonds between hydroxyl groups of the galloyl ring in EGCg and N atoms in RISP, one of which was on the piperazine ring, were formed to stabilize the complex.

**Key words**—tea catechin; risperidone; epigallocatechin gallate; <sup>1</sup>H-NMR spectrometry; computational chemistry; molecular modeling

緒 言

茶葉抽出飲料の旨味と渋味を醸し出す重要な成分である茶葉カテキンには、(–)-epigallocatechin gallate や(–)-epigallocatechin などがある。カテキンには肥満抑制作用<sup>1,2)</sup> 抗酸化作用<sup>3,4)</sup> 抗がん作用<sup>5,6)</sup>などの生理的作用が報告されており、最近では飲料水のみならず生活習慣病予防効果を指向して、カテキン含有の様々な健康食品やサプリメントなどが上市されている。その一方、薬物との併用で薬物吸収率の変化や薬効低下など種々の問題をも抱えている。例えば、統合失調症治療薬リスペリドン risperidone (RISP) の内用液を苦味軽減のために茶葉抽出飲料(緑茶、紅茶、ウーロン茶等)で希釈して服用すると RISP 含量が低下する。その原因として RISP と茶葉カテキンとの不溶性複合体形成<sup>7)</sup>が考えられるが、メカニズムや複合体の分子構造は

いまだ明らかではない。

厚生労働省の統計報告によると、平成8年以降、統合失調症の推計患者数は徐々に増え続けており、平成17年の時点で約25万人の患者がいると推定されている。RISP<sup>8,9)</sup>は、第2世代抗精神病薬と称される薬物群に属し、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断作用により激越や攻撃性が低い急性期の患者に対する第一選択薬である。この薬物群の主副作用の1つに食欲亢進による体重増加があり、実際に第2世代抗精神病薬を服用している患者らのブログによると、体重増加が気になるためにカテキンのダイエット効果を期待し、一日に大量の茶葉カテキンを含む飲料やサプリメントを摂取している状況が記されている。十分な服薬指導が行われているにもかかわらず、統合失調症を発症している患者が、処方薬とともになんらかの形で茶葉カテキンを摂取している可能性がある。茶葉抽出飲料やサプリメント中の茶葉カテキンと第2世代抗精神病薬との間でなんらかの有害な相互作用が生じれば、統合失調症に対する十

福岡大学薬学部

\*e-mail: ikeda@fukuoka-u.ac.jp

分な治療効果を期待できないことになる。よって RISP のような茶葉抽出飲料との併用注意薬物について相互作用機構を詳細に解析することは、他薬物と茶葉カテキン含有健康食品と新たな相互作用誘発因子の探索に貢献することになる。

本論文では、茶葉カテキン主成分として(-)-epigallocatechin gallate (EGCg) を選択し、<sup>1</sup>H-NMR スペクトロメトリー及び分子モデリング計算化学を用いて RISP との溶液中複合体形成メカニズムを理論的に解明した。

## 実験方法

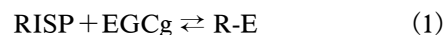
**1. 試料** リスペリドン (RISP) の標準品は、ヤンセンファーマ㈱より提供された (Risperidone, Lot.00457676). (-)-Epigallocatechin gallate (EGCg) は Sigma-Aldrich 社より購入した。なお、RISP 及び EGCg の化学構造は Fig. 1 に示した通りである。

**2. RISP と EGCg の複合体の調製** RISP 10 mg ( $2.4 \times 10^{-5}$  mol) 及び EGCg 10 mg ( $2.2 \times 10^{-5}$  mol) を正確に秤量し、それぞれ酒石酸緩衝液 (pH 3.0) 7.0 ml に溶解した。両溶液を等容量で混合し、溶液中に析出した不溶性複合体を遠心分離法により単離後、凍結乾燥を行った。

**3. <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの測定** RISP 5 mg ( $1.2 \times 10^{-5}$  mol) を 0.70 ml の DMSO-d<sub>6</sub> に溶解後、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを (日本電子製 JNM-A500 (500 MHz)) 測定し、RISP の各プロトンのケミカルシフトをヤンセンファーマ㈱から提供された RISP の <sup>1</sup>H-NMR ケミカルシフト値に基づいて同定した。また、DMSO-d<sub>6</sub> 0.70 ml 中 RISP 量を一定にして、モル比 (RISP : EGCg) が 2 : 1, 1 : 1, 1 :

