

200711008A

平成19年度厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業：生物資源研究)

天然資源を元にした新規医薬リード化合物の
開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成20(2008)年4月

主任研究者 関田 節子

目 次

| | |
|---|----|
| I. 総括研究報告 | |
| 天然資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する研究 | 1 |
| 関田 節子 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 熱帯産薬用植物の抗リーシュマニア活性物質に関する研究 | 18 |
| 関田 節子 | |
| 2. 薬用植物資源からメタボリックシンドローム予防薬の開発 に関する研究 | 28 |
| 荻野 裕之 | |
| 3. 天然資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する 研究 | 40 |
| 黒柳 正典 | |
| 4. 天然資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する 研究 | 46 |
| 細川 敬三 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 48 |

総括研究報告書

天然資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する研究

主任研究者 関田 節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

研究要旨 創薬において遺伝子、タンパクの解析が重要とされているが、これらの機能解析に低分子化合物が欠かせない情報源であることが明らかとなり天然有機化合物が再認識されている。そこで、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの保存している国内外原産の豊富な植物資源を用いてメタボリックシンドロームに関与する生物活性、熱帯感染症に対する抗活性を検討し、ノウゼンカズラ科、トウダイグサ科の植物エキスに極めて強い抗肥満活性を見出した。また、熱帯感染症であるリーシュマニア症については、ミャンマー産カキ科、クマツヅラ科、マメ科植物、ペルー産コショウ科植物の新規および既知 7 化合物に強い活性を認めた。

分担研究者

浏野 裕之・独立行政法人医薬基盤
研究所薬用植物資源研究センター・
主任研究官
黒柳正典・県立広島大学・教授
細川敬三・兵庫大学・教授

各地から薬用植物資源を収集しており、保有する薬用植物資源は数千種類に及ぶ。そこで、これらの資源を活用し、近年注目されている国民病とも言えるメタボリックシンドロームや生活習慣病に対する新規医薬品開発また、熱帯感染症治療薬のための資源として活用する道を拓く。メタボリックシンドロームは脳卒中や糖尿病などの生活習慣病を引き起こす「国民病」として注目されている。過食や運動不足などの生活習慣で肥満になると、インスリン抵抗性などの症状が引き起こされ、高脂血、高血圧、高血糖などの病状がほぼ同じ時期に発症し、更に生命の存続に直結する色々な疾患及び合併症が発症するといったドミノ概念で説明することができる。本研究では、このドミノの上流をターゲットとし、抗肥満、糖吸収抑制、抗高血圧、抗高脂血などの多元的スクリーニングを行うことにより、治療薬及び予防薬の開発リード化合物の探索を行う。また、熱帯感染症としてWHOの6大感染症に指定されているリーシュマニア症について、主に感染地域である熱帯に分布する植物を対象に治療薬リード化合物を探索する。

A. 研究目的

全世界には約 34 万種の植物があり、画期的な医薬品の多くは民間薬として使われている薬用植物から見いだされてきた。国内では、その後のコンビナトリアルケミストリー、ハイスループットスクリーニング、ゲノム創薬等の新しい創薬手法の開発により天然医薬資源を創薬に活用する努力は低下していたが、これらの手法では新規骨格を有する化合物が得られないこと、ゲノム情報から得られた創薬ターゲットタンパク質に作用する低分子リード化合物としての天然物の重要性が再認識されていることなどから、薬用植物資源の創薬への有効活用が望まれている。

（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター（以下「センター」と略す）は、世界

近年創薬資源としてあまり重要視していない薬用植物資源の価値を再認識させる契機となることが期待され、また国民の健康安心や健康安全の確保につなげることを最終の目的とする。

19年度は植物に関する情報を積極的に収集して植物の絞り込みを行うとともに、作成したエキス、分画後のフラクションについて生物活性スクリーニングを行った。スクリーニングで活性の認められた抗リーシュマニア活性植物については成分の単離・精製・構造決定を行い、新規5化合物、強い活性を示す7化合物を得た。

B. 研究方法

1. 文献調査とエキス作成

センター保有の植物について文献調査（主に直近の *J. Ethnopharmacology* など）を行い、民間薬的に利用されていても科学的な検証が着手されていないか、あるいは化合物レベルまで十分に検証されていない薬用植物および同属植物の絞り込みを行い、センター保有の植物を可能な限り採取し、それらの抽出エキスを作成した。また、徳島文理大学香川薬学部保有の熱帯産薬用植物も用いた。

2. 活性試験

スクリーニングに使用するサンプルの処理濃度としてはエタノールで10%の濃度に溶解させたエキスサンプルをPBSや培地にて1/100, 1/1000の倍率で希釈して用いた。

(1) 抗肥満物質探索アッセイ

前駆脂肪細胞である3T3-L1細胞を用いて、脂肪細胞の分化を阻害する物質を探索する。刺激物質により前駆脂肪細胞は脂肪細胞に分化し、肥大化していく。脂肪細胞分化のマーカーとして細胞内に脂肪滴が形成され、細胞分化と共に大きくなる。脂肪滴の形態的変化や脂肪滴の定量を行い、脂肪細胞の分化に及ぼすサンプルの影響を評価する。評価指標としては脂肪滴を染め、コントロールを1.0とし

た相対値で表した。

(2) インスリン抵抗性抑制物質アッセイ

前駆脂肪細胞である3T3-L1細胞を用いて、アディポネクチン (Adiponectin) の定量をELISA手法にて測定する。刺激剤により脂肪細胞の分化が誘導され、脂肪細胞が肥大化するとアディポネクチンの分泌量が低下する。アディポネクチンの生成低下を抑制する物質を探索する。処理濃度としてはエタノールで10%の濃度に溶解させたサンプルを培地にて1/100, 1/1000の倍率で希釈して用いた。評価指標としてはコントロールを1.0とした相対値で表した。

(3) 抗高血圧アッセイ

血管収縮、血圧上昇作用を持つACE (アンジオテンシン交換酵素) を阻害する物質を探索した。

(4) 抗高脂血アッセイ

ヒト腸管上皮細胞であるCaco-2細胞(オリジナルクローン細胞)を用いて腸管上皮のモデルを作り、吸収されるコレステロールを測る。これによりコレステロールの吸収を抑制する物質の探索を行う。コレステロールの測定には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)手法を用いる。Apicalサイトにおけるコレステロール濃度を定量し、コントロールを1.0とし処理区と比較を行った。

(5) 糖吸収抑制物質の探索アッセイ

ヒト腸管上皮細胞(Caco-2)を用いて、糖吸収を抑制する物質を探索する。Caco-2細胞をトランズウェルの上で単層形成させ、分泌される α -グリコシターゼ(二糖類をグルコースに分解する酵素)を阻害する物質を探索する。Apicalサイトにおけるグルコース濃度を定量し、コントロールを1.0とし処理区と比較を行った。

(6) α -グリコシターゼ (スクラーゼとマルターゼ) の阻害活性

酵素は市販のラット小腸 α -グリコシターゼを、基質としてスクロースまたはマルト

スを用い、遊離するグルコース量の減少によって阻害活性を算出した。

(7) α -アミラーゼ阻害活性

酵素は市販のブタ膵臓 α -アミラーゼを、基質に青色色素結合デンブレン溶液を用い、遊離色素の減少率によって阻害活性を算出した。

(8) リパーゼ阻害活性

酵素は市販のブタ膵臓リパーゼを、基質にオレイン酸 4-メチルウンベリフェリルをトリス塩緩衝液中に超音波処理によって分散させた溶液を使用して、遊離蛍光色素の減少率によって阻害活性を算出した。

