

200811008A

平成20年度厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業)

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

平成20年度総合・分担研究報告書

(H19-生物資源-一般-008)

平成21年3月

主任研究者 関田節子

## 目 次

I. 総括研究報告	
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	1
関田 節子	
II. 分担研究報告	
1. 植物エキスと炎症性サイトカイン産生についての検討および活性物質の探索	9
関田 節子	
2. 外国産生薬からメタボリックシンドローム関連生理活性化合物の探索	13
澗野 裕之	
3. パキスタン産薬用植物からの抗リーシュマニア活性物質の分離研究	21
黒柳 正典	
4. 国内産薬用植物における生物活性化合物の探索	31
細川 敬三	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	57

## 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究推進事業）

### 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

#### 総括研究報告書

近年の創薬手法であるコンビナトリアルケミストリーにおけるスクリーニング対象化合物に天然有機化合物の重要性が再認識されつつあるが、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターでは国内外原産の多くの植物体を保存しており、それらの豊富な植物資源を用いて広範囲の生物活性評価を行い、生理活性物質の探索を行った。その結果、コデマリの花部から強いマルターゼ阻害活性を有するフラボノイド化合物が得られた他、ミャンマー産生薬から強いACE阻害活性、ポリビア産生薬から抗酸化活性、パキスタン産およびミャンマー産生薬から抗原虫活性を見だし、それぞれ活性化合物の精製単離、構造決定を行った。これらの生理活性化合物は構造的にも興味深いものが多く、医薬リード化合物としての利用の可能性の他、エキスを利用した健康食品などの方面への利用の可能性も考えられた。

研究代表者 関田 節子 徳島文理大学 香川薬学部教授

#### 研究分担者：

渕野 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栽培研究室長

黒柳 正典 県立広島大学生命環境学部教授

細川 敬三 兵庫大学健康科学部教授

#### 研究協力者：

安元（森）加奈未 徳島文理大学 香川薬学部助教

松岡 隆 東京理科大学薬学部講師

代田 修 徳島文理大学 香川薬学部准教授

#### A. 研究目的

近年の創薬手法であるコンビナトリアルケミストリーなどにおいては、そのスクリーニング対象化合物は合成化合物が主体となっており、そのため化合物の骨格的な限界が指摘されている。植物成分などの低分子天然有機化合物には奇異な骨格を有する化合物が多く存在し、また民間薬的な使用法を元にすれば創薬資源としての利用が可能となると考えられる。

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターは全国に4つの研究部を有し、それぞれの地方の気候に応じた薬用植物の栽培保存が行われている。北海道研究部に

においてはアイヌ民間薬を中心とした北方系植物、種子島研究部においては熱帯性の南方植物の栽培保存を行っている。また筑波研究部においては近年世界各地の生薬の収集保存を行っている。

本研究事業では広範囲の生物活性評価を基盤研が有する豊富な植物資源に対して行い、医薬リード化合物となりうる生理活性化合物を見いだすことにあるが、対象とした生物活性は、抗肥満、高血圧、抗糖尿病、抗脂血、リパーゼ阻害活性などのメタボリックシンドロームに関連する生物活性の他、赤血球法を用いた抗酸化活性、発がんプロモーター抑制、チロシナーゼ抑制、抗ダイオキシン毒性、抗感染症(抗原虫)活性など広範囲に渡る。薬用植物資源研究センターが有する国内外の広い範囲の植物資源を材料とし、現地での使用情報や文献情報を元に対象を絞り込んで生物活性試験を行うことにより、効率的に医薬品候補植物を見いだすことが可能になると考えられる。

また活性酸素は動脈硬化、糖尿病、ガンなどあらゆる疾病の発病に関与していると言われており、現在までに医薬品として用いられているものは脳虚血疾患治療薬のエダラボンくらいしかなく、その理由に安定性や組織透過性などの問題が上げられる。また抗酸化活性評価の *in vivo* 評価というものは困難であり、仮に動物を使用した場合多くのサンプルの評価ができないために *vivo* に近い結果が出せる *vitro* での評価系が望まれている。近年、細胞膜透過性を同時に評価できる赤血球法による抗酸化活性評価法が開発され、それによる植物エキスの評価を行うことが可能となった。

本研究は、これまで医薬品開発に十分利用されてきているとはいえない薬用植物

を、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のための資源として活用する道を拓こうとするものであり、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る。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。

## B. 研究方法

昨年度多くの薬用植物資源研究センターが有する植物エキスに関して幅広いスクリーニングを行ったが、その結果強い活性が見られたものに関して生理活性成分の精製単離、構造解析を行った。また今年度から赤血球法を用いた抗酸化活性評価を導入して外国産生薬に関してスクリーニングを行った。

成分研究に関しては、筑波研究部産のコデマリ(*Spiraea cantoniensis*)の花部において強いマルターゼ阻害活性を見いだしたため、活性成分の単離、構造解析に着手した。また、強いアンジオテンシン転換酵素阻害活性のあったミャンマー産生薬A、抗酸化活性(赤血球法)のあった、ボリビア産生薬 B、腸管モデルによるコレステロール吸収抑制効果の見られた種子島産植物 C、抗原虫活性(*Leishmania major*)の見られたペルー産生薬 *Lonchocarpus nicou*、パキスタン産生薬 *Withania coagulans*、*Cousinia stoksi*、*Artemisia scoparia*、ミャンマー産生薬 *Tectona grandis* について成分の検討を行った。また、*in vivo* での抗原虫作用 (*L. major*) が明らかに認められたペルー産生薬 *Carica candicans* Gray に関しては、炎症性サイトカインに対する効果も検討を始めた。

(生物活性評価方法)