2, 1 : 3, 1 : 5 となるように EGCg を添加した各溶液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。RISP のプロトンケミカルシフト ( $\delta$ ) を  $\delta_R$ , EGCg 存在下での  $\delta$  を  $\delta_{R-E}$  として、複合体形成におけるケミカルシフト変化値 ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ :  $\Delta\delta_{\text{obs}} = \delta_{R-E} - \delta_R$ ) を算出した。

RISP と EGCg がモル比 1 : 1 で複合体 RISP-EGCg (R-E) を形成すると仮定すれば、その反応式は Eq. (1) のように表され、複合体形成定数 ( $K$ ) は Eq. (2) となる。



$$K = \frac{[\text{R-E}]}{[\text{RISP}][\text{EGCg}]} \quad (2)$$

すなわち、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおける RISP 各プロトンの  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  は、Eq. (3) のように、RISP 及び EGCg の全濃度 ( $[\text{RISP}]_t$  及び  $[\text{EGCg}]_t$ ) と結合親和定数 ( $K_{\text{obs}}$ ) の関数として表される。

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{1:1}}{2K_{\text{obs}}[\text{RISP}]_t} \times (A - \sqrt{A^2 - 4K_{\text{obs}}^2[\text{RISP}]_t[\text{EGCg}]_t}) \quad (3)$$

$$A = 1 + K_{\text{obs}}[\text{RISP}]_t + K_{\text{obs}}[\text{EGCg}]_t$$

ここで、 $\Delta\delta_{1:1}$  はモル比 1 : 1 の複合体形成時における RISP 化学シフト限界値 ( $\delta_{1:1}$ ) と RISP 単体のケミカルシフト ( $\delta_R$ ) との差 ( $\Delta\delta_{1:1} = \delta_{1:1} - \delta_R$ ) である。 $[\text{EGCg}]_t$  に対する  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  の滴定曲線から、KaleidaGraph<sup>®</sup>を用いて  $\Delta\delta_{1:1}$  及び  $K_{\text{obs}}$  を算出した。

## 計算方法

**1. RISP と EGCg の水中及び DMSO 中における構造最適化計算** RISP 及び EGCg 分子の初期構造をあらかじめ Chem3D で作成し、それを基にして CONFLEX ver.6.12a による配座解析を行っ

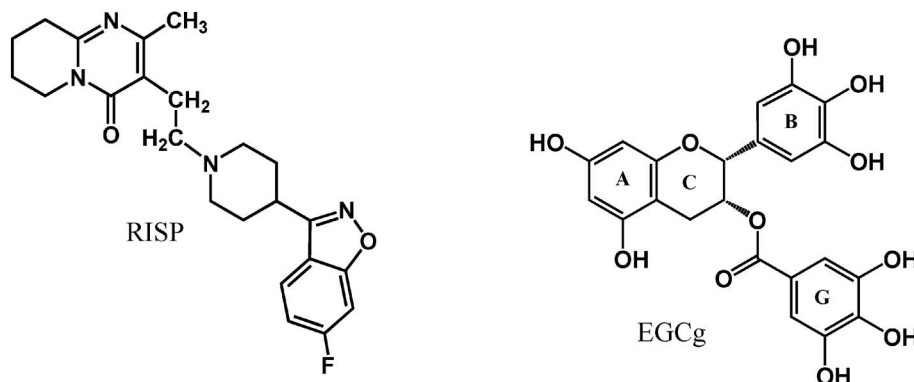


Fig. 1. Chemical Structures of Risperidone (RISP) and (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCg)

た。配座解析によって生成した百数十種類の配座のうち、最小エネルギーレベルから+3.0 kcal/mol までのエネルギーレベルにある配座について、水中及び DMSO 中を仮想して構造最適化を行った。構造最適化及びトータルエネルギーの計算は Gaussian 03 revision D.01<sup>10)</sup> プログラムを使用し、密度汎関数法 (DFT) を用い B3PW91/cc-pVDZ レベルで行った。水及び DMSO の誘電体モデルは Onsager モデル<sup>11)</sup>を用いた。