(9) 抗酸化活性 (DPPHラジカル捕捉活性)

安定ラジカルであるDPPHと反応させ、フリーラジカルの減少率を測定してラジカル捕捉活性とした。評価値は α -トコフェロール当量に換算して算出した。

(10) 抗発がんプロモーター活性

試験物質が発がんプロモーターであるオカダ酸のプロテインフォスファターゼ 2A no 活性阻害の程度を測定した。

(11) チロシナーゼ阻害活性

酵素は市販のマッシュルーム由来チロシナーゼを使用し、基質にL-DOPAを用いて生成する褐色成分の生成量を測定した。

(12) ダイオキシン毒性阻害活性

ラット肝細胞画分に0.1nM 2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾ-パラジオキシンを添加し、活性化したアリアル炭化水素受容体の量をSW-ELISAにより測定し、その抑制率を算出した。

(13) 抗リーシュマニアの探索アッセイ

植物のメタノールエキスまたは単離した化合物の水溶液に *Leishmania* 原虫 1×10^6 /ml を加え 72 時間インキュベートした後、Tetracolor ONE (生化学工業) 試薬を加え、6時間のインキュベートの後にマイクロプレートリーダーにより OD 値 (450-630nm) を測定し、MIC (Minimum Inhibitory Concentration)、MLC (Minimum Lethal

Concentration)、LD₅₀ (50% Lethal Dose) を求めた。ポジティブコントロールとしてアンホテリシン B (AmB) を用いた。

C. 研究結果

文献調査で約 180 種類の植物をピックアップし、それらの植物体またはエキスを保有しているかどうかを調べたところ、植物体保有は全研究部合わせて 60 種、筑波研究部保有の外国産植物エキス体では 29 種で、多くの植物は薬用植物資源研究センター種子島研究部が植物体として保有していることがわかった。例を挙げると、*Helicteres isora* はネジトウガラシ、レッドイソラと称され、その樹皮の水抽出エキスに血糖降下作用があることが報告されているが、その活性本体は解明されていない。*Oroxylum indicus* はソリザヤノキと称されておりそのエキスを筑波研究部が保有している。抗糖尿病作用が報告されているが活性化合物の解明は未だされていない。ヒメウイキョウ *Carum carvi* はキャラウェイとしてその果実が香辛料として広く知られており、コレステロール低下作用、トリグリセリド低下作用、抗糖尿病があるが化合物的な検証が行われていない。本植物は種子島、北海道両研究部において植物体を保存しているため、今後量的な確保が可能であるため、インスリン抵抗性抑制物質、抗高脂血症活性を検討した。ブラジルの生薬で現地名 Pata de vaca (学名 *Bauhinia forficata*) (マメ科) はその葉が糖尿病や高血糖に効果があることが古くから知られており、ブラジルにおけるハーブ医療において重要なものとなっている。また本植物に関する多くの生物活性の報告がある。またその血糖降下作用に対する活性本体は 1940 年代から研究が行われており、Kaempferitrin が 1 つの活性本体であるとの報告がある。ブラジルにおいて本植物は糖尿病治療薬として有名であり、お茶としても飲まれ、「植物イン

スリン」とも称されているため多くの報告があるわりに化合物的な検証が少ないため、今回本植物のインスリン抵抗性抑制物質、抗肥満活性を検討した。

ブラジル生薬 *Chapeu de couro* はオモダカ科の *Echinodorus macrophyllus* であるが、本植物もブラジルのハーブ医療では有名なものである。アルゼンチン、ブラジル原産であり、その葉、茎を薬用として用いる。効果効能としては、利尿、リウマチ、抗酸化作用、脂肪分解作用などが知られている。リウマチや肝臓病にはお茶として飲まれており、浮腫、皮膚病、肌のシミなどには外用として用いられており、他には緩下剤としても用いられる。ブラジルにおいては浄血作用を示す薬草として知られ、血中コレステロールや中性脂肪を減らす作用があることが既に報告されている。国内での研究では体脂肪も減らす効果があるとされ、抗レステロール作用と利尿作用を合わせて健康食品としての注目を浴びているところである。当センターでは 1980 年代に入手した *Chapeu de couro* のメタノールエキスを保有しており、また近年、筑波研究部に、ブラジルにおいて本植物を栽培生産していた農家出身の民間人より本植物の利用法を検討してほしいという要請もあったことから今後の資源確保が可能と考え、抗肥満活性、インスリン抵抗性抑制物質活性、抗高脂血活性を検討することにした。

ペルー生薬 *Yarina* はヤシ科に分類される *Phytelephas* sp. であり、その実は非常に硬く、一般には彫り物として装飾品などに用いられているが、抗糖尿病作用も知られている。しかしながらその成分の報告を含めた科学的検証はほとんどされていないため、インスリン抵抗性抑制物質活性、糖吸収阻害活性を検討した。

ウリ科の *Coccinia grandis* はインドでは ivy gourd とも呼ばれ、血糖降下作用があるとされている。そこでインスリン抵抗性抑制

物質活性、糖吸収抑制活性を検討した。

2007 年 3 月にペルーに渡航した際、現地研究者より聞き取り調査をし、主に現地で糖尿病や動脈硬化などの治療に民間薬的に用いている植物に関する情報を入手した。その結果、*Ajo sachá*, *Marco*, *Chuchuhuasi*, *Chiric sanango*, *Clavo huasca*, *Ishanga*, *Chilca*, *Molle*, *Guanabana*, *Yarina*, *Bolsa mullaca*, *Cuti-cuti* などが用いられているという情報を得た。これらについては可能な限り入手し、活性を検討することにした。

結果として今年度 (1) - (5) のアッセイを検討した植物種は、アルゼンチン生薬 6 種類、ボリビア生薬 4 種類、ブラジル生薬 4 種類、ミャンマー生薬 20 種類、ネパール生薬 9 種類、パキスタン生薬 8 種類、ペルー生薬 27 種類、ベトナム生薬 1 種類、種子島研究部保有の植物体 10 種類、合計 89 種類であった。(Table 1)

いずれの植物体も広範囲な極性の化合物を対象にするために、極性化合物から非極性化合物まで幅広く抽出することが可能な有機溶媒であるメタノールで抽出した。

文献検索でヒットした植物の一部は薬用植物資源研究センターにおいて行なっている外国機関との種子交換業務により種子として入手し、その後筑波研究部の温室内で栽培をしている。今年度はイランの植物園から *Agrostemma githago* (Caryophyllaceae) および *Teucrium polium* (Labiatae) を導入し、20°C の発芽温度条件にて発芽させ、その後温室に移動し現在育成している。前者は *Hypocholesterolaemic* 活性があると報告されている。後者は *hypoglycemic* 活性が報告されている。

(注:以下に示す一部の植物に関しては特許取得などの理由により学名を非開示とさせていただきます。なお、それらについてはアッルフアベットあるいは科名での記載にとどめます)

糖吸収抑制活性では、現在までの結果では、

チョウジ(*Syzygium aromaticum*)、シクンシ科の植物 A に活性が認められた。植物 A においては 1/1000 濃度において約 30% の抑制活性を示した (Fig. 1)。sogaikassei deha 抗高脂血活性ではネジトウガラシ(*Helicteres isora*)、ノウゼンカズラ科の植物 B、ヒメウイキョウ(*Carum carvi*)、ホウライアオキ(*Rauwolfia vomitoria*)、ヤドリギ(*Viscum album*) に活性が認められた。引き続き検討中である。抗肥満活性においては、植物 B、トウダイグサ科の植物 C において 1/100 濃度で約 50% 近く脂肪化を抑制することが分かった。(Fig. 1)

