

200911008A

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・創薬モデル動物研究事業）

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21年度 総括・分担研究報告書

（H19—生物資源—一般-008）

研究代表者 瀧野 裕之

平成22年（2010）年3月

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・創薬モデル動物研究事業）

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21年度 総括・分担研究報告書

（H19—生物資源—一般-008）

研究代表者 淵野 裕之

平成22年（2010）年3月

目 次

I.	総括研究報告書	
	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	
	澁野 裕之1
II.	分担研究報告書	
	1. 外国産生薬から抗原虫活性およびメタボリックシンドロームに対する活性を有する薬用植物の探索	
	澁野 裕之11
	2. 日本産薬用植物スズメノナスビの α -グルコシダーゼ活性成分の探索	
	細川 敬三34
	3. アジアの薬用植物からの抗リーシュマニア活性物質の分離研究	
	関田 節子38
	4. 天然薬用資源植物から α -グルコシダーゼ阻害活性物質の探索	
	中根 孝久43
III.	研究成果の刊行に関する一覧表46

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

主任研究者 渋野 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

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メタボリックシンドロームをはじめとする様々な生物活性を検討した。また、熱帯地方特有の感染症であるリーシュマニア症の寄生原虫に対する抗原虫活性に関しても検討し、これらの活性化化合物の特定を試みた。ミャンマー産植物とボリビア産植物から得られた3種類のフラボノイド配糖体の没食子酸エステル類のACE阻害活性を検討したが、本化合物には弱い活性しか認められなかった。他に多く含まれていたタンニン類が本体と考えられた。ミャンマー産フウチョウソウ科植物にインスリン抵抗性抑制活性が、ミャンマー産クマツヅラ科植物に抗酸化活性が認められた。エキスの段階で強い抗酸化活性を示したボリビア産植物から2種類のキナ産エステルを得た。それらの抗酸化活性を検討中である。スズメノナスビ（果実）から分配クロマトグラフィー・シリカゲルカラムクロマトグラフィー・分取HPLCにより α -グルコシダーゼ阻害活性（スクラーゼとマルターゼ）を持つ成分 *methyl caffeate* を単離した。さらに、その類縁化合物13種類を合成しその結果、スクラーゼ阻害活性については、*methyl 3, 4, 5-trihydroxycinnamate* が、マルターゼ阻害活性は、*n-butyl caffeate* が最も強い活性を持つことを明らかにした。また植物由来天然有機化合物106種類にPPAR γ リガンド活性を検討し、ある特定の骨格に活性が認められた。PPAR γ リガンド活性は、近年糖尿病治療薬として注目されており、興味深いデータと考えられた。ミャンマー産フウチョウソウ科植物のメタノールエキスに脂肪細胞における顕著なアディポネクチン産生が認められた。網羅的遺伝子解析ではLPL（リポ蛋白リパーゼ）やCD36強く発現しており、中性脂肪を分解しPPAR γ を活性化することにより抗肥満作用を示す可能性が示唆された。成分検索の結果、フラボノイド配糖体のパラクマル酸エステルを単離したが、本化合物自体には強い活性が認められなかったため引き続き成分を検索している。ブラジル産生薬100種類のメタノールエキスを用い、 α -グルコシダーゼ阻害活性試験を行い、*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek（ニシキギ科）、*Naucleopsis amara* Ducke（クワ科）、*Astronium fraxinifolium* Schott（ウルシ科）に強い活性を見出した。

またペルー産生薬 *Barbasco* (*Lonchocarpus nicou*) の樹皮から新規化合物3種類を含む7種類の抗リーシュマニア活性化化合物を見出した。スチルベン化合物が中心であり、興味深い構造活性相関がみられた。ペルー国の協力研究者のもと、皮膚型リーシュマニア症患者に対する臨床試験が行われたが、*Shikonin* が顕著な抗リーシュマニア活性を示したことから、それを含有する漢方製剤「紫雲膏」の皮膚型患者への現地での臨床試験が行われ、良好な結果を示している。以前の報告において、ネパール産薬用植物 *Tulsi* の抗リーシュマニア成分を継続して行い、構造に誤認のあった化合物について構造の再解析を行った。パキスタン産薬用植物 *Withania coagulans* から多くのウイザノライド誘導体を分離構造決定し、報告したが、一部化合物の立体配置について誤りのあることが推定され、各種データを詳細に検討して、構造の訂正を行った。

分担研究者

関田節子 徳島文理大学香川薬学部教授

細川敬三 兵庫大学教授

中根孝久 昭和薬科大学講師

協力研究者

黒柳正典 県立広島大学生命環境学部名誉教授、徳島文理大学香川薬学部客員研究員

代田 修 徳島文理大学香川薬学部准教授

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用いられてきた植物成分から見出されてきた。しかしながら昨今はゲノム創薬が百花繚乱でありコンビナトリアルケミストリーやハイスループットスクリーニングなどという手法が主流になりつつあり、天然物、特に植物成分から医薬品を開発する方策は下火になりつつある。しかし上述の手法においては合成物が主体となっているため、骨格的な限界があると考えられている。植物はその多様な生合成能力により通常の化学合成では考えられない骨格形成を成し遂げられる。そのため奇異な骨格を有する植物成分が多く存在し、創薬資源としての植物成分がまた見直される機運にある。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においては全国に研究部を有し、その地方の気候にあった薬用植物を栽培保存しており、生きた植物だけでも保有数は4000種を超える。また筑波研究部においては国外の多くの生薬を保有しているなど薬用植物資源研究センターは国内でも最大規模の薬用植物リファレンスセンターである。

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。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、効率的に候補植物を見いだすことが可能になると考えられる。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、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。

活性酸素は動脈硬化、糖尿病、ガンなどあらゆる疾病の発症に関与していると言われていたが、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。

リーシュマニア症(*Leishmaniasis*)は、熱帯地方特有の寄生虫病であり、リーシュマニア原虫が吸血性昆虫であるサンショウバエ(*Sandfly*)により媒介される。吸血された際に血中に放出された原虫がマクロファージに取り込まれ感染が成立する。リーシュマニア原虫はマクロファージ内では無鞭毛型(*amastigotes*)となり、増殖を続ける。原虫種により内臓型、皮膚型、粘膜皮膚型の3つの型が存在する。

本感染症の大きな問題は治療薬が高価であることと注射剤であるために多くの患者が存在する途上国や僻地に住む患者が治療を受けられないという現実である。そこで本感染症が分布する地域の植物から治療薬を見出すため