さらに RISP 分子に関しては、DMSO 中での最安定構造分子について <sup>1</sup>H-NMR ケミカルシフト値を B3LYP/6-311+G (2d,p) レベルで計算した。

## 2. 複合体 R-E の初期構造の構造最適化計算

RISP と EGCg の水中での最適化構造を組み合わせることで数種の複合体 R-E の初期構造を作成し、それらすべての複合体 R-E について水中及び DMSO 中での構造最適化計算を DFT を用いて B3PW91/cc-pVDZ レベルで行った。さらに、構造最適化計算で得られた 9 種の複合体 R-E の安定構造分子について、DMSO 中の <sup>1</sup>H-NMR ケミカルシフト値を B3LYP/6-311+G (2d,p) レベルで計算した。

## 結 果

1. 水溶液中における RISP と EGCg との不溶性複合体形成 酒石酸緩衝液 (pH 3.0) に溶解した RISP 及び EGCg を等容量ずつ混合したとこ

ろ、溶液は直ちに白濁し、アモルファス状の不溶性物質が表出した (Fig. 2)。この不溶性物質を単離して FAB-MS スペクトルを測定した結果、RISP と EGCg のモル比 1:1 の複合体 R-E であることが判明した。<sup>7)</sup>

Figure 3 には、単離した複合体 R-E の DMSO-d<sub>6</sub> 溶媒中 <sup>1</sup>H-NMR スペクトル及び RISP と EGCg 単独の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示している。複合体 R-E では、RISP のピペリジン環窒素原子近傍プロトン (図中 e<sup>ax</sup>, e<sup>eq</sup>, h, i, k<sup>eq</sup> で表している) のピークが低磁場に移行した。EGCg のプロトンケミカルシフトにはほとんど変化はみられなかった。

2. DMSO-d<sub>6</sub> 溶媒中、RISP プロトンケミカルシフト変化 複合体 R-E 形成によって低磁場に移行する RISP 分子の特定プロトン (e<sup>ax</sup>, e<sup>eq</sup>, h, i, k<sup>eq</sup>) について、シフト変化に及ぼす EGCg の影響を検討した。DMSO-d<sub>6</sub> 溶媒中、モル比が RISP:EGCg = 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 となるように EGCg を添加した各溶液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し、EGCg 存在下と非存在下におけるケミカルシフト変化値 ( $\Delta\delta_{\text{obs}}$ ) を算出した。Figure 4 は、添加した EGCg 濃度 ( $[\text{EGCg}]_t$ ) に対する  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  の滴定曲線を示している。この結果、窒素原子に隣接した炭素原子に結合する e 及び i プロトンが最も影響を受け易く、 $[\text{EGCg}]_t$  が増加するほど  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  は著しく増大した。

さらに、各プロトンの結合親和定数 ( $K_{\text{obs}}$ ) を算

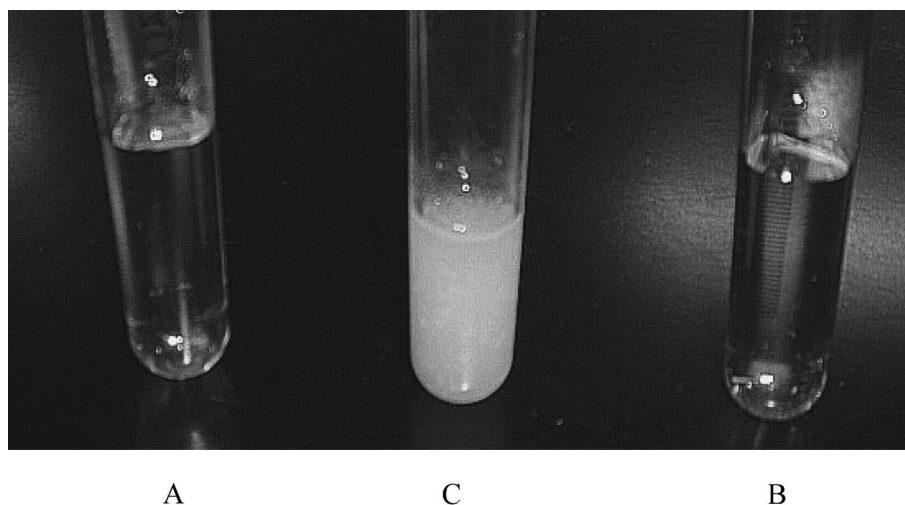


Fig. 2. Aqueous Solutions of RISP (A), EGCg (B), and the Mixture (C)