また、インスリン抵抗性抑制物質の探索においては、現在までのところソリザヤノキ(*Oroxylum indicum*)、ウリ科の *Coccoloba grandis* に 1/1000 濃度において効果が見られており、現在残りのサンプルについてさらに検討している。(Fig. 1)

抗高血圧活性については現在検討しており、原段階では結果が開示できない。

アッセイ (6) - (12) については、センターの北海道研究部の 48 科 109 種 206 サンプル、筑波研究部の 74 科 225 種 525 サンプル、種子島研究部の 112 科 327 種 557 サンプル全 1288 点について検討した。アミラーゼ阻害活性およびスクラーゼ阻害活性では各 10 植物種、マルターゼ阻害活性では 12 植物種、リパーゼ阻害活性では 113 植物種、抗酸化活性、チロシナーゼ阻害活性および抗発がんプロモーター活性ではそれぞれ 14 植物種、ダイオキシシン毒性阻害活性では 9 植物種に強い活性が認められた。

アッセイ (13) については、ペルー産植物 MATICO に活性が認められ、含有成分 20 化合物を単離した。最も活性が強かったのは主成分で、この他のうち 10 化合物が新規化合物と構造決定された (Fig. 2)。ミャンマー産薬用植物のうち活性の認められたカキノキ科植物、クマツヅラ科植物、マメ科植物から 23 化合物を単離した。そのうち 5 化合物は新

規化合物であった。新規および既知 7 化合物に強い活性を認めた (Fig. 3-1, 3-2)。化合物が異なる種の原因に与える影響の違いをクマツヅラ科植物より得られた化合物について検討した。その結果、新規化合物を含む 3 化合物は *Leishmania major* と同様、*L. panamensis*、*L. guyanensis* に shikonin、alkanin より強い活性が認められた。しかし、*Leishmania peruviana* には活性を示さないことが明らかとなった。(Table 2)。

D. 考察および結論

糖吸収抑制活性においてチョウジ (*Syzygium aromaticum*) が活性を示したが、ムラサキフトモモ (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) が抗糖尿病作用を示すことから同属植物として候補リストに入れたものであり、文献を調査した限りでは本植物そのものの抗糖尿病効果を示す文献は見当たらない。チョウジはその成分のオイゲノールによる局所麻酔作用が有名であるが、香辛料としてもクローブとして有名であり、おもに肉の臭み取りとして広く使われている。このように香辛料として広く用いられている植物であるにもかかわらず報告されていない活性が見られたことは大変興味深い結果である。植物 A についても文献上そのものに抗糖尿病作用が報告されていたのではなく、同属のアフリカ植物の樹皮エキスに対して認められたという報告をもとに同属植物として候補植物にあげたものである。植物 B も同属植物が南米にて糖尿病に効果があると言われている植物である。ヒメウイキョウ (*Carum carvi*) は、その果実が薬理的に糖尿病とコレステロール低下作用があると認められているが、化合物の特定はされていない植物である。今回のアッセイではそれを裏付ける結果となった。

現在までのところ、すべてのサンプルのアッセイは終了していないが、活性が明らかに認められたものに対しては、さらに反復で検

証を行なう予定である。リーシュマニアに対する活性は、ペルー産コショウ科薬用植物から活性化化合物とその構造類縁体数種が得られた。今後、構造活性相関を追求するのに好適であると考えている。カキノキ科植物は、これまでに炭化水素、トリテルペン、ナフトキノン、クマリン誘導体、フラボノイド、タンニンなど多種の化合物を含有することが知られていて中国、ミャンマーでは薬用として利用されている。今年度の成分検索は画分途中であるが、未着手の画分の薄層クロマトグラフィーでは多くのスポットが検出されていることから更に強い活性化化合物が存在するものと考えられる。ミャンマー産クマツヅラ科植物は、樹皮が薬用とされている。今回、葉の成分を検討したところ新規化合物を含む3化合物が分布地域の異なる3種の原虫に対して強い活性を示すことが明らかになった。カキノキ科植物と同じく未着手のフラクションに活性化化合物が存在するものと期待される。マメ科植物は、これまでも抗菌活性、抗マラリア活性、発がん防御活性、抗プロモーター作用、TAP 誘導 EBV-EA 活性化等が報告されている。これらの作用に関与している neoflavonoid である latifolin の存在を仮定し、HPLC 分析を行ったところ今回検討した植物には含まれていなかった。また、latifolin は抗リーシュマニア原虫には活性を示さず、compd. 1 として単離された (4-(S)-methoxydalbergione に強い活性を認め、構造活性相関を考える上で興味ある結果が得られた。

次年度は今回の結果から活性が強く、なおかつ文献上で活性化化合物が解明されていないと確認された植物から、成分研究用に資源供給が可能と判断されたものをピックアップし、それら資源のエキスを作成後に、活性成分の解明に着手する。また同時にさらにエキスの活性を検討していく。また、今年度はエキス作成に時間があまり割けずに候補植

物でありながら断念した植物がかなりあることから次年度はそれらの活性も合わせて検討していく。

今年度のサンプルとして用いた植物は、今後成分研究をするにあたり量を確保することを考え、薬用植物資源研究センターが既に植物体として保有している植物種を中心に選択した結果である。しかしながら植物は時としてその同定に誤りがあり、また同じ植物種であっても含有成分に差があり、その結果活性に違いが生じることがあるため、その点に注意して進めなければならない。

しかしながら外国産を含めて多くの植物種を保有している薬用植物センターでは今までその保有植物を利用した生物活性の広範囲な利用はほとんどされておらず、今回の研究においてはその成果が多いに期待される場所である。

E. 健康危機情報 特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

(1) 鈴木亜希子、黒柳正典、湊野裕之、代田修、森加奈未、関田節子；ペルー産薬用植物 Matico の抗リーシュマニア活性物質に関する研究、日本生薬学会第 54 回年会、名古屋、2007 年 9 月

(2) 森加奈未、泉本頌子、松川龍之介、白井陽平、関田節子、湊野裕之、佐竹元吉、小林正規、武内 勤；抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索—ミャンマー産およびペルー産植物について—、日本生薬学会第 54 回年会、名古屋、2007 年 9 月

森加奈未、橋本幸大、湊野裕之、我妻 豊、佐竹元吉、楠見武徳、関田節子；抗リー

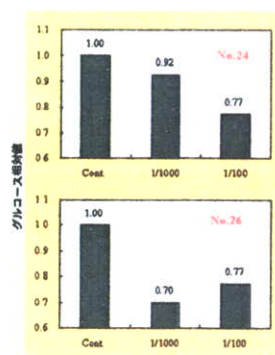
シュマニア活性を有する有用植物の探索—ミャンマー産YIUDAIKの成分について—、第128回日本薬学会、横浜、2008年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

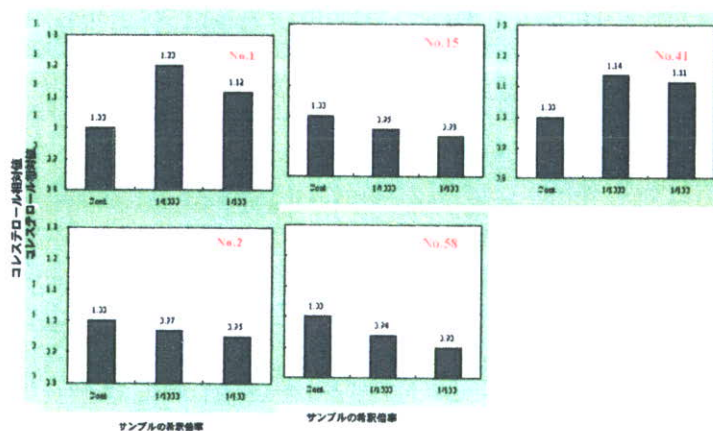
1. 特許取得 検討中
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