に現地植物の抗リーシュマニア活性スクリーニングを行ってきた。今年度はミャンマー13種、UAE4種、ペルー21種、ソロモン32種、合計71種類の生薬エキスにスクリーニングを行なった。また今回ペルー国の協力のもと、ペルー国内に蔓延する皮膚型の治療薬の開発を目指し、現地生薬 *Barbasco* (*Lonchocarpus nicou*) の抗リーシュマニア活性化合物の検討を行った。また以前の報告において、ネパール産薬用植物 *Tulsi* の抗リーシュマニア成分を継続して行い、構造に誤認のあった化合物について構造の再解析を行った。パキスタン産薬用植物 *Withania coagulans* から多くのウイザノライド誘導体を分離構造決定し、報告したが、一部化合物の立体配置について誤りのあることが推定され、各種データを詳細に検討して、構造の訂正を行った。

またペルー国立サンマルコス大学医学部熱帯医学研究所Zuno Burstein教授の協力のもと、皮膚型リーシュマニア症の外用薬開発を行っており、以前我々の研究成果で得られたshikoninの抗リーシュマニア活性から漢方製剤の外用剤である「紫雲膏」の適用を考え、現地の皮膚型患者に対し、本軟膏剤の臨床試験を行った。

B. 研究方法

昨年度まで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、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アッセイを行った。スクリーニングには、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)、コレステロール吸収抑制活性(抗高脂血物質の探索)、赤血球法による抗酸化活性評価(以上分担：澁野)を行った。また、脂肪細胞

分化調節に関するマスターレギュレーターである核内受容体 PPAR γ に対するリガンド活性を植物由来の天然有機化合物106種類を用いて化合物レベルでの検討を行った(分担：澁野)。一部顕著なアディポネクチン量の亢進を示したミャンマー産植物エキスについてはDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行った(分担：澁野)。スズメノナスビの果実に含まれる α -グルコシダーゼ阻害活性成分を単離・同定するとともに、単離した活性成分の類縁化合物を合成し、 α -グルコシダーゼ阻害活性の構造活性相関について調べた(分担：細川)。ブラジル産生薬100種類を無作為に選抜し、メタノールエキスを作製し、 α -グルコシダーゼ阻害活性試験を行い、エキスの一次スクリーニングを行うとともに効率的な手法の検討を行った(分担：中根)。熱帯地方特有の感染症であるリーシュマニア症に対し有効な薬用植物の探索としてペルー民間薬 BARBASCO(*Lonchocarpus nicou*)の活性成分の検索を行った(分担：澁野)。またネパール産薬用植物 *Tulsi* の抗リーシュマニア活性成分の探索、パキスタン産薬用植物 *Withania coagulans* の報告単離化合物の立体配置の訂正を行った(分担：関田)。

また、生薬「紫根」の成分であるshikoninのin vitroにおける顕著な抗リーシュマニア活性から紫根を配合生薬とする漢方製剤の外用剤である「紫雲膏」の適用を考え、現地の皮膚型患者に対し、本軟膏剤の臨床試験を行った(分担：澁野)。

(アンジオテンシン転換酵素阻害活性)(分担：澁野)

被検薬物(植物エキスまたは化合物)をACE kit-WST(和光純薬)にてACE阻害活性を評価した。

(脂肪細胞分化抑制活性およびアディポサイトカイン量測定)(分担：澁野)

3T3-L1 脂肪前駆細胞を常法に従い脂肪前駆細胞培養用培地にて培養を行い、コンフルエント

に到達して2日後にデキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリンを含む分化誘導培地を被検薬物（植物抽出エキスまたは化合物）と混合した培地により分化誘導を行う。その際被検薬物を混合しない分化誘導培地のみを用いたものをコントロールとして用いた。その後2日おきにインスリンのみを含む脂肪細胞培養用培地と被検物質との混合培地を与え培養を続ける。脂肪滴が観察され始めたところで培養をやめ、細胞培養上清を採取し、アディポサイトカイン（アディポネクチン、レプチン）の定量をELISAにて行う。また細胞はオイルレッドOによる染色を行い、540nmにて吸光度の測定を行い脂肪滴の定量を行い、脂肪細胞分化抑制作用の確認を行う。

（抗酸化物質探索アッセイ（赤血球法））（分担：澁野）

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 μ L添加し、8mmのペーパーディスクには試験液を40 μ 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。

（抗原虫活性）（分担：澁野、関田）

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 μ lずつ注入する。その後6x10⁵の濃度に調整した *Leishmania* 原虫を50 μ lずつ各ウェルに注入。その後27°C, 5%CO₂存在下で48時間インキュベートし、TetraColor One 試薬を10 μ 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。

（核内受容体 PPAR γ に対するリガンド活性）（分担：澁野）

植物資源の脂肪細胞に対する効果を幅広くスクリーニングするために、植物より単離された天然有機化合物106種類などの脂肪細胞の分化調節に影響するとされている PPAR γ に対する活性を検討した。RCAS PPAR γ -CBP KIT (EnBio)を用いて行った。化合物の濃度は比較のためすべて40 μ Mにて行った。

（DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析）

ミャンマー産植物エキスを脂肪細胞に作用させ、その後TotalRNAを抽出し、ファルマフロンティア社製肥満・糖尿病（肥満・糖尿病解析システム）DNA マイクロアレイシステムにて網羅的遺伝子発現解析を行った。またWorldFusion社製遺伝子解析ソフトウェアPathwayStudioを用いてPathway解析も行った。

（ペルー国におけるリーシュマニア患者に対する紫雲膏の臨床試験）（分担：澁野）

ペルー国協力研究者による Zuno Burstein 教授により漢方の軟膏剤である紫雲膏の主成分 shikonin 類が強力な抗リーシュマニア活性を示したことから、紫雲膏の皮膚型リーシュマニア患者に対する臨床試験が行われている。また、現地民間薬を用いた皮膚型患者への外用剤としての適用を試みている。効果が見られた植物については順次日本側において成分検索を試みている。

（ α -グルコシダーゼ阻害活性）（分担：細川）

スズメノナスビの果実を 50%メタノール水溶液で抽出後に分配や各種クロマトグラフィーを行い精製を行った。α-グルコシダーゼは、市販のラット小腸 α-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 50μl, スクラーゼでは 200μl) と基質 (マルターゼでは 3.5mM マルトース 350μl, スクラーゼでは 56mM ショ糖 200μl) 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 100μl 加え全量を 500μl とし、37°C, 15 分間反応させ、750μl 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 に溶解させたものに相当する量を反応液に加えて測定を行った。

(α-グルコシダーゼ阻害活性) (分担：中根)

ブラジル産生薬のうち、葉を用部とするものは 50 g, 材を用部とするものは 100 g を量り、メタノール抽出を 3 回を行い、エキスを作成した。0.5mL 遠心チューブに、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 150 μL, 4%マルトース 50μL, 試料 (20 μL; 最終濃度 50 μg/mL), rat intestinal acetone powder (α-glucosidase) を加え、37 °C, 20 分間インキュベートを行った。反応終了後、100 °C, 3 分間加熱処理し酵素反応を停止した。5,000 rpm, 5 分間で遠心分離後、上清 5μL を 0.5 mL チューブにとり、グルコース測定キット用発色試薬 [グルコース CII テストワコー (和光純薬)] 0.2 mL を加え、37 °C, 20 分間インキュベートした。終了後、マイクロプレートリーダー (492

nm) で吸光度を測定した。本実験にはポジティブコントロールとして、α-グルコシダーゼ阻害薬 voglibose を用いた。

C. 研究結果

(アンジオテンシン転換酵素阻害活性)