A, a buffer solution (pH 3.0) dissolving RISP (10 mg); B, a buffer solution (pH 3.0) dissolving EGCg (10 mg); C, a mixed solution of A and B in equal volumes.

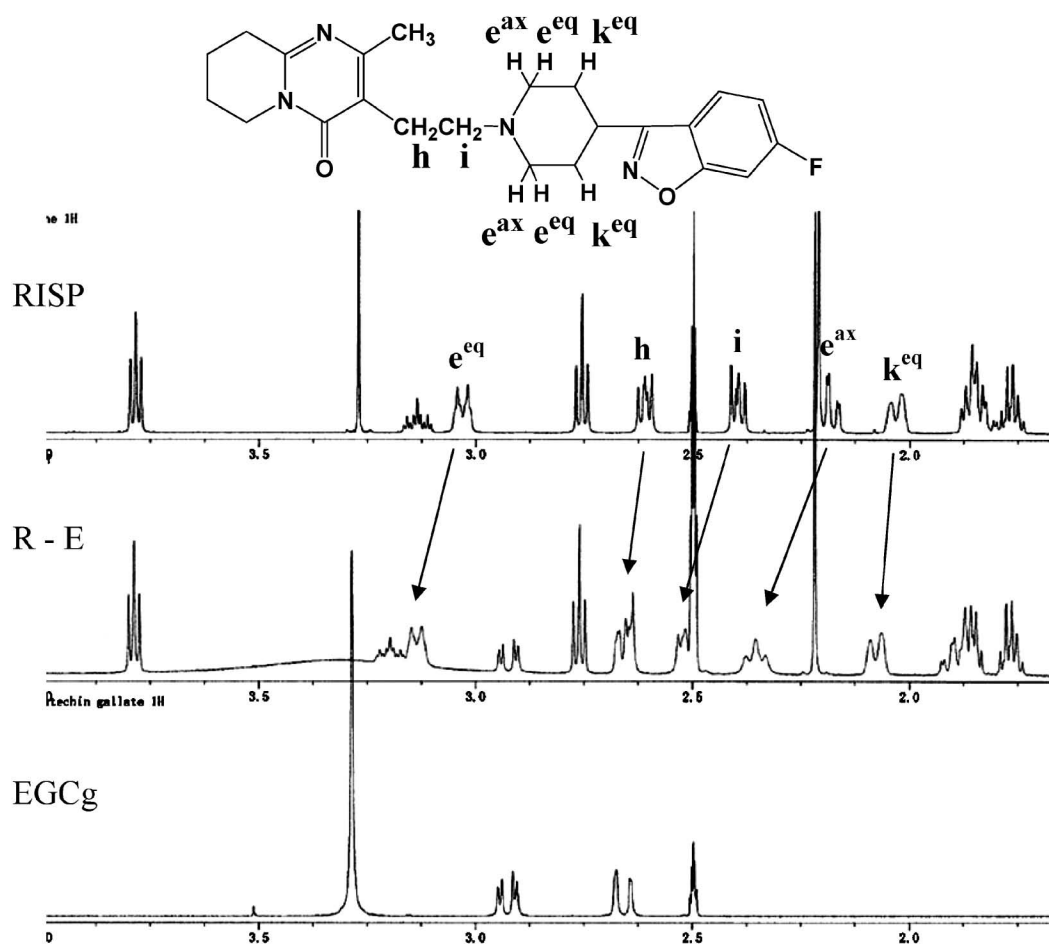


Fig. 3.  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of RISP, EGCg and the Complex (R-E) in  $\text{DMSO-d}_6$   
 The symbols of  $e^{\text{ax}}$ ,  $e^{\text{eq}}$ ,  $h$ ,  $i$ , and  $k^{\text{eq}}$  represent neighboring protons to N atom in piperidine ring of RISP.