Fig.1 糖吸収抑制物質、抗高脂物質、抗肥満物質、インスリン抵抗性抑制物質の探索アッセイの結果

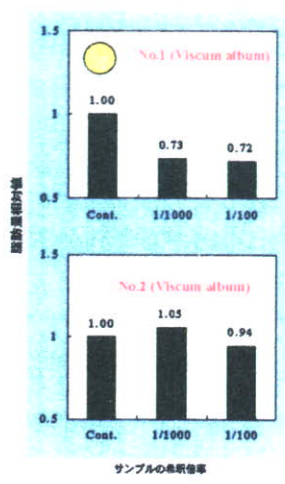
糖吸収抑制物質探索アッセイの結果



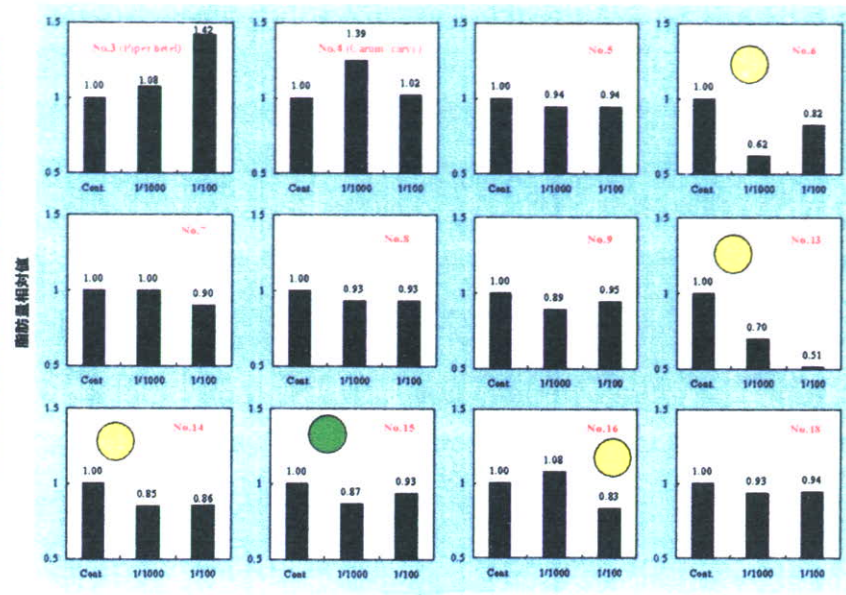
抗高脂物質探索アッセイの結果



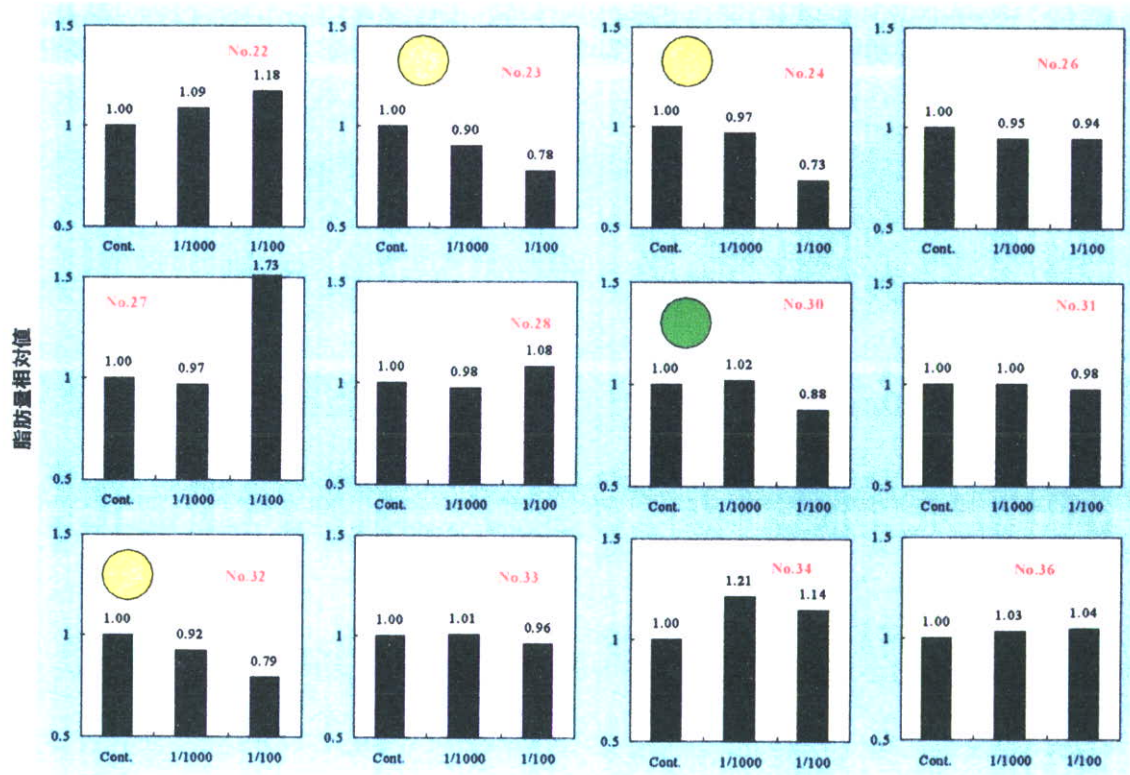
抗肥満物質の探索アッセイの結果



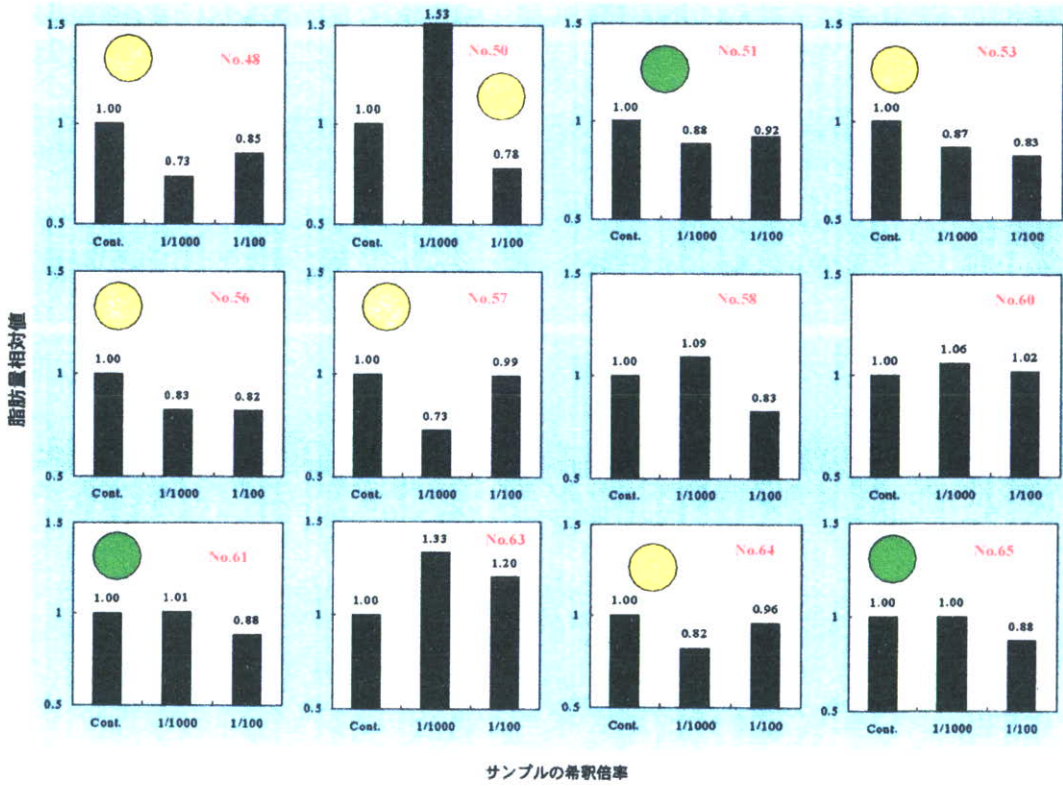
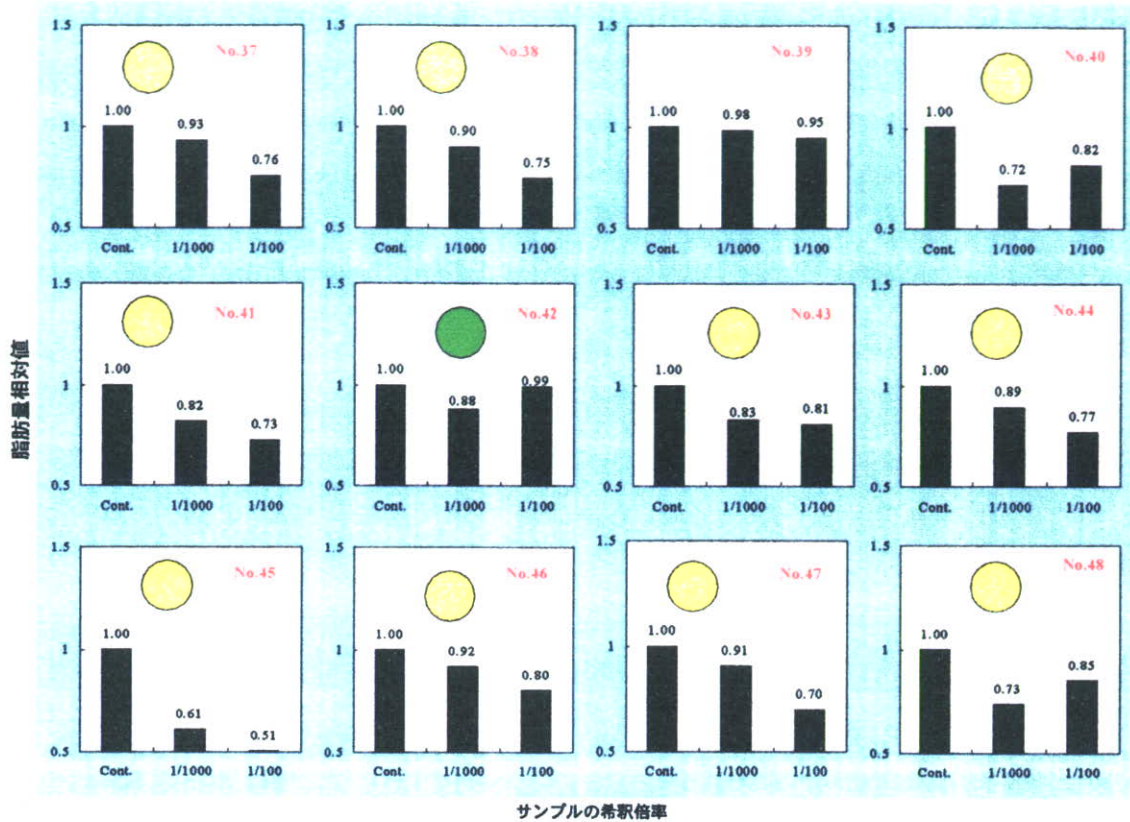
サンプルの希釈倍率