昨年度の結果で ACE 阻害活性を示したミャンマー産生薬 *Diospyros burmanica* については分子内に galloyl 基を有するフラボノイド配糖体 Quercetin-3-O-[3,4,5-trihydroxybenzoyl-(→2)-β-D-glucuronopyranoside] を得たが、これらと同様の基本構造を有し、糖部分が rhamnose, arabinose に置き換わった化合物をポリビア産生薬 Jamillo de Durazno から得たため、それらの ACE 阻害活性を確認した結果、glucuronic acid 配糖体, arabinose 配糖体は弱い阻害活性を示し (1.0 μg/ml 濃度で 18.7%, 10 μg/ml 濃度で 18.1% のそれぞれ阻害活性), rhamnose 配糖体だけは中程度の阻害活性 (1.0 μg/ml 濃度で 33.0%) を示した。いずれの植物にもタンニンと思われる化合物が多く存在しており、それらが活性本体であることが考えられた。また、*Polygonum aviculare* Bert. ex Meissn (Polygonaceae) (パキスタン産), *Diospyros discolor* (Ebenaceae) (葉) (ミャンマー産), *Diospyros montana* (Ebenaceae) (葉) (ミャンマー産) の阻害活性の検討もを行い、その結果、*Polygonum aviculare* は 800 μg/ml の濃度で 58% の阻害活性を示した。

(赤血球法による抗酸化活性)

ポリビア産生薬 Jamillo de Durazno は当初その学名を入手経路からの情報により ヤドリギである *Viscum album* としていたが、その形態から学名に疑義が生じ、種子島研究部 杉本氏の協力により再鑑定を行い、同じヤドリギ属である *Ligaria cuneifolia* (Ruiz & Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) とした。本属植物は日本には存在せず大変貴重な植物資源と考えられる。本生薬は赤血球法による強い抗酸化活性を示したことから昨年度

Quercetin-3-O-[3,4,5-Trihydroxybenzoyl-(→2)-α-L-rhamnopyranoside],

Quercetin-3-O- [3,4,5-Trihydroxybenzoyl-(→2)- α -L-arabinoyranoside] と Catechin の 3 種類のフラボノイドを単離したが、今年度さらに成分検索を行い、新たに 3-O-galloylquinic acid とその methylester が得られた。それらを含めて現在化合物レベルでの活性を検討している。

赤血球法による抗酸化活性においては、さらにスクリーニングを進め、ミャンマー産 *Vitex trifolia* (和名：ミツバハマゴウ)、種子島産 *Vitex cannabifolia* (和名：ニンジンボク)、ペルー産 *Urtica dioica* (和名：セイヨウイラクサ) に活性が認められた。現在正確なデータと DPPH 法による検証を行っている。

(脂肪細胞分化抑制活性およびアディポサイトカイン量測定)

脂肪細胞を用いた検討においては、以前の一次スクリーニングにてピックアップされたソリザヤノキ *Oroxylum indicum* (Nepal), ヤサイカラスウリ *Coccinia grandis* (Pakistan, Ivy gourd), *Polypodium* sp. (現地名 Calahuala, Peru, rhizome), アルゼンチン産フウチョウソウ科植物, ミャンマー産フウチョウソウ科植物 (flower), *Pueraria tuberosa* (Birarganda whole plant, Nepal), ヒメキランソウ *Ajuga pygmaea* (種子島) の単離化合物について検討した。分化調節およびアディポサイトカイン量について検討した。その結果、ミャンマー産フウチョウソウ科植物においてアディポネクチンの分泌を明確に亢進することがわかった。本生薬の主成分を検討したところ、母核を Kaempferol とするフラボノイドの配糖体に *p*-coumaric acid がエステル結合しているものと推定された。糖部分は ¹³C-NMR からラムノース、グルコースと考えられた。しかしながら本化合物にはアディポネクチン産生効果も PPAR γ リガンド活性も見いだされなかった。現在その他の成分を検索している。

(核内受容体 PPAR γ に対するリガンド活性)

脂肪細胞に対する影響をさらに検討する目的で、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターで

ある核内転写因子である PPAR γ に対する 106 種類の天然有機化合物のリガンド活性を検討した。検討した化合物はほとんどが市販されていない希少化合物が多い。奇異な骨格を有するものも数多くあり、それらの生物活性はほとんど検討されていないことから興味を持たれるところである。セスキテルペンの pterosisin 系化合物から abietane, atisane, neoclerodane などのジテルペン類, dammarane, hopan, fernene などのトリテルペン類, 各種フラボノイド, アルカロイド, フェノール類など様々な骨格を有する化合物について評価を行った。その結果、ある種のトリテルペンの誘導体に強い活性を見出した。それらについては報告されていない事実であり、その結果には興味を持たれるところである。

(DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析)

脂肪細胞に対する作用においてアディポネクチン産生量が顕著に増加したミャンマー産フウチョウソウ科植物について、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い Pathway 解析を行った結果、Lipoprotein lipase (LPL) などを活性化し、中性脂肪の代謝を促進し、PPAR γ を活性化することにより抗肥満作用を示す可能性があることが考えられた。

(糖吸収阻害活性)

1) スズメノナスビ果実の α -グルコシダーゼ阻害活性成分

スズメノナスビの果実 50 g から各種クロマトグラフィーにより α -グルコシダーゼ阻害活性成分として 16 mg の methyl caffeate を単離・同定することができた。この活性成分の強さは、スクラーゼに対する IC₅₀ は 1.5 mM, マルターゼに対する IC₅₀ は 2.0 mM であった。Methyl caffeate とその類縁化合物 13 種類の α -グルコシダーゼ阻害活性について比較を行った。その結果、スクラーゼ阻害活性では、methyl 3,4,5-tri(methoxymethoxy)cinnamate が、methyl caffeate より強い阻害活性を示し、その IC₅₀ は 1.0 mM であった。一方、マルターゼ阻害活性では、

n-butyl caffeate が, methyl caffeate より強い阻害活性を示し, その IC₅₀ は 1.8 mM であった. これら 14 種類の類縁化合物から構造活性相関を調べたが, 相関は観察されなかった.