- $\alpha$ -グルコシダーゼ活性測定方法  
 $\alpha$ -グルコシダーゼは、市販のラット小

腸 $\alpha$ -グルコシダーゼ (Sigma-Aldrich Japan) を用い、マルターゼ活性は 0.7 u/mL、スクラーゼ活性は 0.34 u/mL の酵素液を調製し使用した。この際、マルターゼ阻害活性の測定には基質としてマルトースを、スクラーゼ阻害活性の測定には基質としてショ糖を用いた。両者の活性測定は、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.3) に溶解した酵素液 (マルターゼでは 50  $\mu$ l、スクラーゼでは 200  $\mu$ l) と基質 (マルターゼでは 3.5mM マルトース 350  $\mu$ l、スクラーゼでは 56mM ショ糖 200  $\mu$ l) に活性測定用試料を 50%濃度のジメチルスルフォキシド水溶液に溶解したものを 100  $\mu$ l 加え全量を 500  $\mu$ l とし、37°C、15 分間反応させ、750  $\mu$ l の 2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を加え反応を停止した。この反応液をアルミナカラムに通してフェノール性成分を除去し、生成したブドウ糖量を Glucose B-test (和光純薬工業 (株)) を用いて測定した。なお、単離過程における阻害活性の測定は、植物試料 0.1g を 1 mL に溶解させたのに相当する量を反応液に加えて測定を行った。

・抗酸化物質探索アッセイ (赤血球法)  
3.8%クエン酸ナトリウムを採取血液量 10%以上加えて、マウスから心臓採血し、これに 0.5%glucose を含む生理食塩水を加え、遠心分離 (2000rpm、5°C、10min) により 3 回洗浄した。0.5%glucose を含む生理食塩水で採取血液量の約 3 倍の液量に希釈し、これを滅菌シャーレに 0.5ml ずつ滴下した。予めオートクレーブで融解後約 60°C にしたリン酸緩衝液寒天培地 6mL をこれに流し入れ、均一に混合し固化させた。試験物質を量り取り生理食塩水に溶かし、試験液 (100、30、10、3、1mg/mL) とした。培地に 6mm (薄手) と 8mm (厚手) のペーパーディスクを 2mm

離して置いた。6mm のペーパーディスクには GOD 溶液を 5  $\mu$ L 添加し、8mm のペーパーディスクには試験液を 40  $\mu$ l 添加した。シャーレに不活性化 (Ar) ガスを充填して 37°C で一晩培養した。溶血円の半径 a を control、b と c の平均を test とし測定した。このとき薬物の影響を考え、接線から 1mm 外側を測定した。ここで、この測定地からディスク半径 3mm 分を差し引いた値を用い、グラフを測定した。

・抗原虫活性 (*Leishmania major*)

用いた原虫は *Leishmania major* で promastigote 型を用いた。試料 (エキス) を DMSO に溶解後、Meidum199 で希釈し、濃度勾配をつけて 96 穴プレートに 50  $\mu$ l ずつ注入する。その後  $6 \times 10^5$  の濃度に調整した *Leishmania* 原虫を 50  $\mu$ l ずつ各ウェルに注入。その後 27°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 48 時間インキュベートし、TetraColor One 試薬を 10  $\mu$ l ずつ注入し OD 値 (450-630nm) 測定。6 時間後にさらに OD 値測定。グラフを作成し MLC (minimum lethal concentration) を算出した。

これ以外の生物活性評価法については昨年度の報告書を参照されたい。

### C. 研究結果

(注：一部の植物に関しては知的所有権取得の可能性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ルファベットでの記載にとどめます。化合物についても一部非開示とします。)

抗酸化活性評価の結果、いくつかの植物において強い活性を見いだした。一般に抗酸化活性の評価に用いられている DPPH 法では効果があっても赤血球法では全く効果の見られない植物があるが、これらは細胞膜を通過できないものと考えられる。ボリビア産の生薬 B は、DPPH

法でも赤血球法でも極めて強い抗酸化活性を示した。そこで分離精製を行ったところ、化合物はいずれもフラボノイドであり、そのうち1つはカテキンであった。カテキンはすでに本手法において強い活性を示すことが分かっており、本植物における抗酸化活性の活性本体の一部は本化合物に寄るものと言うことが明らかになった。単離された化合物はいずれもフラボノイド化合物である。

アンジオテンシン転換酵素(ACE)阻害活性を示したミャンマー産生薬Aに関しては、著しい ACE 阻害活性を示した。得られた化合物の構造式は各種 NMR スペクトルを解析した結果、フラボノイド配糖体の誘導体と考えられた。

Caco-2 細胞を用いた腸管モデルにおいてコレステロール吸収阻害活性を有意に示した種子島産植物であるCにおいては、活性画分から2種類のモノテルペン配糖体を得た。現在化合物自体が活性を有するかを検討しているところである。

抗感染症(抗原虫)作用として *Leishmania major* を用いた殺原虫活性を見たが、ペルー産生薬である *Lonchocarpus nicou* (現地名 Barbasco) について検討した結果、2種類の新規スチルベン化合物を活性本体として単離した。パキスタン産生薬 *Withania coagulans*、*Cousinia stoksi*、*Artemisia scoparia* からは図に示すような奇異な骨格を有する化合物が多く見いだされた。*Withania coagulans* からは12種類のWhitanolide類化合物を得ることができ、その大部分は新規化合物であった。その大部分が新規化合物であり、更にその内のいくつかに比較的強い抗リーシュマニア活性が得られた。*Artemisia scoparia* から得られた化合物の中にもいくつか新規と考えられるものが得られており、抗リーシュマニア活性の強い

ものが見つかっている。同様に *Cousinia stoksi* からも構造上非常に珍しい新規化合物を含めいくつかの抗リーシュマニア活性物質が得られた。ミャンマー産生薬 *Tectona grandis* からは新規ナフトキン化合物を活性物質として得た。本化合物は *L. major* 以外にも *L. guyanensis*、*L. panamensis* にも活性を示すことが分かった。

脂肪細胞を用いたアッセイにおいて、善玉アディポサイトカインであるアディポネクチン分泌量を亢進するミャンマー産植物Dおよびネパール産植物Eにおいて現在活性化合物の探索を急いでいる。これらの化合物は生物活性的にも興味深く、PPAR- $\gamma$  に対するリガンド活性の他、様々な関連因子に対する生物活性評価が興味持たれるところである。

#### D. 考察および結論

昨年度、基盤研薬用植物資源研究センターが有する多くの植物資源について、幅広い生物活性評価を行ってきたが、今年度はそれらの結果を元に生理活性成分の探索を開始した。また今年度から検討した赤血球法による抗酸化活性評価においていくつか興味深い結果が得られ、DPPH 法にて効果があって赤血球法で効果が認められないものは、細胞膜への透過性がないものと考えられる。結果としてポリビア産の生薬から本手法で強い活性を有する活性画分からフラボノイド化合物を3種類得た。抗酸化化合物が医薬品への応用例が少ない理由の1つに化合物の安定性の他に組織への透過性の問題が考えられるが、本手法において得られた抗酸化化合物は細胞膜透過性を有しており、またメタボリックシンドロームをはじめとする様々な疾病の原因とされる活性酸素を消去する作用を有する化合物は医薬リード化合物としての利用価値を