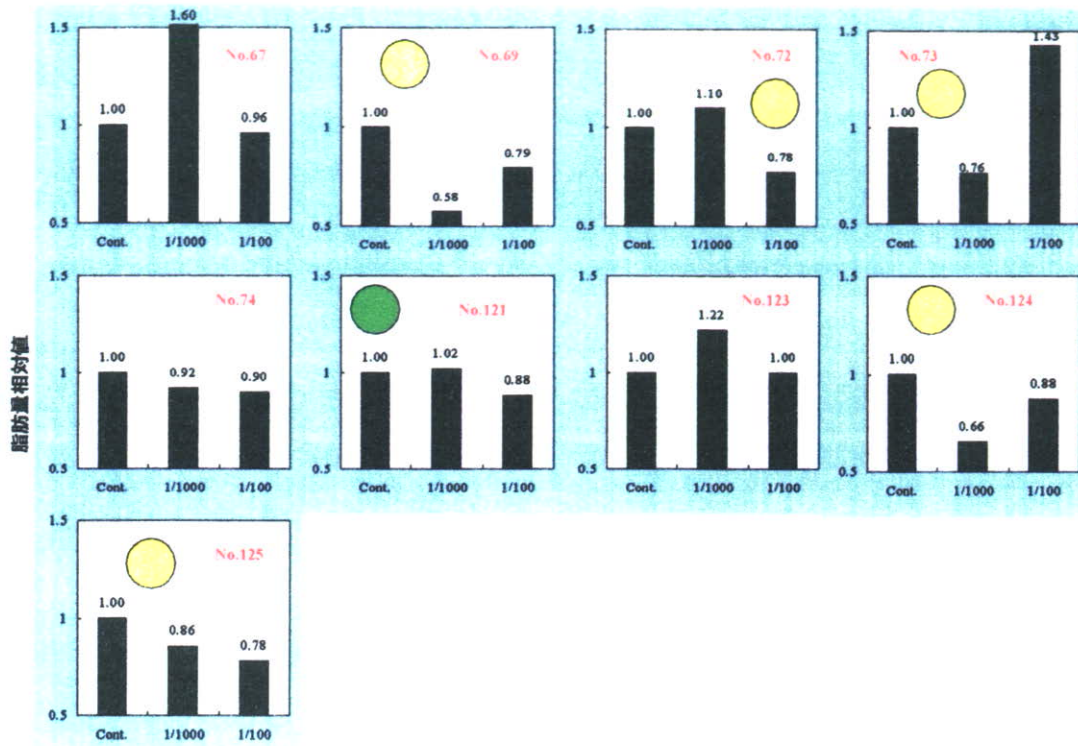


サンプルの希釈倍率



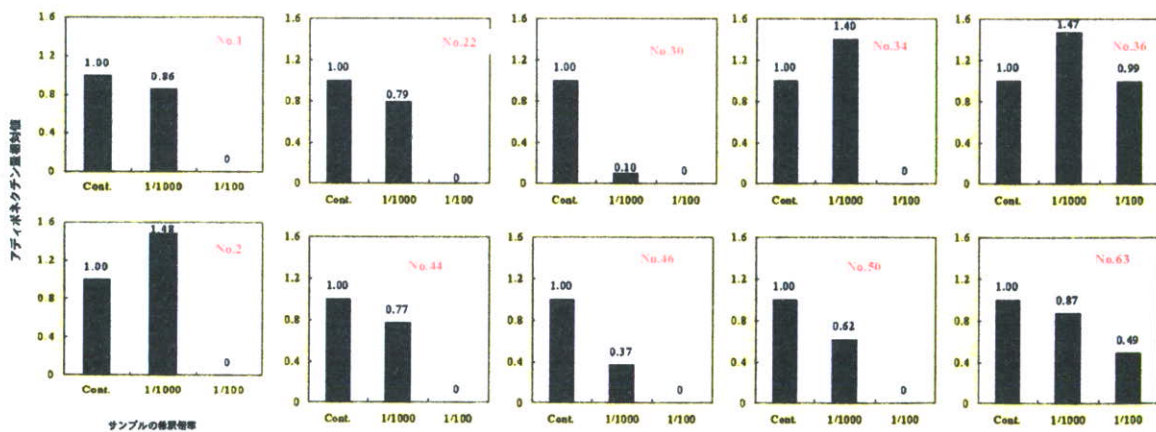
サンプルの希釈倍率



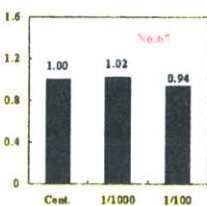


● 脂肪分化抑制

● 判断が難しい



インスリン抵抗性抑制物質の探索アッセイの結果



サンプルの希釈倍率

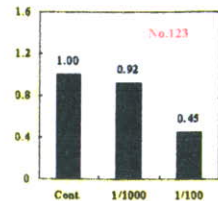


Table 1. 今年度活性を検討した候補植物リスト

| No. | 国 | 現地名 | 学名 | 抽出部位 |
|-----|-----------|-----------------------------|-------------------------------------|--------------|
| 1 | Bolivia | JAMILLO DE PURAZNO | Viscum album | leaves |
| 2 | Bolivia | MUERDAGO | Viscum album | leaves |
| 3 | Nepal | Pan ko jaya | Piper betel Blanco | rhizome |
| 4 | Nepal | Sahajira | Carum carvi L. | seed |
| 5 | Nepal | Jamun | Eugenia jambolana Lam. | |
| 6 | Myanmar | CHINYOK | Garuga pinnata Roxb. | heart wood |
| 7 | Pakistan | Nag bala | Lawsonia inermis Linn. | |
| 8 | Brazil | Pata-de-vaca | Bauhinia forficata Link | leaves |
| 9 | Peru | Guanábana | Annona muricata (Annona montana?) | leaves, stem |
| 10 | 植物 C | 植物 C | 植物 C | leaves, stem |
| 13 | 植物 C | 植物 C | 植物 C | bark |
| 14 | Myanmar | Kyaung Pann Seed | Vitex trifolia | fruit |
| 15 | 種子島 | ネジトウガラシ、レッド イソラ | Helicteres isora L. | branch |
| 16 | Arzentine | GRAMILLA NACIONAL | Triticum repens | rhizome |
| 18 | Nepal | Bel Gudi | Aegle marmelos Corr. | |
| 22 | 種子島 | ニンジンボク | Vitex cannabifolia Siebold et Zucc. | branch |
| 23 | 種子島 | ニンジンボク | Vitex cannabifolia Siebold et Zucc. | leaves |
| 24 | Nepal | Lwang | Syzygium aromaticum Merr. et Parry | |
| 25 | Pakistan | Maeen kalan | Syzygium aromaticum Merrill & perry | |
| 26 | 植物 A | 植物 A | 植物 A | fruit, seed |
| 27 | Myanmar | | Terminalia belerica | fruit |
| 28 | Peru | Chilca | Baccharis salicifolia (Asteraceae) | |
| 30 | Pakistan | Indrayan/ Tuma | Citrullus colocynthis Schrad. | fruit |
| 31 | Arzentine | MARRUBIO PLANTA NACIONAL | Marrubium vulgare | leaves |

| | | | | |
|----|-----------|---|---|----------------|
| 32 | Peru | aceitana dulce | Syzygium cumini | aerial part |
| 33 | Peru | Ortiga | Urtica dioica L. | aerial part |
| 34 | Nepal | Tatela Phool | Oroxylum indicum Vent. | |
| 36 | Pakistan | Karafs | Coccinia grandis (L.) Voigt | |
| 37 | Myanmar | | Oroxylum indica | bark |
| 38 | Myanmar | PYINMA | Lagerstroemia speciosa (L.) Pers. | heart wood |
| 39 | Peru | Pasuchaca | Geranium dielsianum | |
| 40 | Peru | Japan shacoc, japachancara, Japallanshaco? / Hierba solitaria | Gentianella thyrsoides | |
| 41 | Peru | Kepishiri | Matsigenka word meaning "bitter" Shepard 1998 | |
| 42 | Peru | cuti cuti macho | Cheilanthes sp. | aerial part |
| 43 | Peru | altamisa, Marco | Ambrosia peruviana | |
| 44 | Myanmar | | Oroxylum indicum | flower |
| 45 | | 植物 B | 植物 B | bark |
| 46 | Peru | Yarina | Phytelephas sp. | seed (大きく硬い) |