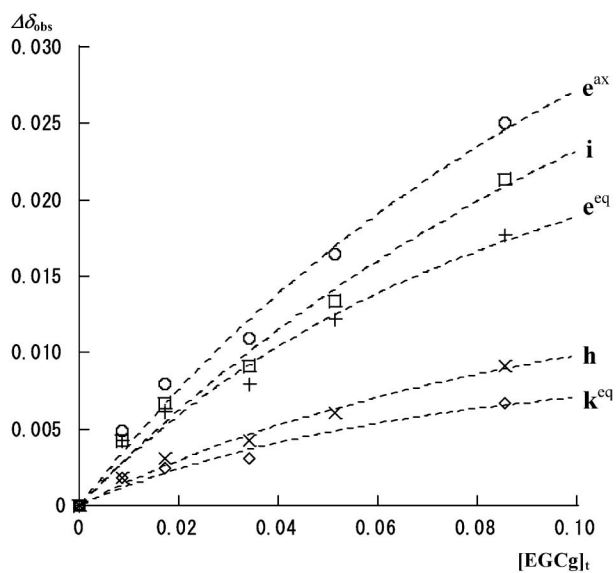


Fig. 4. Changes in  $^1\text{H-NMR}$  Chemical Shifts of  $e^{\text{ax}}$ ,  $e^{\text{eq}}$ ,  $h$ ,  $i$ , and  $k^{\text{eq}}$  Protons of RISP in  $\text{DMSO-d}_6$

Points show experimental results of the protons,  $\circ$ ;  $e^{\text{ax}}$ ,  $+$ ;  $e^{\text{eq}}$ ,  $\times$ ;  $h$ ,  $\square$ ;  $i$ , and  $\diamond$ ;  $k^{\text{eq}}$ . Dotted lines are the fitting curves for each proton using Eq. (3).

Table 1. Binding Parameters and the Maximum Chemical Shift Changes of RISP Protons Assuming a Complex R-E with 1 : 1 Molar Ratio

Proton	$K_{\text{obs}}$ (1/mol)	$\Delta\delta_{1:1}$ (ppm)
$e^{\text{ax}}$	6.56	0.07
$e^{\text{eq}}$	10.4	0.04
$h$	8.80	0.02
$i$	5.45	0.07
$k^{\text{eq}}$	14.0	0.01

出するため、滴定曲線を Eq. (3) に従って解析した。Figure 4 における破線は、Table 1 にまとめた  $K_{\text{obs}}$  と  $\Delta\delta_{1:1}$  の最適値によるフィッティング曲線を表している。  $K_{\text{obs}}$  は、  $i < e^{\text{ax}} < h < e^{\text{eq}} < k^{\text{eq}}$  のプロトンの順に大きく、EGCg 分子との複合体形成における立体的方向性がみられた。また、ピペリジン環窒素に最も近い  $e^{\text{eq}}$  及び  $i$  プロトンの  $\Delta\delta_{1:1}$  が最も大き

く、複合体 R-E 生成によりピペリジン環窒素に隣接するプロトンの電子密度が大きく低下することが判明した。各プロトンのすべての  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  に関してグローバルフィットしたとき、 $K_{\text{obs}}$  と  $\Delta\delta_{1:1}$  はそれぞれ、9.73 l/mol と 0.04 ppm であった。これらの値は、Table 1 に示す  $K_{\text{obs}}$  の平均値 ( $9.04 \pm 3.381$  l/mol) 及び  $\Delta\delta_{1:1}$  の平均値 ( $0.04 \pm 0.03$  ppm) とほぼ一致した。

**3. 分子モデリングによる RISP と EGCg の水中での最安定構造の決定** 水中における RISP 及び EGCg について構造最適化計算を行った結果、それぞれの最安定構造を Fig. 5 に示した。RISP はピペリジン環部分を中心に両端の置換基がトランス位に配置しており、分子全体が折れ曲がった構造となった。EGCg は、Fig. 1 で示した A, B, G 環がそれぞれにほぼ直交した構造であった。