2) ブラジル産生薬の α -グルコシダーゼ阻害活性

ブラジル産生薬 100 種類の α -グルコシダーゼ阻害活性スクリーニングを行ったが, そのうち 3 種類 (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, *Naucleopsis amara* Ducke, *Astronium fraxinifolium* Schott) に強い阻害活性があることがわかった. 最も強い活性を示した *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek は阻害率 98.2%, 次いで強い活性を示した *Naucleopsis amara* Ducke は阻害率 94.2%, *Astronium fraxinifolium* Schott は 78.0%, であった.

(抗原虫活性)

71 種類の外国産生薬エキスに関して抗リーシュマニア活性スクリーニングを行った結果, *Elatostemma novae-britanniae*(Urticaceae), *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson(Compositae)の2種類に強い活性 (それぞれのMLCは50 μ g/ml) が見られた. いずれもソロモン諸島産の貴重な植物資源である. *E. novae-britanniae*は, 科学的な解明が全くされていない植物であり, 成分的に興味深い種である. またペルー (イキトス) 産の *Annona muricata* (Annonaceae)にもMLC 100 μ g/ml の活性が見られた.

ペルー生薬 *Barbasco* (*Lonchocarpus nicou*)枝の成分に関しては, 今回は新規スクリーニング手法の開拓のため, メタノール抽出エキスを2次元 TLC 展開を行い, 一定間隔での活性を測定し短時間で活性化合物のスポット検出を行う事を試み, いずれも UV 吸収のあるスポットに活性を見いだした. それらの単離・構造解析を行い, 新規スチルベン化合物3種, 既知スチルベン化合物2種, クロマン型化合物2種の計7種類の化合物を得た. それら化合物単独での活性は, いずれもシス体 stilben 化合物が活性が強く, phenol 性水酸基は置換されている方が活性が強

かった. クロマン型は全体に活性は弱かった. 抗リーシュマニア活性が認められ, 以前成分研究を行ったネパール産薬用植物である *Tulsi* (*Ocimum sanctum*)から, 今回新たに5種類の化合物を単離しその構造を確定した. これらの化合物はすべて eugenol ユニットが2から4個縮合したネオリグナン誘導体であることがわかる. これらの中には, ネオリグナン誘導体でありながら, 本来は生合性的にまったく異なるフラボノイドのグループに属する flavan-3-ol 骨格をもつ興味ある化合物が得られている. これらの化合物は文献未記載の新規化合物であった. また以前構造決定を行い報告した化合物について再度詳細にスペクトルデータを検討し構造を見直したところ, benzopyran 環を持った興味あるネオリグナン誘導体であることとなり構造を訂正した. 昨年度報告した *Withania coagulans* の成分の報告で, 5種類の新規 withanolide を含む 12 種類の withanolide の分離構造決定と抗リーシュマニア活性を報告したが, 新規化合物のうち2種類の化合物の構造の立体配置の一部に間違いのあることが明らかとなったので, その構造の検討を行った. ほとんどの場合, withanolide 誘導体では14位の立体は $\cdot\cdot$ 配置であるが, 今回得られた化合物では14位が \cdot 立体配置を有することが明らかとなり, 数少ない非常に興味ある例と考えられる.

(ペルー国におけるリーシュマニア患者に対する紫雲膏の臨床試験)

ペルー国協力研究者による皮膚型リーシュマニア症に対する紫雲膏の臨床試験では, 50名の患者に対して行い, 46名の患者に治療効果が認められた.

D. 考察

ミャンマー産 *Diospyros burmanica* はエキスでのスクリーニングにおいては強い ACE 阻害活性を示したが, 単離されたフラボノイド配糖体没食子酸エステル類は中程度の活性しか示さなかつ

た。本来同属植物のカキ *Diospyros kaki* は高血圧を抑える活性があり、その活性本体は分子量15000程度のタンニンであると報告されている。本植物にも多くのタンニンの存在が確認されており、それらが同様に活性本体であると推定された。

抗酸化活性を示したボリビア産 *Jamillo de Durazno* は *Ligaria cuneifolia* に学名が訂正された。植物の同定は最も重要な事であり、入手先からの情報だけでは誤った結果を導いてしまう。本植物からはやはりフラボノイド配糖体没食子酸エステル類が2種類と catechin が昨年度得られていたが、今年度さらにキナ酸の没食子酸エステル類2種類を得た。既に catechin は強い抗酸化活性を示すことが分かっているが、それらの化合物としての活性に興味を持たれるところである。

PPAR γ はインスリン抵抗性改善薬の分子標的であり、その agonist であるチアゾリジン系化合物などは糖尿病治療薬として注目を集めているところである。今回植物由来の多くの様々な骨格を有する天然有機化合物の agonist 活性を検討して得られた結果は今後の PPAR γ agonist 開発において重要な情報となると考えられる。

スズメノナスビの果実から α -グルコシダーゼ阻害活性を持つ成分 methyl caffeate を単離し、この類縁化合物から構造活性相関を検討したが、エステルの側鎖部分(アルコール基の側鎖)についての構造活性相関は観察されなかった。また、ベンゼン環に付加した水酸基の数に関しても構造活性相関は観察されなかった。スズメノナスビは、葉を生食および煮食に、半熟果実を魚やヤム等の食品とともに煮食に、若果は茹でてカレーや薬味に用いられている。従って、果実がデンプン分解酵素の作用を抑制することにより、食後の急激な血糖値の上昇を抑制することにより糖尿病疾患や肥満防止対策としての利用可能性が考えられる。また、ブラジル産生薬100種類の α -グルコシダーゼ阻害活性を行い、3種類 (*Maytemus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, *Naucleopsis amara* Ducke, *Astronium fraxinifolium* Schott) に強い阻害活性があること

がわかったが、最も強い活性を示した *Maytemus ilicifolia* Mart. Ex Reissek (ニシキギ科) は文献検索の結果、トリテルペノイド、セスキテルペノイドをはじめとした多くの化学構造が報告されている。次いで強い活性を示した *Naucleopsis amara* Ducke (クワ科) は化学成分に関する報告はなく、*Astronium fraxinifolium* Schott (ウルシ科) についても同様であった。これらは成分的にも興味を持たれるところであり本研究事業では報告はできなかったが今後検討していく予定である。

抗リーシュマニア活性に関しては、今回のスクリーニングの結果から活性が見られた生薬に関して文献調査を行ったところ、*Elatostemma novae-britanniae* は全く成分解明がされていない興味深い植物であった。*Mikania cordata* は成分として、 α -methylene- γ -butyrolactone 部分を有する germacrane 型セスキテルペンがいくつか報告されており、それらが活性本体と推測された。バンレイシ科の *Annona muricata* はサワーソップとも呼ばれペプチドを含めて多くの報告があり、tetrahydro-furaneacetogenin 類が主要成分でありそれらは広範な生物活性を有することから興味を持たれる化合物である。Barbasco 枝の成分として今年度単離した7種類の活性化合物の内、3種類は新規化合物であった(内1種類は天然物として新規)。2種類は葉の成分として既に昨年度報告した化合物と同一であった。また複雑な構造を有するクロマン化合物も今回初めて抗原虫活性化合物として単離した。これらの構造活性相関で、cis 体は trans 体よりも活性が強く、またフェノール性水酸基はメチル基で塞がれている方が活性が強かった。クロマン型はスチルベン型に比べ、活性は弱かった。ネパール産生薬である *Tulsi* の成分に関しては、新たに5種類の成分を分離しその構造を決定した結果いずれも新規化合物であることが明らかになった。また、先に報告した構造に誤りのあり、正しい構造式を明らかにすることがで