| 47 | Myanmar | | Alstonia scholaris | leaves |
| 48 | Arzentine | CARQUEJA HOJAS NACIONAL | Baccharis crispa | |
| 50 | Peru | Carkeja | Baccharis genisteloides (Lam.) Pers. | aerial part |
| 51 | Myanmar | | Bridelia glauca | leaves |
| 53 | Myanmar | | Bridelia stipularis | leaves |
| 56 | Myanmar | | Indigofera laseii | bark |
| 57 | 種子島 | カンラン | Canarium album (Lour.) Raeusch. | branch |
| 58 | 種子島 | ホウライアオキ | Rauvolfia vomitoria Afzel. | branch, leaves |
| 60 | Brazil | Kalahuala macho(=Calahuala macho=Calaguala) | Niphidium crassifolium=Polypodium crassifolium (原記載 Pyrosia sp.) | |
| 61 | Brazil | Kalahuala macho(=Calahuala macho=Calaguala) | Niphidium crassifolium=Polypodium crassifolium (原記載 Lepisorus sp.) | |
| 63 | Peru | Ajo sacha | Mansoa alliacea | root |

| | | | | |
|-----|-----------|---------------------------|---|------------------|
| 64 | Peru | Ajo sachá | Mansoa alliacea | leaves |
| 65 | Peru | Chiric sanango | Brunfelsia grandiflora | bark, heart wood |
| 67 | Peru | Clavo huasca | Tynnanthus panurensis | stem |
| 69 | Peru | Molle | Schinus molle L. | aerial part |
| 72 | Peru | Mullaca (raiz) | Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl. | root |
| 73 | Brazil | Chapeu de couro | Echinodorus macrophyllus | |
| 74 | Peru | Huaco, Yerba milagrosa | Mikania sp. | trunk |
| 75 | Arzentine | FRESNO NACIONAL | Fraxinus excelsior | |
| 76 | Bolivia | KARI KARI | Berberis vulgaris | fruit, leaves |
| 77 | Bolivia | TORONJIL | Melissa officinalis | aerial |
| 79 | Pakistan | Aqaqiya | Polygonum aviculare Bert. ex Meissn. | |
| 80 | Pakistan | Bhilawan | Tribulus terrestris Linn. | |
| 82 | Peru | Calahuala | Polypodium sp. | rhizome |
| 83 | Arzentine | ATAMISQUE NACIONAL | Capparis atamisquea | |
| 85 | Myanmar | | Capparis zeylanica | bark |
| 86 | Myanmar | | Capparis zeylanica | stem |
| 87 | Myanmar | | Capparis zeylanica | flower |
| 88 | Vietnam | MOC THONG | Clematis armandi | stem |
| 89 | Myanmar | | Diospyros burmania | leaves |
| 91 | Myanmar | | Diospyros discolor | leaves |
| 92 | Myanmar | | Diospyros montana | leaves |
| 94 | Myanmar | | Entada | leaves |
| 96 | Nepal | Pangra | Entada phaseoloides (L.) Merr. | |
| 99 | Nepal | Okhar ko bokra | Juglans regia L. var. kamaonica C. DC. | fruit |
| 100 | Pakistan | Ud-e-saleeb | Lepidium iberis Linn. | seed |
| 102 | Arzentine | MUNA MUNA PLANTA NACIONAL | Micromeria eugenioides | |
| 103 | Nepal | Birarganda; Bidarikand | Pueraria tuberosa (Roxb. Ex Willd.) DC. | |
| 104 | Peru | | Selaginella anceps | whole plant |
| 105 | 種子島 | ヒメキランソウ | Ajuga pygmaea A. Gray | whole plant |
| 106 | 種子島 | オニグルミ | Juglans ailantifolia Carrière | leaves |