有するものと考えられる。

また強い ACE 阻害活性を有するミャンマー産の植物エキスからフラボノイド化合物が活性画分から得られた。エキスでの活性は顕著であり、現在これら化合物単体での活性を検討中であるが、本植物エキスは高血圧予防を目的とした健康食品としての利用法も考えられた。

コレステロール吸収抑制作用が見られた種子島産植物からは活性画分から奇異な骨格を有するモノテルペン配糖体を 2 種類得ているが、これら化合物が単体において強い活性を示せば抗脂血症などの予防薬としてのリード化合物としての利用が可能と考えられた。

筑波研究部産コデマリ花部から強力なマルターゼ阻害活性を有するフラボノイド誘導体が 3 種類得られた。コデマリは本来観賞用として栽培される植物であり、その花部は薬用としては用いられていないが、そのような植物の部位から予想外の強い活性が見られたのは興味深い事実であり、今回の結果は未利用植物資源の開発につながると考えられる。

## E. 健康危機情報

特になし

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

1. A. Suzuki, O. Shirota, K. Mori, S. Sekita, H. Fuchino, A. Takano, M. Kuroyanagi; Leishmanicidal Active Constituents from Nepalese Medicinal Plant Tulsi (*Ocimum sanctum* L.), *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 245 – 251 (2009).

2. Yosida, K., A. Hishida, O. Iida, K. Hosokawa, J. Kawabata Flavonol caffeoylglycosides as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Spiraea cantoniensis* flower. *Journal of Agricultural FOOD Chemistry*,

56(12), 4367–4371 (2008).

3. Mori, K., Kawano, M., Fuchino, H., Agatsuma, Y., Satake, M., Kusumi, T., and Sekita, S. Antileishmanial compounds from a Myanmar Plant *Cordia fragrantissima*. *J Nat Prod* 71 (1), 18–21 (2008).

4. Fuchino, H., Sekita, S., Mori, K., Kawahara, N., Satake, M., and Kiuch, K. A New Leishmanicidal Saponin from *Brunfelsia grandiflora*. *Chem Pharm Bull* 56 (1) 93–96 (2008).

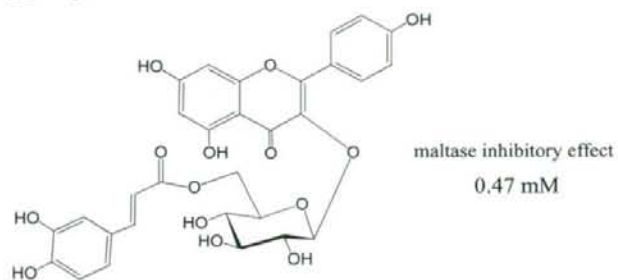
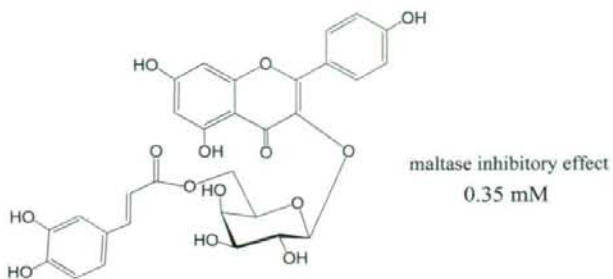
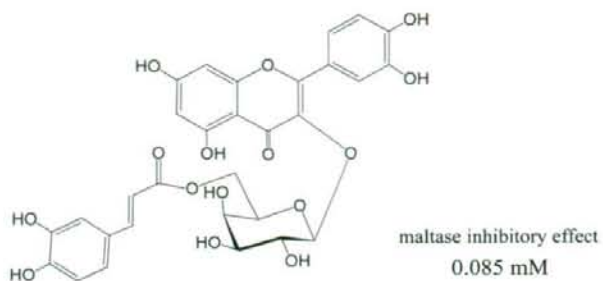
### 2) 学会発表

1. Yasumoto, M.-K., Fuchino, H., Agatsuma, Y., Kusumi, T., Satake, M., and Sekita, S. (2008). Search of leishmanicidal constituents: The plants of Burma (Myanmar), Peru, and Nepal. IUPAC; ICOB-6 & ISCNP-26, July 13–18, Charlottetown, Canada.

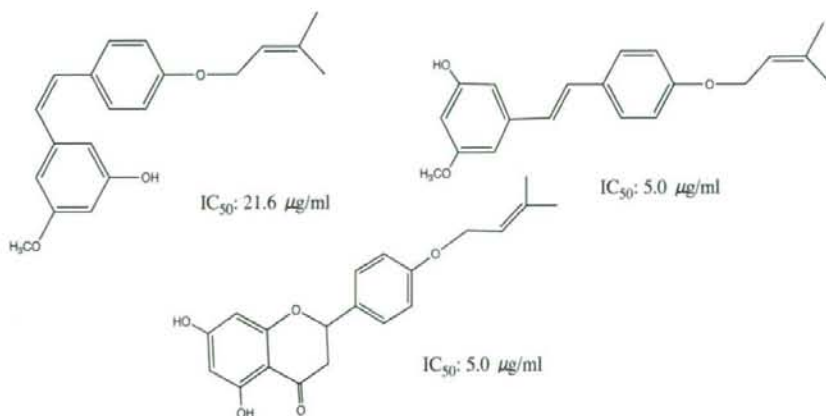
2. 橋本幸大, 安元(森)加奈未, 澁野裕之, 我妻豊, 佐竹元吉, 関田節子 (2008), 抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索(その 16). 日本生薬学会第 55 年会, 平成 20 年 9 月 19–20 日, 長崎.