きた。これら化合物はすべて、eugenol ユニ
ットが2個から4個が縮合したネオリグナン誘
導体であることが明らかになった。これらのう
ち2種類はリグナン誘導体でありながら、その
基本骨格がフラボノイドに属する flavan-3-ol
構造を有しており非常に興味を持たれる。W.
coagulans から得られた withanolide 誘導体の正
しい立体配置を決めることができた。ほとん
どの場合、withanolide 誘導体では14位の立体
は・配置であるが、今回得られた化合物では
14位が・立体配置を有することが明らかと
なり、数少ない非常に興味ある例と考えられる。

ペルー国における漢方の軟膏剤紫雲膏を用
いた皮膚型リーシュマニア症患者への臨床試
験では、予想外の良好な治癒効果が認められ
た。紫雲膏には元々皮膚の外傷を修復する肉芽形
成促進作用があり、それに shikonin の抗原虫作
用が合わさることにより皮膚患部の治癒効果
を発揮したものと考えられた。なお、患部の生
検においても原虫の残存は認められなかった。
しかしながら紫雲膏の構成生薬はシコン（紫
根）とトウキ（当帰）であり、これらは南米に
は生育していないため、現地の患者が安価に用
いるには現地植物で代替可能なものを探す必
要があり、今後現地協力研究者らとその検討を
行っていく。

今後これらの結果は材料提供元であるペルー
研究者に情報としてフィードバックし、新たな
軟膏剤開発のための重要な基礎データとなると
考えられる。

E. 結論

今回は医薬基盤研究所薬用植物資源研究セ
ンターが保有している4000種類の生きた薬用
植物の他、多くの外国産生薬を用いた各種生理
活性化化合物の探索を行った。その結果、スズメ
ノナスピの α -glucosidase 阻害活性成分、ミヤン
マー産生薬 *Diospyros burmania* からアンジオテ
ンシン転換酵素阻害活性成分、ボリビア産生薬
Ligaria cuneifolia から抗酸化活性成分、ペルー産

生薬 *Lonchocarpus nicou*, ネパール産生薬
Ocimum sanctum, パキスタン産生薬 *Withania*
coagulans からは抗リーシュマニア活性成分を
得た。これらの化合物は今後の医薬品開発に向
けて有益な情報となると考えられた。

また106種類の天然有機化合物を用いた
PPAR γ リガンド活性スクリーニングでは報告
例のない数種類の化合物に強い活性を見出し
たことから、今後の糖尿病治療薬などになり得
る PPAR γ リガンド化合物開発の参考データに
なると考えられた。ペルー国との協力研究で進
められた漢方製剤紫雲膏の皮膚型リーシュマ
ニア症に対する良好な臨床試験結果は、現地患
者にとっては待望の外用剤であり、通院治療が
必要な現在の注射剤による治療が受けられな
い多くの僻地に住む患者にとっては朗報であ
り、特に現在の治療薬が適用できない妊婦にも
適用可能であると現地医師には喜ばれている。

植物成分は多種多様な化学構造を有してい
る。なおかつ植物は昔から人間の生活と密着し、
民間薬として人々の健康生活に貢献してきた
長い歴史がある。本研究事業で我々は多くの植
物の生物活性スクリーニングを通して植物成
分の有用性と創薬資源としての利用可能性を
探ってきた。これらの知見により今後創薬資源
としての植物成分の重要性が再認識されるこ
とを望む。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

(論文発表)

H. Fuchino, M. Kawano, K. Mri-Yasumoto, S.
Sekita, M. Satake, T. Ishikawa, F. Kiuchi, N.
Kawahara, *In Vitro* leishmanicidal activity of
benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia*
pearcei and related compounds, *Chem. Pharm. Bull.*,
投稿中 (2010)

Takahashi, K., Y. Yoshioka, E. Kato, S. Katsuki, O.

Iida, K. Hosokawa and J. Kawabata (2010)

α -Glucosidase inhibitor from *Solanum torvum*.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74

(4), 741-745(2010)

(学会発表)

1. 黒柳正典, 村田美紀, 代田修, 安元加奈未, 関田節子, 澁野裕之, 中根孝久: パキスタン *Withania coagulans* の抗リーシュマニア活性ステロイド. 第53回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 11月, 奈良 (2009)

2. 澁野 裕之, 川原 信夫, 安元 加奈未, 関田 節子, 佐竹 元吉: 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その19) —ペルー生薬Barbasco枝の成分について—日本薬学会第130年会, 3月29日, 岡山(2010)

3. 安元(森) 加奈未, 澁野 裕之, 我妻 豊, 佐竹 元吉, 関田 節子抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その20) —ミャンマー産植物

Kyun *Tectona grandis* Linn. f. の成分について 2

—日本薬学会第130年会, 3月29日, 岡山(2010)

4. 安元(森) 加奈未, 澁野裕之, 我妻 豊, 佐竹元吉, 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 (その17) —ミャンマー産植物 *Diospyros burmanica* の成分について—日本生薬学会第56回年会, 10月3日, 京都 (2009)

5. 澁野裕之, 木内文之, 川原信夫, 大部晃弘, 山中 梓, 和田浩志, 佐竹元吉, 安元 加奈未, 関田節子, 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その18) —ペルー産生薬Barbascoの成分について—日本生薬学会第56回年会, 10月3日, 京都 (2009)

G 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 一部検討中
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

天然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：外国産生薬から抗原虫活性およびメタボリックシンドロームに対する
活性を有する薬用植物の探索

研究分担者 澁野 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

研究協力者 松岡 隆 東京理科大学薬学部講師

研究協力者 Zuno Burstein Institute of “Daniel Carrion” Tropical Medicine, National University of San
Marcos, Peru