| | | | | |
|-----|---------|-------------|--------------------------------------|--------------|
| 107 | 種子島 | オニグルミ | <i>Juglans ailantifolia</i> Carrière | fruits |
| 109 | 種子島 | オニグルミ | <i>Juglans ailantifolia</i> Carrière | wood(branch) |
| 110 | 種子島 | オイランアザミ | <i>Cirsium spinosum</i> Kitam. | leaves |
| 119 | Myanmar | | <i>Dendrobium Nobile</i> | |
| 120 | Peru | OJE | <i>Ficus ins 恥 ida</i> Will) | leaves |
| 121 | Peru | MITO | <i>Carica candicans</i> A. Gray | leaves |
| 122 | Peru | CHUCHUHUASI | <i>Maytenus ebenifolia</i> | bark |
| 123 | 植物 D | 植物 D | 植物 D | root |
| 124 | 植物 D | 植物 D | 植物 D | leaves |
| 125 | 植物 D | 植物 D | 植物 D | branch |

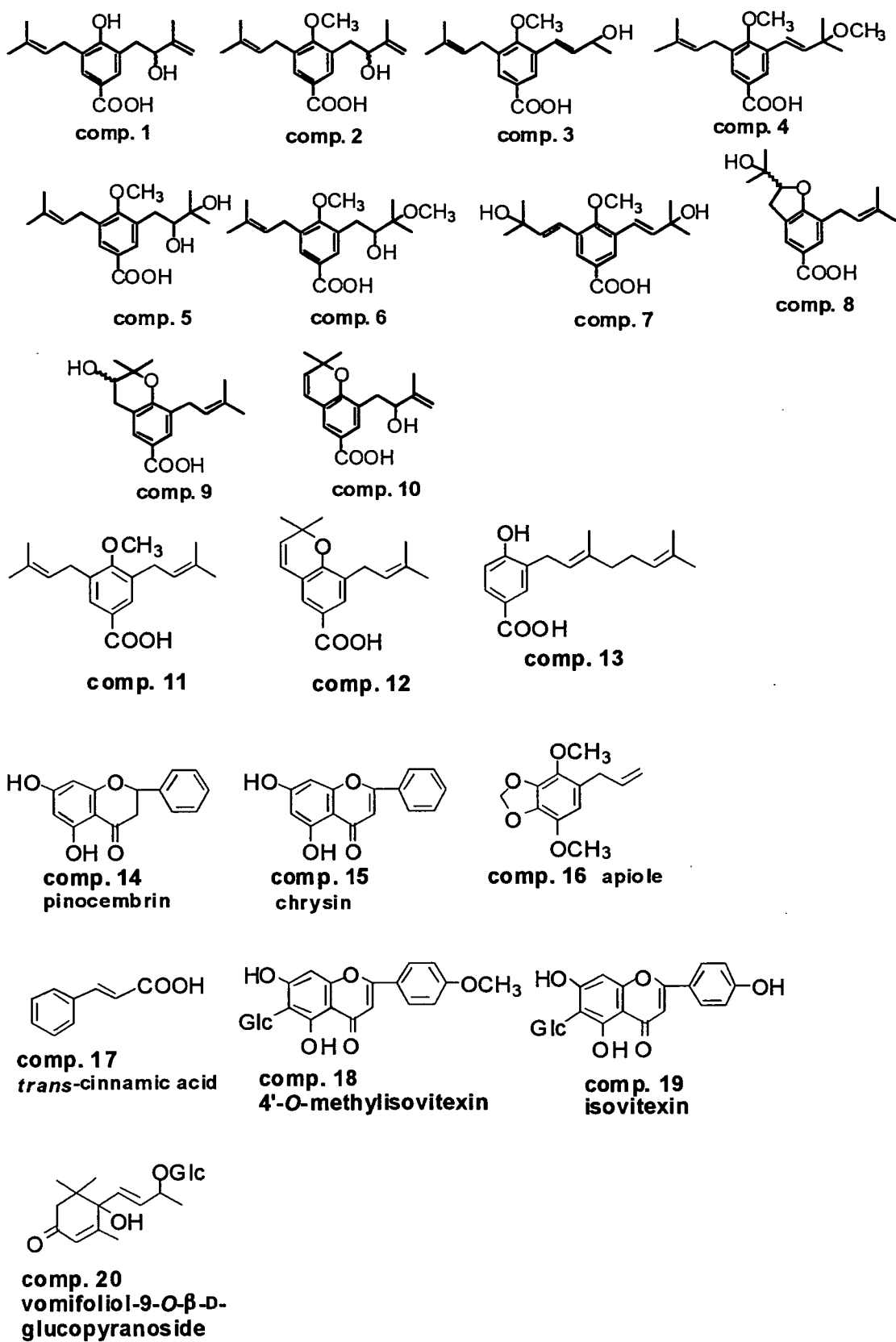


Fig. 2 Novel compounds(1-10) and Known compounds(11-20) from Matico

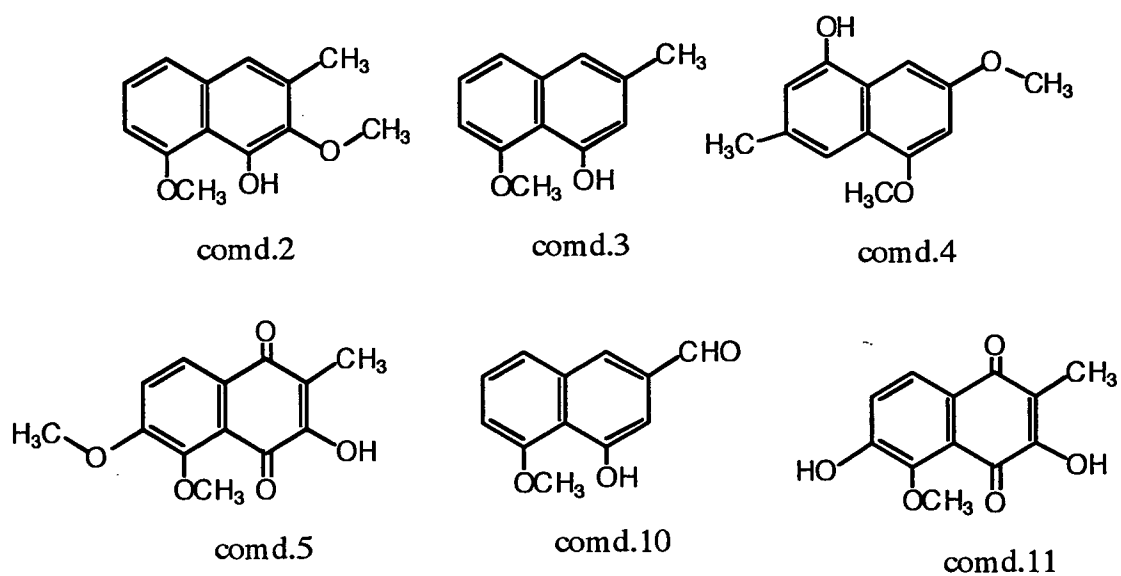


Fig. 3-1 Isolated compounds from Ebenaceae Plant

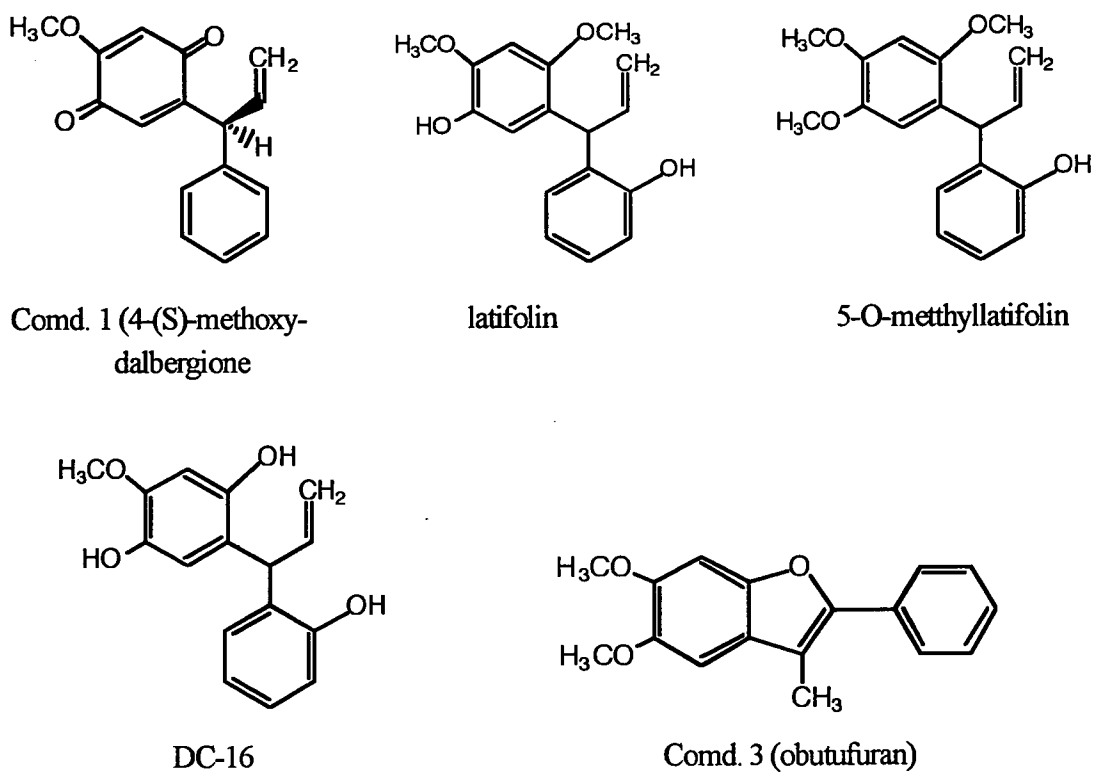


Fig. 3-2 Isolated and relative compounds from Legminosae Plant

Table 2 Anti-Leishmania activity of Vervenceae Plant

(IC₅₀: μ g/mL)

| Copmd. | <i>L. major</i> | <i>L. panamensis</i> | <i>L. guyanensis</i> | <i>L. peruviana</i> |
|---|-----------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| 1 | 9.73 | 3.88 | 8.43 | >25 |
| 2 | 0.32 | 0.12 | 0.25 | >25 |
| 3 | 0.47 | 0.36 | 0.40 | >25 |
| 4 | 0.43 | 0.50 | 0.27 | >50 |
| 5 | 40.25 | >50 | 21.03 | >50 |
| Alkanin | *** | >0.39 | >0.39 | *** |
| Shikonin | *** | >0.39 | >0.39 | *** |
| β -hydroxy isovaleryl shikonin | *** | >0.39 | >0.39 | *** |
| Acethyl shikonin | *** | >0.39 | >0.39 | *** |
| Isovaleryl shikonin | *** | 2.13 | 1.79 | *** |
| Isobutyryl shikonin | *** | >0.39 | >0.39 | *** |
| AmB | <0.1 | <0.1 | <0.1 | <0.1 |