**4. RISP 及び複合体 R-E の  $^1\text{H-NMR}$  ケミカルシフト計算** 分子モデリング計算で決定した水中の最安定構造が実際と一致するかどうかを検討するため、最安定構造を有する RISP について DMSO 溶媒中の各プロトンケミカルシフト値 ( $\delta_{\text{R,cal}}$ ) を計算して、実験値 ( $\delta_{\text{R}}$ ) と比較した (Table 2)。表中にはピペリジン環窒素原子近傍のプロトンの  $\delta$  値を記載しているが、ケミカルシフトは  $e^{\text{eq}}$ ,  $h$ ,  $i$ ,  $e^{\text{ax}}$ ,  $k^{\text{eq}}$  プロトンの順に低磁場から高磁場に位置し、 $\delta_{\text{R}}$  と  $\delta_{\text{R,cal}}$  の値もほぼ一致した。その他のプロトンについても同様であった。

複合体 R-E については、初めに、Fig. 5 に示した水中での RISP と EGCg の最安定構造を組み合わせる数十種類の R-E の初期構造を作成し、各構造について水中での構造最適化を行った。その結果、最小エネルギーレベルを有する構造からエネルギー

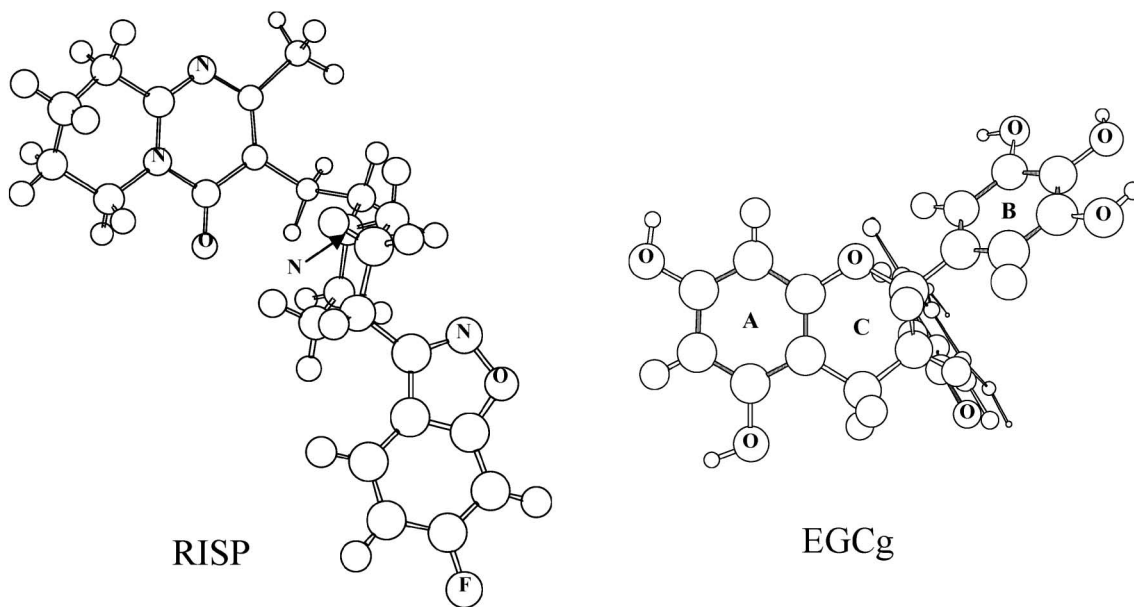


Fig. 5. Optimized Conformations of RISP and EGCg in  $\text{H}_2\text{O}$  Obtained by DFT

Table 2. Observed and Calculated  $^1\text{H-NMR}$  Chemical Shift Values for RISP and Complex R-E in  $\text{DMSO-d}_6$

	RISP ( $\delta$ , ppm)		Complex R-E ( $\delta_{\text{R-E,cal}}$ , ppm)								
	$\delta_{\text{R}}$	$\delta_{\text{R,cal}}$	R-E1	R-E2	R-E3	R-E4	R-E5	R-E6	R-E7	R-E8	R-E9
$e^{\text{eq}}$	3.02~3.04	2.98	2.85	3.29	2.94	3.59	3.08	2.89	3.63	2.94	2.86
$h$	2.59~2.63	2.93	2.74	3.15	3.03	2.88	2.93	2.89	2.91	2.85	2.92
$i$	2.38~2.41	2.58	2.51	2.79	2.82	2.84	2.63	2.56	2.86	2.59	2.66
$e^{\text{ax}}$	2.16~2.19	2.31	2.29	2.36	2.32	2.40	2.08	2.29	2.27	2.27	2.39
$k^{\text{eq}}$	2.02~2.04	2.17	2.31	2.42	1.64	2.27	2.04	2.25	2.16	1.87	1.84

ギーの低い順に、9種類の固有な構造 (R-E1~R-E9) を最終的に決定した。これらの構造について、さらに DMSO 中の構造最適化を行い各プロトンケミカルシフト値 ( $\delta_{R-E,cal}$ ) を計算した (Table 2)。複合体 R-E の形成によって RISP ピペリジン環周辺のプロトンが低磁場に移行する (Fig. 3) ことを考慮すると、9種類の複合体 R-E のうち、これらの  $\delta_{R-E,cal}$  値がすべて  $\delta_{R,cal}$  値よりも大きいのは R-E2 のみであった。

## 考 察

$^1\text{H-NMR}$  スペクトロメトリー及び分子モデリングによるプロトンケミカルシフトから推定される複合体 R-E2 の構造を Fig. 6 に示した。この複合体 R-E2 は、水中において2番目に低いトータルエネルギーを有し、熱力学的にも安定な構造であった。また、分子モデリング計算において EGCg 部分の G 環 (galloyl 基) の有する水酸基が RISP 部分の窒素原子と2カ所で水素結合を形成していることが判明した (Fig. 6)。EGCg 添加による RISP のピペリジン環周辺プロトンのケミカルシフトの低磁場移行は、この水素結合によって RISP のピペリジン環

窒素の電子密度が増大し、それに伴い周辺プロトンの電子密度が低下したためと考えられ、特に、窒素原子に隣接した e 及び i プロトンの  $\Delta\delta_{obs}$  が EGCg 濃度の増加で大きく低磁場シフト変化し (Fig. 4)、さらに  $k^{eq}$  と  $e^{eq}$  の  $K_{obs}$  の値が大きいことから、RISP 分子の中でもピペリジン環が最も EGCg 分子との結合親和性が高いと推察される (Table 1)。

安藝らの結果<sup>7)</sup>によると、水溶液中での RISP と EGCg の結合定数が  $K=1540\pm 180\text{ l/mol}$  と比較的小さく、複合体形成にはイオン性相互作用や共有結合のような大きな分子間相互作用は働いていないとされている。さらに、galloyl 基を有する EGCg の方が (-)-epigallocatechin よりも RISP との結合性が高く、複合体形成における galloyl 基の重要性も示唆されている。

以上の結果、水溶液中 RISP は茶葉カテキンの主成分である EGCg と混合すると瞬時に不溶性複合体 R-E を形成するが、その複合体形成時には RISP のピペリジン環と EGCg の galloyl 基を中心に弱い分子間相互作用が誘起され、EGCg の galloyl 基の水酸基と RISP 窒素原子間の水素結合が複合体 R-E の安定構造を支えていることが明らかになった。

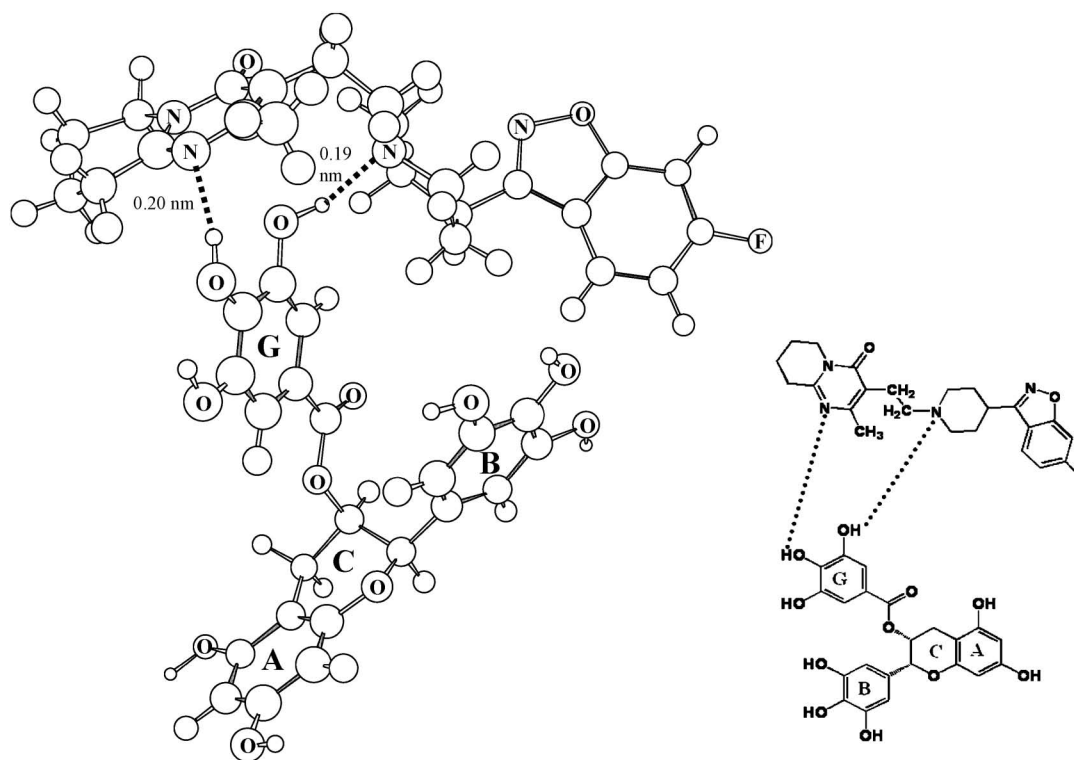


Fig. 6. Optimized Conformation of Complex R-E2 between RISP and EGCg in  $\text{H}_2\text{O}$ . Dotted lines in the complex represent hydrogen bonds between RISP and EGCg.

**謝辞** 本研究の非経験的分子軌道計算及び密度汎関数法による計算を行うにあたり、九州大学情報基盤研究開発センター、大阪大学サイバーメディアセンター並びに自然科学研究機構岡崎共通研究施設計算科学研究センターを利用させて頂きましたことに感謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Zheng G., Sayama K., Okubo T., Juneja L R., Oguni I., *In Vivo*, **18**, 55–62 (2004).
- 2) Wolfram S., Wang Y., Thielecke F., *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 176–187 (2006).
- 3) Seeram N. P., Henning S. M., Niu Y., Lee R., Scheuller H. S., Heber D., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1599–1603 (2006).
- 4) Young J. F., Dragsted L. O., Haraldsdottir J., Daneshvar B., Kall M. A., Loft S., Nilsson L., Nielsen S. E., Mayer B., Skibsted L. H., Huynh-Ba T., Hermetter A., Sandstrom B., *Br. J. Nutr.*, **87**, 343–355 (2002).
- 5) Park S., Myoung H., Kim Y., Paeng J., Park J., Kim M., Hong S., *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, **34**, 1–10 (2008).
- 6) Landis-Piwowar K. R., Huo C., Chen D., Milacic V., Shi G., Chan T. H., Dou Q. P., *Cancer Res.*, **67**, 4303–4310 (2007).
- 7) Aki H., Ohta M., Fukusumi K., Okamoto Y., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 190–198 (2006).
- 8) Usuki M., Hayashi M., Kimura T., Yoshioka S., Murakami K., Miyakawa T., Yagi F., Funahashi T., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **33**, 411–415 (2007).
- 9) Takeda M., Kobayashi M., Kawasaki I., Awano Y., Wakasugi H., Ono A., Yano I., Okada T., Hayashi T., Inui K., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **33**, 60–65 (2007).
- 10) Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery Jr. J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A., “Gaussian 03”, Revision D.01; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- 11) Wong M. W., Frisch M. J., Wiberg K. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4776–4782 (1991).