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メタボリックシンドロームをはじめとする様々な生物活性を検討した。また、熱帯地方特有の感染症であるリーシュマニア症の寄生原虫に対する抗原虫活性についても検討し、これらの活性化合物の特定を試みた。ミャンマー産植物とボリビア産植物から得られた3種類のフラボノイド配糖体の没食子酸エステル類のACE阻害活性を検討したが、本化合物には弱い活性しか認められなかった。他に多く含まれていたタンニン類が本体と考えられた。ミャンマー産フウチョウソウ科植物にインスリン抵抗性抑制活性が、ミャンマー産クマツヅラ科植物に抗酸化活性が認められた。エキスの段階で強い抗酸化活性を示したボリビア産植物から2種類のキノ産エステルを得た。それらの抗酸化活性を検討中である。また植物由来天然有機化合物106種類にPPAR γ リガンド活性を検討し、ある特定の骨格に活性が認められた。またペルー産生薬 *Barbasco* (*Lonchocarpus nicou*)の樹皮から新規化合物3種類を含む7種類の抗リーシュマニア活性化合物を見出した。Shikoninが以前抗リーシュマニア活性を示したことから、それを含有する漢方製剤「紫雲膏」の皮膚型リーシュマニア患者への現地での臨床試験が行われ、良好な結果を示している。

A. 研究目的

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。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、効率的に候補植物を見出すことが可能になると考えられる。本研究は、これまで医薬品開発に十分利用されてきていない薬用植物を、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。

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いたが、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。

リーシュマニア症(Leishmaniasis)は、熱帯地方特有の寄生虫病であり、リーシュマニア原虫が吸血性昆虫であるサシチョウバエ(Sandfly)により媒介される。吸血された際に血中に放出された原虫がマクロファージに取り込まれ感染が成立する。リーシュマニア原虫はマクロファージ内では無鞭毛型(amastigotes)となり、増殖を続ける。原虫種により内臓型、皮膚型、粘膜皮膚型の3つの型が存在する。

本感染症の大きな問題は治療薬が高価であることと注射剤であるために多くの患者が存在する途上国や僻地に住む患者が治療を受けられないという現実である。そこで本感染症が分布する地域の植物から治療薬を見出すために現地植物の抗リーシュマニア活性スクリーニングを行ってきた。今年度はミャンマー13種、UAE4種、ペルー21種、ソロモン32種、合計71種類の生薬エキスをスクリーニングを行なった。また今回ペルー国の協力のもと、ペルー国内に蔓延する皮膚型の治療薬の開発を目指し、現地生薬Barbasco (*Lonchocarpus nicou*)の抗リーシュマニア活性化化合物の検討を行った。

またペルー国立サンマルコス大学医学部熱帯医学研究所Zuno Burstein教授の協力のもと、皮膚型リーシュマニア症の外用薬開発を行っており、以前我々の研究成果で得られたshikoninの抗リーシュマニア活性から漢方製剤の外用剤である「紫雲膏」の適用を考え、現地の皮膚型患者に対し、本軟膏剤の臨床試験を行った。

B. 研究方法

昨年度まで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、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アッセイを行った。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)、コレステロール吸収抑制活性(抗高脂血物質の探索)、赤血球法による抗酸化活性評価を行った。また、脂肪細胞分化調節に関するマスターレギュレーターである核内受容体PPAR γ に対するリガンド活性を検討し、植物由来の天然有機化合物106種類、脂肪細胞にて明確にアディポネクチン分泌を亢進したミャンマー産植物エキスとそれから得られたFlavonoid配糖体、アカヤジオウ、カイケイジオウのメタノール抽出エキスについて行った。

(アンジオテンシン転換酵素阻害活性)

被検薬物(植物エキスまたは化合物)をACE kit-WST(和光純薬)にてACE阻害活性を評価した。

(脂肪細胞分化抑制活性およびアディポサイトカイン量測定)

3T3-L1 脂肪前駆細胞を常法に従い脂肪前駆細胞培養用培地にて培養を行い、コンフルエントに到達して2日後にデキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリンを含む分化誘導培地を被検薬物(植物抽出エキスまたは化合物)と混合した培地により分化誘導を行う。その際被検薬物を混合しない分化誘導培地のみを用いたものをコントロールとして用いた。その後2日おきにインスリンのみを含む脂肪細胞培養用培地と被検物質との混合培地を与え培養を続ける。脂肪滴が観察され始めたところで培養をやめ、細胞培養上清を採取し、アディポサイトカイン(アディポネクチン、レプチン)の定量をELISAにて行う。また細胞はオイルレッドOによる染色を行い、450nmにて吸光度の測定を行い脂肪滴の定量を行い、脂肪細胞分化抑制作用の確認を行う。

(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 μ L添加し、8mmのペーパーディスクには試験液を40 μ 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)

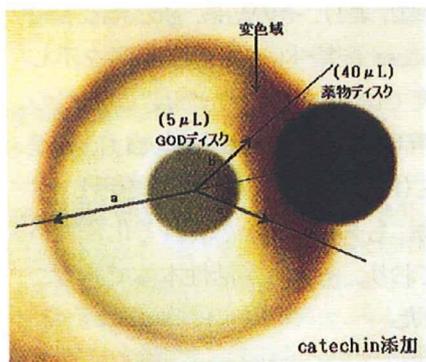


図1

(抗原虫活性)

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 μ Lずつ注入する。その後6x10⁵の濃度に調整した *Leishmania* 原虫を50 μ Lずつ各ウェルに注入。その後27°C, 5%CO₂存在下で48時間インキュベートし、TetraColor One 試薬を10 μ 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。

(核内受容体PPAR γ に対するリガンド活性)

植物資源の脂肪細胞に対する効果を幅広くスクリーニングするために、植物より単離された天然有機化合物106種類などの脂肪細胞の分化調節に影響するとされているPPAR γ に対する活性を検討した。RCAS PPAR γ -CBP KIT (EnBio)を用いて行った。化合物の濃度は比較のためすべて40 μ Mにて行った。(対象とした化合物群は後ろに記載したが化合物の詳細に関しては知的所有権取得の可能性から記載せず)

(DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析)

ミャンマー産フウチョウソウ科植物エキスを脂肪細胞に作用させ、その後TotalRNAを抽出し、ファルマフロンティア社製肥満・糖尿病(肥満・糖尿病解析システム)DNAマイクロアレイシステムにて網羅的遺伝子発現解析を行った。またWorldFusion社製遺伝子解析ソフトウェアPathwayStudioを用いてPathway解析も行った。

(ペルー国におけるリーシュマニア患者に対する紫雲膏の臨床試験)

ペルー国協力研究者によるZuno Burstein教授により漢方の軟膏剤である紫雲膏の主成分shikonin類が強力な抗リーシュマニア活性を示したことから、紫雲膏の皮膚型リーシュマニア患者に対する臨床試験が行われている。現地カウンターパートより、「紫雲膏」に関する情報を求められた。すなわち、ペルー国内において臨床試験を実施するにあたり、現地で全く知見のない漢方薬の軟膏剤が日本において実際に広く用いられていることを証明する文献等の提出が求められ、我々はそれに応じて、外用薬としての治療効果などの各種文献情報、ならびに紫雲膏製造メーカーにお願いし、厚生大臣の製造許可証のコピーをもらい、現地に送付した。それによりペルー国内地域健康局の許可を得て、2005年より前臨床試験が開始された。方法としては、既存の薬物が奏功しない患者、妊婦