平成 19 年度厚生労働科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

天然植物資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する研究

分担研究課題；熱帯産薬用植物の抗リーシュマニア活性物質に関する研究

分担研究者 徳島文理大学 香川薬学部 関田節子

研究要旨 熱帯感染症であるリーシュマニア症治療薬の開発を目的に、ミャンマー産薬用植物について抗 *Leishmania* 活性スクリーニングを行い、活性が認められたカキ科、クマツヅラ科、マメ科植物の成分検索を行った。3種の植物から 23 化合物を分離し、そのうち 5 化合物は新規化合物であった。新規および既知 7 化合物に強い活性を認めた。

A 研究目的

リーシュマニア症は、熱帯地方特有の寄生虫病で、WHO 指定の六大熱帯病の一つである。感染経路は吸血性昆虫であるサシチョウバ工体内の *Leishmania* 原虫が吸血時に傷口から侵入して感染が成立する。原虫はマクロファージに寄生し、内臓型、皮膚型、粘膜皮膚型の病態を呈する。治療薬は、五価のアンチモン剤が第一選択の薬剤として用いられているが、重篤な副作用、長期投与の必要性、高価であること、更に薬剤耐性原虫の出現が有効な治療を阻んでいる。また、第二選択薬として Pentamidine, Amphotericin B が用いられているが、いずれも効果が弱く副作用を免れない。原虫に対する植物成分の活性は、マラリアとキナの木 (*Cinchona ledgeriana*)、青蒿 (*Artemisia apiacea*) 等により衆知であることから、安価で副作用の少ない新たな薬剤、特に感染地域の熱帯産薬用植物の活用が求められている。そこで、抗 *Leishmania* 活性植物の探索、活性成分の単離と解析、作用メカニズムの解明を目的として感染地域の植物を対象に研究を行った。19 年度は、ミャンマー産植物をスクリーニングし、活性を示したカキノキ科、クマツヅラ科、マメ科植物から得られた化合物について、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、質量分析 (MS) 等の分光学的手法を用いて構造解析を行い、分離化合物について抗リーシュマニア活性の測定を行った。

B 研究方法

1 抗リーシュマニア活性試験法

植物のメタノールエキスまたは単離した化合物の水溶液に *Leishmania* 原虫 1×10^6 /ml を加え 72 時間インキュベートした後、Tetracolor ONE (生化学工業) 試薬を加え、6 時間のインキュベートの後にマイクロプレートリーダーにより OD 値 (450-630nm) を測定し、MIC (Minimum Inhibitory Concentration)、

MLC (Minimum Lethal Concentration)、LD₅₀ (50% Lethal Dose) を求めた。ポジティブコントロールとしてアンフォテルシン B (AmB) を用いた。

2 抽出と分離

抗リーシュマニア活性物質の抽出分離は、図 1 に示すように行った。スクリーニングでかっせいの認められた 3 種のミャンマー産薬用植物をそれぞれ粉末とし、メタノール (MeOH) を用いて還流抽出し、得られた各メタノールエキスについて成分の分離を行った。活性を示した各々のメタノールエキスは、n-ヘキサン (n-hexane)、クロロホルム (CHCl₃)、酢酸エチル (AcOEt)、60%・メタノール (60%·MeOH) による分配操作によりフラクションに分けた。カキノキ科植物は CHCl₃ 相に、クマツヅラ科植物とマメ科植物は AcOEt 相に活性が認められたことからそれぞれのフラクションについて情報に従いシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS 中