## 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

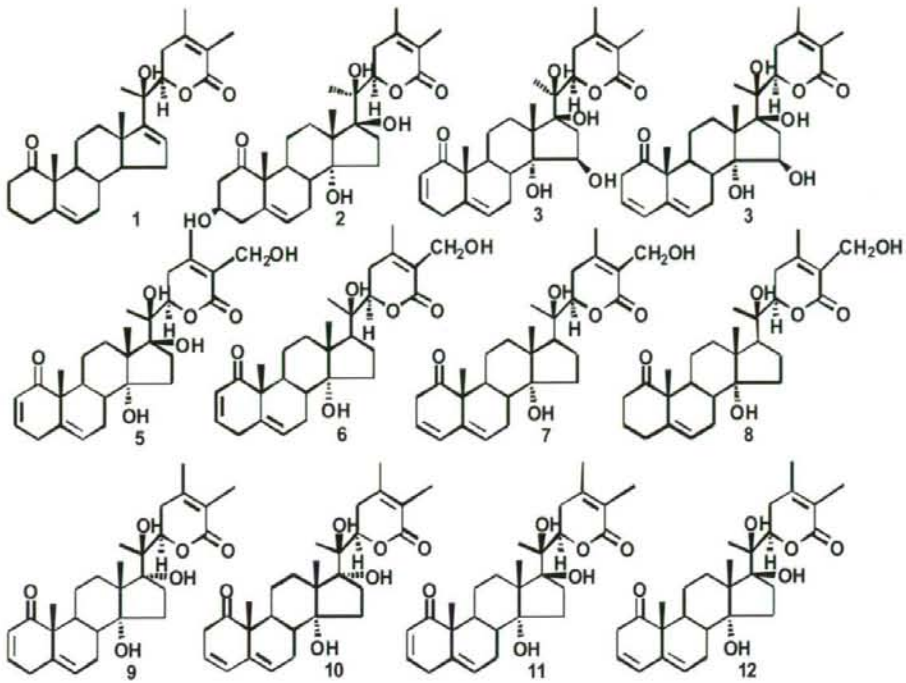


コデマリ花部から得られたマルターゼ阻害活性を有する化合物

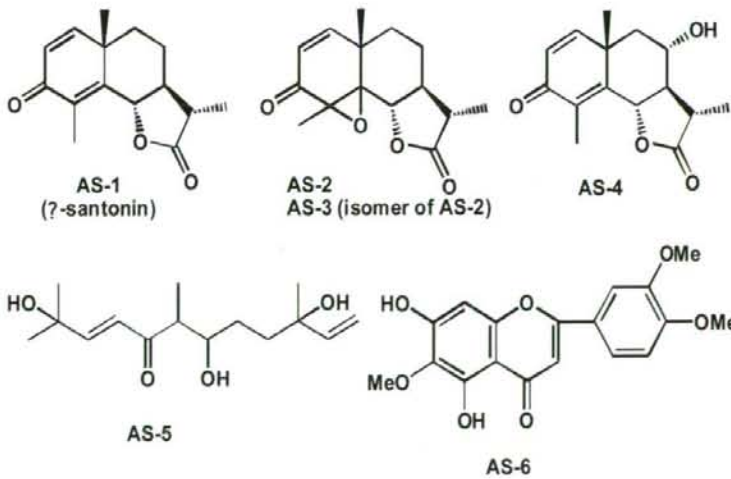


ペルー生薬 Barbasco から得られた *Leishmania major* に対する抗原虫活性化合物

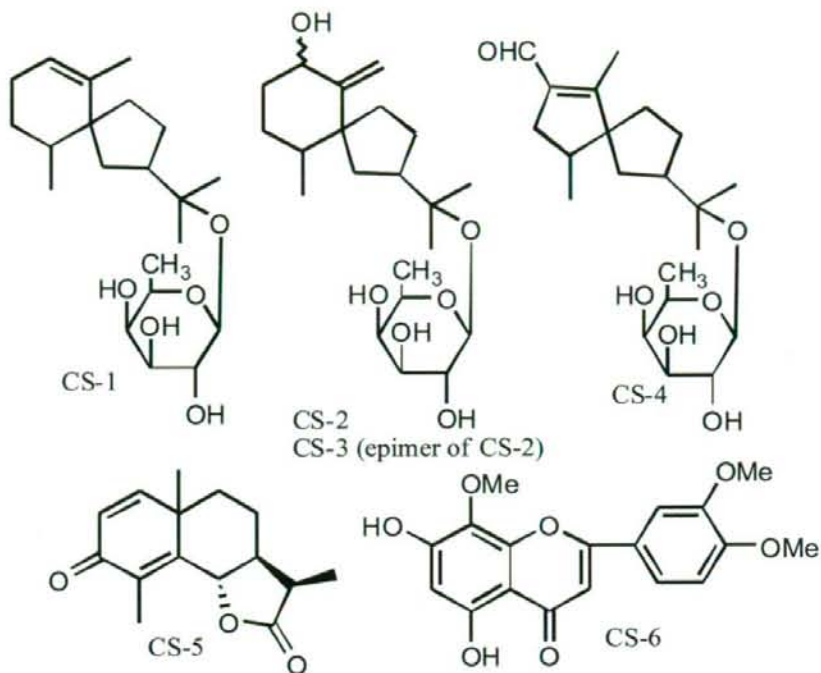




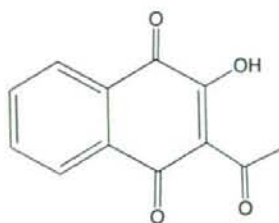
抗リーシュマニア活性を示したパキスタン生薬 *Withania coagulans* から単離した化合物



抗リーシュマニア活性を示したパキスタン生薬 *Artemisia scopalia* から分離された化合物



抗リウマチ活性を示したパキスタン生薬 *Cousinia stoksii* から単離された化合物



抗リウマチ活性を示したミャンマー産植物 *Tectona grandis* から得られた活性化化合物

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：植物エキスと炎症性サイトカイン産生についての検討および活性物質の探索

研究分担者 関田 節子 徳島文理大学香川薬学部教授

研究協力者 安元（森）加奈未 徳島文理大学香川薬学部助教

研究要旨 熱帯感染症であるリーシュマニア症の治療薬の開発を目的とし、感染地の薬用植物から新たな活性成分を得るため、新たに炎症性サイトカインをELISAで検定する事とした。植物エキスは、マウスを用いた感染実験にて顕著な治療効果を示したペルー産 *Carica candicans* のメタノールエキス、また現在ペルーにて臨床試験を行っている紫雲膏の構成生薬・ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* のメタノールエキスを用いてELISAを行った。

#### A. 研究目的

リーシュマニア症は、ほ乳類体内において免疫学的に液性免疫(Th2)に傾くと急激に発症し様態は悪化することが知られている。一方、細胞性免疫(Th1)に傾くと、症状は快方に向かい治癒する。このことから、現在まで一次スクリーニングに用いてきた改良 MTT アッセイに加えて、炎症性サイトカインを検定するELISAを導入することで直接的な殺原虫能だけでなく貪食細胞に働きかける化合物の探索を行うこととした。検定を行う植物サンプルはペルーで民間薬的にリーシュマニア症の薬として用いられてきた Caricaceae(パパイヤ科)の *Carica candicans* Gray で、このメタノールエキスは *in vitro* ではあまり活性を示さないものの *in vivo* 試験において *Leishmania* 感染マウスの足蹠の腫脹抑制に有意差を示した。また、ペルーでパイロット的に臨床試験を行っている紫雲膏の構成生薬である紫根 *Lithospermum erythrorhizon* のメタノールエキス、改良 MTT

アッセイにおいて顕著な活性を示したミャンマー産 *Tectona grandis* も併せて検討することとした。*T. grandis* については酢酸エチル分画にて顕著な活性が見られた為、(6.25/12.5  $\mu\text{g/mL}$ , MIC/MLC)、改良 MTT アッセイガイドによる活性成分の探索を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 植物エキスのマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対する影響

研究材料として、*C. candicans*、*L. erythrorhizon*、*T. grandis* のメタノールエキスを調整した。( *C. candicans* に関してはペルーの共同研究者がエキスを作成)。 *C. candicans* の *in vivo* での活性は共同研究者の竹内らによって昨年度確認されている。炎症性サイトカインの産生は、マクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いて検定した。

RAW264.7細胞の培養: RAW264.7細胞 (ECACC)は、25cm<sup>2</sup> tissue culture Flask 中

10%FCS 入り DMEM 培地を用いて37 度 5% CO<sub>2</sub> に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行い、コンフルエント到達後 30-50 倍希釈を行い継代とした。

ELISA 用上清の調整: stationary growth phaseのRAW264.7 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l/well に調整後 96 穴マイクロタイタープレートに播種し、一晚接着させた。培地で洗浄した後、最大濃度 100  $\mu$ g/mL で各濃度に希釈した植物サンプル溶液を各ウェルに入れ 48 時間培養した。その上澄み液は回収し、ELISAを行うまで-20°Cで保存した。

炎症性サイトカインの産生検定(ELISA): 検定を行った抗体は、IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 、BML 社(IL-18)及び BD 社(IL-18 以外)の ELISA キットを使用した。

ELISA プロトコールはキット添付書類に従い行った。

## 2.ミャンマー産 *T. grandis* の活性成分の精製および単離、構造決定

Leishmania 原虫の培養: *Leishmania major* は 25cm<sup>2</sup> tissue culture Flask 中 10%FCS 入り Medium199 培地を用いて 26.5 度 5% CO<sub>2</sub> に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行い、2-3 日後コンフルエント到達後 50-100 倍希釈を行い継代とした。アッセイに使用するリーシュマニアは、使用直前に血球計算板上でカウントし、Medium 199 培地により  $1 \times 10^6$  promastigotes/mL に希釈して用いた。

活性評価 (*in vitro*): 試料は DMSO に溶解した後、Medium 199 培地で希釈し、メンブレンフィルターを通した。試料溶液は9つの濃度に調製し、96 穴マイクロタイタープレートに各濃度の試料溶液 50  $\mu$ L と、 $1 \times 10^5$  promastigotes/mL となるように調製した *L.*

*major* 液 50  $\mu$ L をそれぞれ接種し、培養液の全量を 100  $\mu$ L とした。27 度 5% CO<sub>2</sub> 下で 48 時間インキュベートを行った後、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)を測定した。試験は n=3 で行い、平均値および平均誤差を求めてグラフを作成した。IC<sub>50</sub>はグラフより求めた。

抽出と単離:*T. grandis* の葉は、ミキサーでメタノールとともにホモジナイズにより抽出した。メタノールエキスは、水と酢酸エチルで分配し、活性を示した酢酸エチル抽出物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した(*n*-hexane: ethyl acetate = 7:3, Silica gel 60N, 40-50  $\mu$ m, Kanto Chemical Co.,)分画した各フラクションについて、リーシュマニア原虫を用いたバイオアッセイを行ったところ fr.6 に顕著な活性が見られた(MIC=1.56  $\mu$ g/mL)。これに従って、さらにシリカゲル中圧カラムクロマトグラフィー(*n*-hexane: ethyl acetate = 1:1, UV254 nm, RI range 128)、ODS オープンカラムクロマトグラフィー(methanol: water = 8:2-9/1-95/5-100/0, Cosmosil 75C18-OPN, Nakalai tesque)、HPLC を繰り返し行うことで化合物 1 を得た。(HPLC condition : Mobile Phase/ acetonitrile:water-1:1, Detection/UV at 210 and 254 and 280, RI range 64, Column/ Shiseido CapcellPak C18 MG 5  $\mu$ m,  $\phi$ 20\*250 mm, Flow Rate/ 5.0 mL/min).

## C.研究結果

### 1. 植物エキスのマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対する影響:

本研究は現在も継続して行っており、本報告書で結果を報告するまでに至っていない。次の報告書で詳細に報告する。

## 2. ミャンマー産 *T. grandis* の活性成分の精製 および単離, 構造決定

化合物1は、<sup>1</sup>H-NMR において、アロマティックに結合した(7-8 ppm 付近)H が4つあり、そのカップリングパターンと化学シフトから(td,dd それぞれ2つずつ、*J* = 7.8, 1.0 Hz)) オルト位で2置換されたベンゼン環であることが推定された。また、共役系に結合したメキシ基 ( $\delta$  3.99 ppm)が1つ、7 ppm 付近にブロードシングレットを示す水酸基由来ピークが認められた。また<sup>13</sup>C NMR でも上記の部分構造を示唆しており、ベンゾキノン骨格を有することが明らかになった。(不飽和度は9, ベンゼン環由来炭素6本、キノン由来2本、カルボニル炭素1本、酸素化されたアロマティック炭素1本)。全体構造はHMBC及びH-H COSYスペクトルにより決定した。(図1, in CDCl<sub>3</sub>)。本化合物は、合成物に関して既に報告されているが、詳細なNMRデータはなく、現在まで天然物より得られた報告は無い。

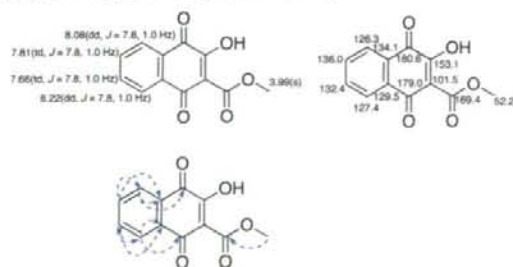


図1 化合物1の構造 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

化合物1の抗リーシュマニア活性を表1に示した。引き続き、*T. grandis* より活性化合物の分画を行っている。

表1 化合物1の抗リーシュマニア活性 (IC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)

sample	M	G	P	Per
化合物1	9.73	8.43	3.88	>25
AmB	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

M: *L. major*, G: *L. guyanensis*, P: *L. panamensis*, Per: *L. periviana*; AmB: amphotericin B, as positive control.

### D.E. 考察および結論:

ペルー産 *Carica candicans* は in vitro でよりも in vivo で顕著な活性が見出され、直接的ではなく細胞に働きかけるようなメカニズムによる抗 *Leishmania* 活性を有しているのではないかと予測し、ELISA を用いた炎症性サイトカインを検定する系を検討している。現在研究を行っている途中であるが、今後大量分離に備えてサンプルをペルーの研究者に依頼している。

ミャンマー産 *Tectona grandis* の葉酢酸エチル分画エキスは in vitro で顕著な活性が見出されており (6.25/12.5  $\mu$ g/mL, MIC/MLC)、これまで活用されていなかった自然落葉が抗 *Leishmania* 薬として利用されれば現在最も必要である「現地の患者に行き届いた治療」に貢献できるものと期待される。このエキスについても ELISA による検討を行っている。また今回得られた化合物はエキスに比較して活性がやや弱いためその他のフラクションにも活性を有する化合物が含まれていると考えられる。更に分画を進めていく予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1 Mori, K., Kawano, M., Fuchino, H., Agatsuma, Y., Satake, M., Kusumi, T., and Sekita, S. (2008). Antileishmanial compounds from a Myanmar Plant *Cordia*

*fragrantissima*. J Nat Prod 71 (1), 18-21.

2 Fuchino, H., Sekita, S., Mori, K., Kawahara, N., Satake, M., and Kiuch, K. (2008). A New Leishmanicidal Saponin from *Brunfelsia grandiflora*. Chem Pharm Bull 56 (1) 93-96

3 Konno, K., Rangel, M., Stolarz S. O., Cabrera, M. P. S., Fontana, R., Hirata, I. Y., IHide, I., Nakata, Y., Mori, K., Kawano, M., Fuchino, H., Sekita, S., Neto, J. R., (2007), Decoralin, a novel linear cationic  $\alpha$ -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. Peptide, 28(12), 2320-7,

## 2. 学会発表

1 Yasumoto, M.-K., Fuchino, H., Agatsuma, Y., Kusumi, T., Satake, M., and Sekita, S. (2008). Search of leishmanicidal constituents: The plants of Burma (Myanmar), Peru, and Nepal. IUPAC; ICOB-6 & ISCNP-26, July 13-18, Charlottetown, Canada.

2 橋本幸大, 安元(森)加奈未, 淵野裕之, 我妻豊, 佐竹元吉, 関田節子 (2008), 抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索 (その 16). 日本生薬学会第 55 年会, 平成 20 年 9 月 19-20 日, 長崎.

## G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成20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

薬用植物資源から医薬リード化合物の開発に関する研究

分担研究課題：外国産生薬からメタボリックシンドローム関連生理活性化合物の探索

研究分担者 渋谷 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栽培研究室長

研究協力者 松岡 隆 東京理科大学薬学部講師

メタボリックシンドロームは今や国民病であり、それらに対する予防策が厚生労働省における急務となっている。医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターでは国内外原産の多くの植物体を保存しており、それらの豊富な植物資源を用いて抗肥満、抗高脂血、インスリン抵抗性抑制物質探索、抗高血圧、糖吸収抑制、抗酸化活性、抗原虫活性などの網羅的な生物活性を検討した。今年度は細胞膜透過性を考慮した赤血球法による新規抗酸化活性判定法を採用し抗酸化物質の探索を行った。これらの結果を踏まえて今年度からは生理活性物質の単離構造解析を行い、活性画分より数種類の化合物を得た。

#### A. 研究目的

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、抗高脂血などの多面的スクリーニングを行うことにより、主としてメタボリックシンドロームの治療薬及び予防薬の開発リード化合物の探索を行う。薬用植物資源研究センターが有する国内外の広い範囲の植物資源を材料とし、現地での使用情報や文献情報を元に対象を絞り込んで生物活性試験を行

うことにより、効率的に医薬品候補植物を見いだすことが可能になると考えられる。

活性酸素は動脈硬化、糖尿病、ガンなどあらゆる疾病の発病に関与していると言われており、現在までに医薬品として用いられているものは脳虚血疾患治療薬のエダラボンくらいしかなく、その理由に安定性や組織透過性などの問題が上げられる。また抗酸化活性の *in vivo* での評価は困難であり、仮に動物を使用した場合多数のサンプルの評価ができないために *vivo* に近い結果が出せる *vitro* での評価系が望まれている。近年、細胞膜透過性を同時に評価できる赤血球法による抗酸化活性評価法が開発され、それによる植物エキスの評価を行うことが可能となった。

本研究は、これまで医薬品開発に十分利用されてきているとはいえない薬用植物

を、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のための資源として活用する道を拓こうとするものであり、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る。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。

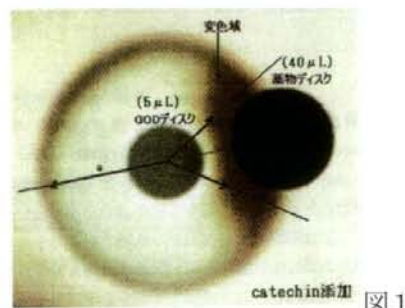
## B. 研究方法

昨年度はセンターが保有する植物の中から文献調査によって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の絞り込みを行い、抽出エキスを作成し、生物活性評価を行い、多くの植物エキスにおいて活性を見いだした。今年度は引き続き生物活性評価を行った他、活性を見いだした植物に関しては活性物質の精製単離を行った。

スクリーニングには、昨年度は脂肪細胞分化抑制活性(抗肥満物質の探索)、アンジオテンシン変換酵素(ACE)活性阻害活性(抗高血圧物質の探索)、アディポネクチン量測定(インスリン抵抗性抑制物質の探索)、 $\alpha$ -グルコシダーゼの抑制活性(糖吸収抑制物質の探索)、コレステロール吸収抑制活性(抗高脂血物質の探索)などの生物活性試験を用いたが、本年から赤血球法を用いた抗酸化活性評価も行った。

・抗酸化物質探索アッセイ(赤血球法)  
3.8%クエン酸ナトリウムを採取血液量10%以上加えて、マウスから心臓採血し、これに0.5%glucoseを含む生理食塩水を加え、遠心分離(2000rpm, 5°C, 10min)により3回洗浄した。0.5%glucoseを含む生理食塩水で採取血液量の約3倍の液量に希釈し、これを滅菌シャーレに

0.5mlずつ滴下した。予めオートクレーブで融解後約60°Cにしたリン酸緩衝液寒天培地6mLをこれに流し入れ、均一に混合し固化させた。試験物質を量り取り生理食塩水に溶かし、試験液(100、30、10、3、1mg/mL)とした。培地に6mm(薄手)と8mm(厚手)のペーパーディスクを2mm離して置いた。6mmのペーパーディスクにはGOD溶液を5 $\mu$ L添加し、8mmのペーパーディスクには試験液を40 $\mu$ L添加した。シャーレに不活性化(Ar)ガスを充填して37°Cで一晩培養した。溶血円の半径aをcontrol、bとcの平均をtestとして測定した。このとき薬物の影響を考え、接線から1mm外側を測定した。ここで、この測定地からディスク半径3mm分を差し引いた値を用い、グラフを測定した。(図1)



・抗原虫活性(*Leishmania major*)

用いた原虫は *Leishmania major* で promastigote 型を用いた。試料(エキス)をDMSOに溶解後、Meidum199で希釈し、濃度勾配をつけて96穴プレートに50 $\mu$ lずつ注入する。その後6x10<sup>5</sup>の濃度に調整した *Leishmania* 原虫を50 $\mu$ lずつ各ウェルに注入。その後27°C、5%CO<sub>2</sub>存在下で48時間インキュベートし、TetraColor One 試薬を10 $\mu$ lずつ注入しOD値(450-630nm)測定。6時間後にさらにOD値測定。グラフを作成しMLC(minimum lethal concentration)を算出



した。

昨年度のスクリーニングにおいて強い活性の見られた植物エキスに関しては、今年度より活性成分の精製単離および構造解析を行った。

今年度は強いアンジオテンシン転換酵素阻害活性のあったミャンマー産生薬 A、抗酸化活性（赤血球法）のあった、ポリビア産生薬 B、腸管モデルによるコレステロール吸収抑制効果の見られた種子島産植物 C、抗原虫活性（*Leishmania major*）の見られたペルー産生薬 *Lonchocarpus nicou* について成分の検討を行った。

### C. 研究結果

（注：一部の植物に関しては知的所有権取得の可能性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ルファベットでの記載にとどめます。化合物についても一部非開示とします。）

抗酸化活性（赤血球法）の結果は表 1（別紙）に示す通りである。

一般に抗酸化活性の評価に用いられている DPPH 法では効果があっても赤血球法では全く効果の見られない植物があるが、これらは細胞膜を通過できないものと考えられる。ポリビア産の生薬 B は、DPPH 法でも赤血球法でも極めて強い抗酸化活性を示した。そこで図 2 に示すように分離精製を行った。化合物はいずれもフラボノイドであり、化合物 5 はカテキンであった。カテキンはすでに本手法において強い活性を示すことが分かっており、本植物における抗酸化活性の活性本体の一部は本化合物に寄るものと言うことが明らかになった。化合物 1-4 はいずれもフラボノイド配糖体の誘導体である。

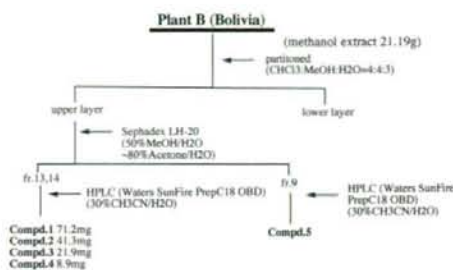


図 2 ポリビア産植物 B の分離精製チャート

アンジオテンシン転換酵素阻害活性を示したミャンマー産生薬 A に関しては、表 2 に示すように著しい阻害活性を示した。

ACE inhibitory effect (%)		
concentration		
1/10000	1/1000	1/100
8.4 ± 6.5	58.1 ± 18.6*	99.1 ± 13.0***

表 2 植物 A の ACE 阻害活性結果 (\*\*\*: p < 0.001)

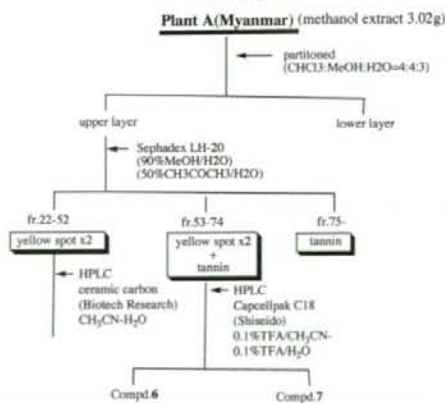
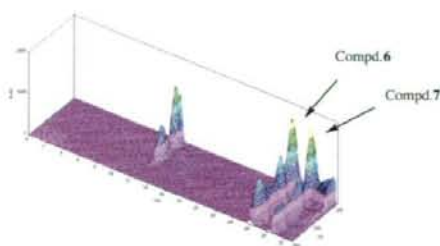


図 3 ミャンマー産植物 A の分離精製チャート



化合物 6, 7 は図3のように精製して得られた。その化学構造式は各種2次元NMRを詳細に解析した結果、フラボノイド配糖体の誘導体と考えられた。

Caco-2細胞を用いた腸管モデルを利用してコレステロール吸収抑制作用を検討した結果、昨年度種子島産植物Cに有意な吸収抑制作用が見られたため、その成分検索に着手し、図4のように分離精製を行い、活性分画からは化合物8, 9の2種類の化合物を単離した。これらは各種2次元NMRスペクトルデータからモノテルペン配糖体と考えられた。現在化合物単体での効果を検討している。

国名	部位	コレステロール相対量		
		濃度		
		1/10000	1/1000	1/100
種子島 (植物C)	whole plant	0.80*	0.80*	0.81*

表3 コレステロール吸収抑制作用結果 (\*: p < 0.05)

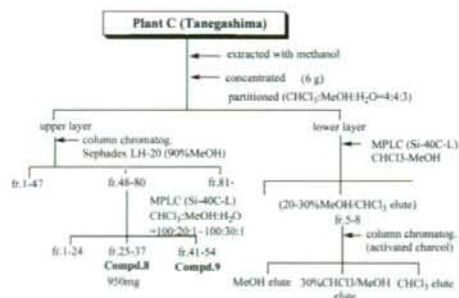


図4 種子島産植物Cの分離精製チャート

抗原虫作用として *Leishmania major* を用いた抗原虫活性を見たが、ペルー産生薬である *Lonchocarpus nicou* (現地名 Barbasco) について検討した結果、2種類の新規スチルベン化合物 10, 11 およびフラバノン化合物を活性本体として単離した。フラバノン化合物が抗原虫活性を示した例は少なく、結合したイソプレニ基が活性に影響を与えた可能性が考えられた。

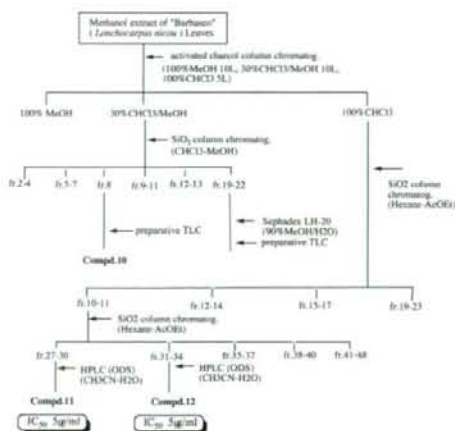
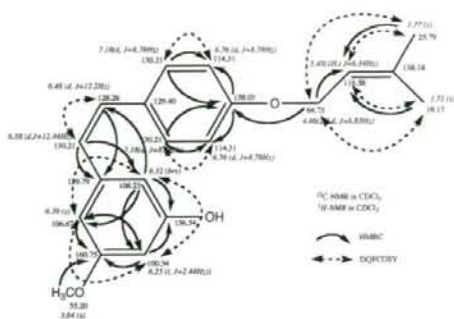
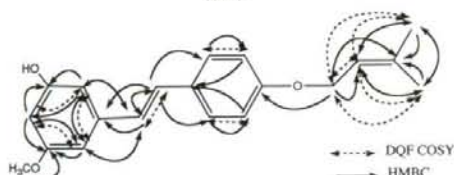


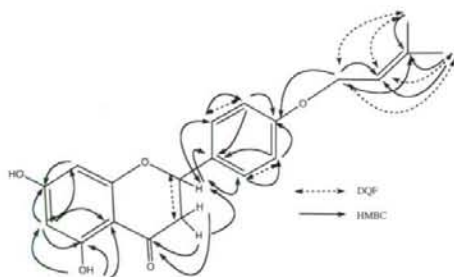
図5 ペルー産生薬 BARBASCO の分離精製チャート



化合物10の化学構造式および2次元NMR  
結果



化合物11の化学構造式および2次元NMR  
結果



化合物12の化学構造式および2次元NMR  
結果

COMPOUND	IC50 (microgram/ml)
10	21.6
11	5.0
12	5.0

表3 Barbasco から単離された抗原虫  
(Leishmania) 化合物と IC50 (*L. major*)

#### D. 考察および結論

今年度は昨年度のスクリーニングにおいて活性が認められた植物エキスの活性成分の検索を行ったが、多くの化合物を単離しその化学構造を確定させることができた。特に著しい ACE 阻害活性を有するミャンマー産生薬からは珍しい化学構造を有すフラボノイド配糖体を数種類得ている。また、腸管モデルを用いたコレステロール吸収抑制効果を有する種子島産植物から活性画分からモノテルペン配糖体を得ているが、本化合物自体が活性を示すかを現在検討しているところであり、もしそのような活性を有する化合物であれば、高脂血症に対する医薬リード化合物としての利用が可能と考えられ、興味深い結果と言える。また抗感染症(抗原虫)作用に関しては、現地ペルーにおいて実際に民間薬的にリーシュマニア症に対して用いているという生薬 Barbasco から、新規スチルベン化合物2種類とフラバノン化合物を活性化化合物として得ている。感染症の特効薬は歴史的に民間薬的に治療に用いている現地植物から得られる場合が多く(例えばマラリアのキニーネはキナノキから得られ、アルテミシニンはセイコウという植物から得られた)、これらをリード化合物とした創薬も考えられ、今後作用メカニズムも含めた検討ならびに *in vivo* での検討を検討する。

また今年度から検討した赤血球法による抗酸化活性評価において多くの外国産生薬に対してスクリーニングを行い、いくつか興味深い結果が得られたが、DPPH 法にて効果があつて赤血球法で効果が認められないものは、細胞膜への透過性がないものと考えられる。抗酸化化合物が医薬品への応用例が少ない理由の

1つに化合物の安定性の他に組織への透過性の問題が考えられるが、本手法において活性が見られたポリビア産生薬Bの活性画分から得られた5種類の化合物は膜透過性に優れ、また活性酸素は動脈硬化や糖尿病などの原因因子にもなるため、メタボリックシンドローム予防効果を期待できる医薬リード化合物または、原植物を用いた予防効果を持つ健康食品などへの応用が可能であると考えられた。

今年度は化合物探索を中心に行ったが、以上のように多くの興味深い化合物を単離、構造解析を行うことができ、本研究

事業における大きな成果を出すことができた。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表

特になし

#### 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