等既存薬物を投与できない患者を選択し、対象患者とした。また、適応前にアレルギーテストを行った。使用した紫雲膏は、松浦薬業社製 500 g 入りを用いた。

臨床試験プロトコール

1. 患部の写真を撮影する。
2. 臨床疫学の書式を作成。
3. 寄生虫診断のためのサンプルを採取（塗抹標本，培養，生検）。
4. 同意承諾の上，署名後，1 か月間軟膏剤（紫雲膏）を適用。
5. 観察を週単位で行う。
6. 寄生虫の観察を2週間ごとに行う。
7. 軟膏剤の治療を中止後，3 か月間観察する。
8. 生検観察を行う。
9. 再発を確認するために，2 ヶ月後に観察する。
10. 報告書を作成。

今回の患者のリーシュマニア症の診断は以下の方法による。

1. 塗抹標本（ギムザ染色）
2. リーシュマニア皮膚試験（モンテネグロ皮内試験）
3. 生検

今回の対象とした患者は，San Martín 県（Moyobamba 郡），Cajamarca 県（Jaén 郡），Lima 県（University of San Marcos），Huánuco 県（Marañon 郡）の患者である。Lima 県の患者は Institute of Tropical Medicine, “Daniel A. Carrion” National University of San Marcos の患者である。

（倫理面への配慮）

本研究において，皮膚型リーシュマニア症患者に対する我が国の漢方方剤紫雲膏の患部への適用をペルー国立サンマルコス大学医学部“Daniel Carrion”熱帯医学研究所において現地医師により行なわれたが，現地から当該治療薬の文献等の提出が予め求められ，我々はそれに応じて，外用薬としての治療効果などの各種文献情報，ならびに現地で使用した紫雲膏の製造

メーカーにおける厚生大臣の製造許可証のコピーを現地に送付した。それによりペルー国内地域健康局の正式な許可を得て，前臨床試験が開始された。方法としては，既存の薬物が奏功しない患者，妊婦等既存薬物を投与できない患者を選択し，対象患者とした。またこれらはすべてペルー国内における臨床試験のガイドライン（ヘルシンキ宣言に則る）に沿って適正に行われている旨の連絡を受けており倫理面については問題はない。

C. 研究結果

昨年度の結果でACE阻害活性を示したミャンマー産生薬 *Diospyros burmania* については分子内に galloyl 基を有するフラボノイド配糖体 Quercetin- 3-O-[3,4,5-trihydroxy benzoyl-(\rightarrow 2)- β -D- glucuronopyranoside] を得たが，これらと同様の基本構造を有し，糖部分が rhamnose, arabinose に置き換わった化合物をボリビア産生薬 Jamillo de Durazno から得たため，それらのACE阻害活性を確認した（図2，表1）。その結果，glucuronic acid 配糖体，arabinose 配糖体は弱い阻害活性を示し（1.0 μ g/ml 濃度で18.7%，10 μ g/ml 濃度で18.1%のそれぞれ阻害活性），rhamnose 配糖体だけは中程度の阻害活性（1.0 μ g/ml 濃度で33.0%）を示した。いずれの植物にもタンニンと思われる化合物が多く存在しており，それらが活性本体であることが考えられた。

また，今年度はさらに *Polygonum aviculare* Bert. ex Meissn (Polygonaceae) (No.79) Pakistan ミチヤナギ，*Diospyros discolor* (Ebenaceae) (Leaves, No.91) Myanmar ケガキ，*Diospyros montana* (Ebenaceae) (Leaves) Myanmar エボニー，コクタン の阻害活性の検討も行った（表2）。その結果，*Polygonum aviculare* は800 μ g/ml の濃度で58%の阻害活性を示した。

ボリビア生薬 Jamillo de Durazno は当初その学名を入手経路からの情報によりヤドリギである *Viscum album* としていたが，その形態から学名に

疑義が生じ、種子島研究部杉村氏の協力により再鑑定を行い、同じヤドリギ属である*Ligaria cuneifolia* (Ruiz&Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) とした。本属植物は日本には存在せず大変貴重な植物資源と考えられる。本生葉は赤血球法による強い抗酸化活性を示したことから昨年度 Quercetin-3-O-[3,4,5- Trihydroxybenzoyl-(→2)- α -L-rhamnopyranoside], Quercetin-3-O-[3,4,5-Trihydroxybenzoyl-(→2)- α -L-arabinopyranoside] とCatechinの3種類のフラボノイドを単離したが、今年度さらに成分検索を行い、新たに3-O-galloylquinic acidとそのmethylesterが得られた(図3)。それらを含めて現在化合物レベルでの活性を検討している。

赤血球法による抗酸化活性においては、さらにスクリーニングを進め、ミャンマー産*Vitex trifolia* (和名: ミツバハマゴウ), 種子島産*Vitex cannabifolia* (和名: ニンジンボク), ペルー産*Urtica dioica* (和名: セイヨウイラクサ) に活性が認められた(表3)。現在正確なデータとDPPH法による検証を行っている。

脂肪細胞を用いた検討においては、ソリザヤノキ*Oroxylum indicum* (Nepal, No.34), ヤサイカラスウリ*Coccinia grandis* (Pakistan, No.36, Ivy gourd), *Polypodium* sp. (現地名Calahuala, Peru, rhizome, No.82), アルゼンチン産フウチョウソウ科植物(No.83), ミャンマー産フウチョウソウ科植物 (flower, No.87), *Pueraria tuberosa*

(Birarganda whole plant, Nepal No.103), ヒメキラソウ*Ajuga pygmaea* (種子島) の単離化合物について検討した(図4, 図5)。しかしながらそれらエキスの溶解性に問題があり、溶解補助剤として用いたDMSOが細胞に影響を及ぼしていることがわかり、最終的にはPBSに懸濁して行うことにした。その結果、ミャンマー産フウチョウソウ科植物においてアディポネクチンの分泌を明確に亢進することがわかった。本生葉の主成分を検討したところ、母核をKaempferolとするフラボノイドの配糖体に

-coumaric acidがエステル結合しているものと推定された。糖部分は

13C-NMRからラムノース, グルコースと考えられた。しかしながら本化合物にはアディポネクチン産生効果もPPAR γ リガンド活性も見いだされなかった。

脂肪細胞に対する影響をさらに検討する目的で、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである核内転写因子であるPPAR γ に対する106種類の天然有機化合物(図6)のリガンド活性を検討した結果、ある骨格の特異的なエステル類に活性が明確に見られた(図7)。

脂肪細胞に対する作用においてアディポネクチン産生量が顕著に増加したミャンマー産フウチョウソウ科植物について、DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行いPathway解析を行った結果、Lipoprotein lipase(LPL)などを活性化し、中性脂肪の代謝を促進し、PPAR γ を活性化することにより抗肥満作用を示す可能性があることが考えられた(表4)。

71種の外国産生薬エキスに関して抗リシューマニア活性スクリーニングを行った結果(表5), *Elatostemma novae-britanniae*(Urticaceae), *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson(Compositae)の2種類に強い活性(それぞれのMLCは50 μ g/ml)が見られた。いずれもソロモン諸島産の貴重な植物資源である。*E. novae-britanniae*は、科学的な説明が全くされていない植物であり、成分的に興味深い種である。またペルー(イキトス)産の*Annona muricata* (Annonaceae)にもMLC 100 μ g/mlの活性が見られた。

ペルー生薬Barbasco (*Lonchocarpus nicou*)枝の成分に関しては、今回は新規スクリーニング手法の開拓のため、メタノール抽出エキスを2次元TLC展開を行い、一定間隔での活性を測定し短時間で活性化合物のスポット検出を行う事を試み、いずれもUV吸収のあるスポットに活性を見いだした。それらの単離・構造解析を行い、新規スチルベン化合物3種、既知スチルベン化合物2種、クロマン型化合物2種の計7種類の化合物を得た。それら化合物単独での活性は、いずれもシス体stilben化合物が活性が強く、phenol性水酸

基は置換されている方が活性が強かった。クロマン型は全体に活性は弱かった (図8, 9)。

ペルー国協力研究者による皮膚型リーシュマニア症に対する紫雲膏の臨床試験では、50名の患者に対して行い、46名の患者に治癒効果が認められた。

D. 考察

ミャンマー産 *Diospyros burmanica* はエキスでのスクリーニングにおいては強い ACE 阻害活性を示したが、単離されたフラボノイド配糖体没食子酸エステル類は中程度の活性しか示さなかった。本来同属植物のカキ *Diospyros kaki* は高血圧を抑える活性があり、その活性本体は分子量15000程度のタンニンであると報告されている。本植物にも多くのタンニンの存在が確認されており、それらが同様に活性本体であると推定された。

抗酸化活性を示したボリビア産 *Jamillo de Durazno* は *Ligaria cuneifolia* に学名が訂正された。植物の同定は最も重要な事であり、入手先からの情報だけでは誤った結果を導いてしまう。本植物からはやはりフラボノイド配糖体没食子酸エステル類が2種類と catechin が昨年度得られていたが、今年度さらにキナ酸の没食子酸エステル類2種類を得た。既に catechin は強い抗酸化活性を示すことが分かっているが、それらの化合物としての活性に興味を持たれるところである。

PPAR γ はインスリン抵抗性改善薬の分子標的であり、その agonist であるチアゾリジン系化合物などは糖尿病治療薬として注目を集めているところである。今回植物由来の多くの様々な骨格を有する天然有機化合物の agonist 活性を検討して得られた結果は今後の PPAR γ agonist 開発において重要な情報となると考えられる。

抗リーシュマニア活性に関しては、今回のスクリーニングの結果から活性が見られた生薬に関して文献調査を行ったところ、*Elatostemma novae-britanniae* は全く成分解明がされていない興味深い植物であった。*Mikania cordata* は成分として、 α -methylene- γ -butyrolactone 部分を有する

germacrane 型セスキテルペンがいくつか報告されており、それらが活性本体と推測された。バンレイシ科の *Annona muricata* はサワーソップとも呼ばれペプチドを含めて多くの報告があり、tetrahydro-furaneacetogenin 類が主要成分でありそれらは広範な生物活性を有することから興味を持たれる化合物である。

Barbasco 枝の成分として今年度単離した7種類の活性化合物の内、3種類は新規化合物であった (内1種類は天然物として新規)。2種類は葉の成分として既に昨年度報告した化合物と同一であった。また複雑な構造を有するクロマン化合物も今回初めて抗原虫活性化合物として単離した。これらの構造活性相関で、cis 体は trans 体よりも活性が強く、またフェノール性水酸基はメチル基で塞がれている方が活性が強かったクロマン型はスチルベン型に比べ、活性は弱かった。今後これらの結果は材料提供元であるペルー研究者に情報としてフィードバックし、新たな軟膏剤開発のための重要な基礎データとなると考えられる。

ペルー国における漢方の軟膏剤紫雲膏を用いた皮膚型リーシュマニア症患者への臨床試験では、予想外の良好な治癒効果が認められた。紫雲膏には元々皮膚の外傷を修復する肉芽形成促進作用があり、それに shikonin の抗原虫作用が合わさることにより皮膚患部の治癒効果を発揮したものと考えられた。なお、患部の生検においても原虫の残存は認められなかった。しかしながら紫雲膏の構成生薬はシコン (紫根) とトウキ (当帰) であり、これらは南米には生育していないため、現地の患者が安価に用いるには現地植物で代替可能なものを探す必要があり、今後現地協力研究者らとその検討を行っていく。

E. 結論

多くの外国産生薬を用いた各種生理活性化合物の探索を行った。その結果、ミャンマー産生薬 *Diospyros burmanica* からアンジオテンシン

転換酵素阻害活性成分, ボリビア産生薬 *Ligaria cuneifolia* から抗酸化活性成分, ペルー産生薬 *Lonchocarpus nicou* からは抗リーシュマニア活性成分を得た。これらの化合物は今後の医薬品開発に向けて有益な情報となると考えられた。

また 106 種類の天然有機化合物を用いた PPAR γ リガンド活性スクリーニングでは報告例のない数種類の化合物に強い活性を見出したことから, 今後の糖尿病治療薬などになり得る PPAR γ リガンド化合物開発の参考データになると考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

(論文発表) H. Fuchino, M. Kawano, K. Mri-Yasumoto, S. Sekita, M. Satake, T. Ishikawa, F. Kiuchi, N. Kawahara, *In Vitro* leishmanicidal activity of benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia pearcei* and related compounds, *Chem. Pharm. Bull.*, 投稿中 (2010)

(学会発表)

(1) 湊野 裕之, 川原 信夫, 安元 加奈未, 関田 節子, 佐竹 元吉: 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その19) —ペルー産生薬 *Barbasco* 枝の成分について—日本薬学会第130年会, 3月29日, 岡山(2010)

(2) 湊野裕之, 木内文之, 川原信夫, 大部晃弘, 山中 梓, 和田浩志, 佐竹元吉, 安元 加奈未, 関田節子, 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その18) —ペルー産生薬 *Barbasco* の成分について—日本生薬学会第56回年会, 10月3日, 京都 (2009)

(3) 湊野 裕之, 河野 真理衣, 木内 文之, 安元(森) 加奈未, 関田 節子, 佐竹 元吉, Fernando CABIÉSSES, Zuno BURSTEIN, Abelardo TEJADA, 紫雲膏の皮膚型リーシュマニア症に対する臨床試験について 日本薬学会第129年会, 3月27日, 京都 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 一部検討中
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし