

200911008B

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19年度～21年度 総合研究報告書

（H19—生物資源—一般-008）

研究代表者 湊野 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19年度～21年度 総合研究報告書

（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

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19年度～21年度 総合研究報告書

(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

目 次

I.	総合研究報告書	
	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.	研究成果の刊行に関する一覧表33
III.	研究成果の刊行物・別刷34

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

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

主任研究者 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

研究要旨 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）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様々な生物活性評価を行った。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、これらの活性化合物の特定を試みた。平成19～20年度は各研究部で系統保存している植物種および周辺に自生する植物抽出エキスサンプル数1288点について各種活性（グルコシダーゼ阻害活性、リパーゼ阻害活性、抗酸化活性、抗発がん活性、チロシナーゼ阻害活性、抗ダイオキシシン活性）スクリーニングの*in vitro*でのアッセイを実施した。その結果、アミラーゼ阻害活性ではアメリカニガキなど10植物種、スクラーゼ阻害活性ではスズメナスビなど10植物種、マルターゼ阻害活性ではスズメナスビなど12植物種、リパーゼ阻害活性ではヤマブドウなど13植物種、抗酸化活性ではエゾミソハギなど14植物種、抗発癌プロモーター活性ではオオヨモギなど14植物種、チロシナーゼ阻害活性ではオオウバユリなど14植物種、ダイオキシシン毒性阻害活性ではハマナスなど8植物種で活性が認められた。また外国産生薬についてもアルゼンチン生薬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種類を同様にエキスを作成後に脂肪細胞を用いた分化抑制（抗肥満）活性、インスリン抵抗性抑制活性の他、アンジオテンシン転換酵素阻害活性、コレステロール吸収抑制活性、 α -グルコシダーゼ阻害活性、赤血球法による抗酸化活性について検討した。その結果、ノウゼンカズラ科、トウダイグサ科の植物エキスに強い脂肪細胞分化抑制活性を見出した。ミャンマー産生薬 *Diospyros burmania* に強力なACE阻害活性を認めた。赤血球法による抗酸化活性を検討したところ、ボリビア産生薬 *Jamillo de Durazno* に強い抗酸化活性を認めた。これらのスクリーニング結果を元に、20年度からは活性成分の探索を行った。その結果、筑波研究部産コデマリの花エキスよりマルターゼ阻害活性を有するフラボノイド配糖体を得た。またスズメナスビからは α -グルコシダーゼ阻害活性を有する *methyl caffeate* を得た。外国産生薬からは強いACE阻害活性を示したミャンマー産カキ属植物 *Diospyros burmania* から、フラボノイド配糖体の没食子酸エステルを得た。赤血球法による抗酸化活性を示したボリビア産生薬 *Jamillo de Durazno* からは同様にフラボノイド配糖体の没食子酸エステルを得た。脂肪細胞を用いた

分化抑制活性、インスリン抵抗性抑制活性（アディポネクチン産生）では、ミャンマー産フウチヨウソウ科植物などに明確な活性を見出したため成分検索を行ったが、主成分であったフラボノイド配糖体には活性は認められなかった。しかしながら網羅的遺伝子発現解析の結果、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。また、熱帯感染症であるリーシュマニア症については、19年度94種類、20年度40種類、21年度71種類、合計3カ年で205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。ペルー国協力研究者より提供されたペルー生薬Barbasco (*Lonchocarpus nicou*) 葉および枝、Matico (*Piper angustifolium*)、ミャンマー産カキノキ科 (Ebenaceae) 植物、クマツヅラ科 (Verbenaceae) 植物、マメ科 (Legminosae) 植物、パキスタン産ナス科 *Withania coagulans*、キク科 *Artemisia scoparia*、キク科 *Cousinia stoksi*、ネパール産薬用植物 *Ocimum sanctum* の9種類について、活性成分の探索を行った。Barbasco からは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。*Piper angustifolium* からは20種類の化合物を分離しそのうち10種類の化合物が新規化合物であるなど、多くの活性成分を解明した。ペルー国研究者の協力で、日本の漢方軟膏剤紫雲膏の皮膚型リーシュマニア症に対する臨床試験が行われ、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るなど良好な結果を得た。

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
黒柳正典 県立広島大学生命環境学部教授 (平成19~20年度)
中根孝久 昭和薬科大学講師 (平成21年度)

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。

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

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

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。

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。

本研究事業においては、以上のような幅広い疾患に目を向け、創薬資源としての植物資源を用いてそれらの疾患に対して効果のある植物を見出していく。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。

B. 研究方法

1) 植物材料

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター各研究部の協力を得て収集した植物サンプルは以下の通りで、全サンプル数 1288 点である。

- ・北海道研究部関係：48 科 109 種 206 サンプル
- ・筑波研究部関係：74 科 225 種 525 サンプル
- ・種子島研究部関係：112 科 327 種 557 サンプル

また筑波研究部保存の外国産生薬に関してはセンターが保有する植物の中から文献調査(主に直近の *J.Ethnopharmacology* など)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、約 180 種類の植物をピックアップし、そのうち保有しているもの、あるいはその同属植物生薬のエキスを選抜し、結果、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 種類をスクリーニングに用いた。また、 α -グルコシダーゼ阻害活性には他にブラジル産生薬 100 種を用いた。抗感染症(抗原虫)活性の評価にはアルゼンチン産 6 種類、ペルー産 27 種類、パキスタン産 11 種類、ソロモン諸島産 32 種類、ミャンマー産 125 種類などを用いてスクリーニングを行った他、成分検索にはネパール産、パキスタン産、ペルー側協力研究者より提供された植物エキスをを用いて行った。

2) スクリーニング方法

(国内産植物エキスに対する活性評価)

- ・ α -グルコシダーゼ(スクラーゼとマルターゼ)の阻害活性

酵素として市販のラット小腸 α -グルコシダーゼを、基質としてスクロースまたはマルトースを用い、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。基質にスクロースを使用した場合はスクラーゼ活性、マルトースを使用した場合はマルターゼ活性である。

・ α -アミラーゼ阻害活性

酵素として市販のブタ膵臓 α -アミラーゼを、基質に青色色素結合デンプン溶液を用い、遊離色素の減少割合によって阻害活性を算出した。

・リパーゼ阻害活性

酵素として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酸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量によって阻害活性を算出した。

・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割合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。

・抗発癌プロモーター活性

試験物質が、発癌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 2 Aの活性阻害の程度を測定し、抗発癌プロモーター活性として評価した。

・チロシナーゼ阻害活性

酵素源として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-ドーパを用いて生成する褐色成分の生成量を測定し、阻害活性を算出した。

・ダイオキシン毒性阻害活性

ラット肝細胞画分に0.1 nM 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。

(外国産生薬に対する活性評価)

・脂肪細胞分化抑制物質探索アッセイ

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。脂肪滴の形態的变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。

・インスリン抵抗性抑制活性

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。

・アンジオテンシン変換酵素阻害活性

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

・コレステロール吸収抑制物質探索

ヒト腸管上皮細胞であるCaco-2細胞(オル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。

・ α -グリコシダーゼ阻害活性

1) 細胞を用いた方法：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細胞をトランスウェルの上で単層形成させ、分泌される α -グリコシダーゼ(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。

2) 細胞を用いない方法: 0.5mL 遠心チューブに, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 150 μ L, 4% マルトース 50 μ L, 試料 (20 μ L ; 最終濃度 50 μ g/mL), rat intestinal acetone powder (α -glucosidase) を加え, 37 $^{\circ}$ C, 20 分間インキュベートを行った。反応終了後, 100 $^{\circ}$ 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 5 μ L 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 $^{\circ}$ 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。

・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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

・抗感染症 (抗原虫) 活性

原虫種として, 皮膚型リーシュマニア症を引

き起こす *Leishmania major* の 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 6×10^5 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 $^{\circ}$ 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。

・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

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」の皮膚型リーシュマニア症への適用を考え, ペルー国協力研究者による Zuno Burstein 教授により現地の皮膚型患者に対し, 本軟膏剤の臨床試験を行った。その過程において, 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, 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に沿って行われている。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。

・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 種類の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

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。（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

1) 国内産植物資源のスクリーニング結果

国内産薬用植物資源のスクリーニングの結果，その活性が非常に高かった植物種と部位は以下に示した通りである。

アミラーゼ阻害活性

アメリカニガキ（葉）・シマヤマヒハツ（茎）・セイロンオリーブ（葉）・タマリンド（葉）・ベンガルボダイジュ（葉）・オオバマホガニー（葉・葉柄）・カンコノキ（葉）・キミノバンジロウ（葉）・ベールムノキ（葉）・モミジバフウ（葉）

スクラーゼ阻害活性

スズメナスビ（果実）・エゴノキ（葉）・トベ

ラ (葉)・サツマイモ (莖)・ハイドバ (葉・莖)・マルバアキグミ (果実)・ミツバアケビ (実)・カリン (葉・莖)・エゾミソハギ (葉)・ケカラスウリ (莖)

マルターゼ阻害活性

スズメナスビ (果実)・トベラ (葉)・サツマイモ (莖)・ヤエヤマアオキ (果実)・シマグワ (葉・枝)・モミジバフウ (葉)・ザクロ (果皮・種子)・コデマリ (花)・ミツバアケビ (実)・ツツジ (花)・ボタン (花)・エゾミソハギ (葉)
リパーゼ阻害活性

ヤマブドウ (蔓・根)・トチノキ (果肉)・オオイトドリ (種子)・エビガライチゴ (果実)・キタコブシ (枝)・クリ (葉・実)・(葉・樹皮)・ガマ (穂)・ウラジロタデ (根)・ハマナス (果実)・クサソテツ (地上部)・イチイ (枝)・オシダ (葉)

抗酸化活性 (DPPHラジカル捕捉活性)

エゾミソハギ (地上部・根)・ハマナス (枝)・カシワ (樹皮)・オオイトドリ (種子)・ニガキ (葉)・ドクゼリ (葉)・シャクヤク (葉)・ボタン (葉)・ザクロ (果皮)・アメリカニガキ (葉)・チョウジ (葉・莖)・アブラギリ (葉)・スダジイ (葉)・ヤマモモ (葉)・

抗発癌プロモーター活性

オオヨモギ (地下茎・地上部)・ノコギリソウ (全草)・オオウバユリ (葉)・キタコブシ (葉)・ホオズキ (果実)・エゾエンゴサク (地上部)・ハマナス (果実)・カンゾウ (葉)・セリバオウレン (葉)・コブシ (果実)

チロシナーゼ阻害活性

オオウバユリ (球根)・アカザ (葉)・オオイトドリ (種子)・ボケ (種子)・セイヨウバクチノキ (葉・莖)・カリン (種子)・カラミザクラ (種子)・イカリソウ (葉)・カラダイオウ (根部)・カンコノキ (葉)・シロナンテン (葉)・モミジバフウ (葉)・キミノバンジロウ (葉)・シマカナメモチ (莖)・

ダイオキシシン毒性阻害活性

ハマナス (枝)・ダイコンソウ (地上部)・イ

チイ (果実)・ハコベ (全草)・イタヤカエデ (種子)・ケカラスウリ (果皮・果実・葉)・カラコギカエデ (種子)・アカメガシワ (葉)

1-1) コデマリの α -グルコシダーゼ阻害活性物質の探索

コデマリの花では、マルターゼ阻害活性が91%と高い活性を示したので、コデマリの花から活性成分を単離・同定することとした。

薬用植物資源研究センター筑波研究部で栽培されたコデマリの花を55~60°Cで乾燥し、100gの乾燥花を調製した。これを50%メタノール水溶液で抽出後濃縮した。この粗抽出物を水-酢酸エチルで分配クロマトグラフィーを行い、水層と酢酸エチル層に分けた。活性の高かった酢酸エチル層を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール系を使用)によりクロロホルム-メタノール(6:1(v/v))の移動層で最も高い活性画分を得た。

この画分を更に分取 HPLC(Inertsil PREP-ODS, 20x 250 mm, 移動層アセトニトリル-水系を使用)を2回繰り返して、マルターゼ阻害活性を持つ3成分(1:33 mg, 2:26 mg, 3:29 mg)を単離することができた。これらの成分は、NMRとMSによる解析により化学構造を決定した。

Quercetin 3-O-(6-O-caffeoyl)- β -galactoside (1)

Kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- β -galactoside (2)

Kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- β -glucoside (3)

これら3成分のマルターゼ阻害活性のIC₅₀値は、それぞれ0.085 mM, 0.35 mM, 0.47 mMで化合物1が最も高い阻害活性を示した。

1-2) スズメノナスビの α -グルコシダーゼ阻害活性物質の探索

スズメノナスビの果実が α -グルコシダーゼ阻害活性(スクラーゼ阻害活性とマルターゼ阻害活性)を示したので、果実から活性成分を単離・同定することとした。

薬用植物資源研究センター種子島研究部で栽培されたスズメノナスビの果実を55~60°Cで乾燥し、50gの乾燥果実を調整した。これを

50%メタノール水溶液で抽出後濃縮した。この粗抽出物をダイアイオンHP20に供し、非吸着成分を除去後、メタノールにて吸着成分を溶出し濃縮した。濃縮物を水-酢酸エチルで分配クロマトグラフィーを行い、水層と酢酸エチル層に分け、酢酸エチル層を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール系を使用)に供した。スクラーゼ阻害活性は、クロロホルム-メタノール(4:1zv/v)の移動層で最も活性の高い画分を得た。この画分を更に分取HPLC(Inertsil PREP-ODS, 20x 250 mm, 移動層アセトニトリル-水系を使用)により活性成分を単離した。化合物**2**~**7**と**10**~**14**は、既報に従い合成・精製した。一方、化合物**8**と**9**は市販品を使用した。

スズメノナスの果実 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 (**1**) 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 IC_{50} は 1.5 mM, マルターゼに対する IC_{50} 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 (**14**) が、化合物**1** より強い阻害活性を示し、その IC_{50} は 1.0 mM であった。一方、マルターゼ阻害活性では、*n*-butyl caffeate (**4**) が、化合物**1** より強い阻害活性を示し、その IC_{50} 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) 外国産生薬のスクリーニング結果

2-1) アンジオテンシン転換酵素阻害活性

19年度に行ったスクリーニングの結果で強力なACE阻害活性を示したミャンマー産生薬 *Diospyros burmanica* について成分の検索を行った結果、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-(\rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranoside] を得た。

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 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、*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行い、その結果、*Polygonum aviculare* は 300 μ g/ml の濃度で 58% の阻害活性を示した。

2-2) 赤血球法による抗酸化活性

抗酸化活性(赤血球法)のスクリーニングを DPPH 法と並行に行い、その結果は後ろの表に示す通りである。

これらの結果より、抗酸化活性の評価に広く用いられている 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 Jamillo de Durazno 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。そこで活性成分の分離精製を行った。単離された化合物はいずれもフラボノイドであり、化合物**3**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、本植物エキス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いうことが明らかになった。他の化合物はいずれもフラボノイド配糖体の誘導体であり、最終的に各種スペクトルデータにより化学構造を決定し、Quercetin-3-O-[3,4,5-Trihydroxybenzoyl-(\rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside], Quercetin-3-O-[3,4,5-Trihydroxybenzoyl-(\rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside] と決定した。ポリビア生薬

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。21年度に本植物成分のさらに検索を行い、新たに 3-O-galloylquinic acid とその methylester が得られた。それらの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) にも活性が認められた。

2-3) 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、分化誘導後の油滴量、アディポサイトカインとしては善玉であるアディポネクチン産生量での19年度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)、それとヒメキランソウ *Ajuga pygmaea* (種子島) の単離化合物について検討した。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量を明確に亢進することがわかった。本生薬は他の植物エキスと比較し、明確に差が表れることから、本植物エキスをを用いた後述のDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。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。

2-4) 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の持たれるところである。セスキテルペンのpterodin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。PPAR γ アゴニストには糖尿病治療薬として実用化されているチアゾリジン系化合物などがあり、アゴニストには医薬資源として大きな有用性があり、これらの結果をさらに発展させていく予定である。

2-5) 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。

2-6) 糖吸収抑制活性

チョウジ (*Syzygium aromaticum*)、シクンシ科の植物に活性が認められた。シクンシ科の植物に

においては1/1000濃度において約30%の抑制活性を示した。ペルー産cuti-cutu (*Cheilanthes* sp.)の×1/100濃度に対しては有意な阻害が見られた。

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。

2-7) コレステロール吸収抑制活性

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19年度に検討した結果、ネジトウガラシ(*Helicteres isora*), ノウゼンカズラ科の植物, ヒメウイキョウ(*Carum carvi*), ホウライアオキ(*Rauvolfia vomitoria*), ヤドリギ(*Viscum album*)に活性が認められた。また種子島産ヒメキランソウ*Ajuga pygmaea*についても有意な吸収抑制活性が認められたため、本植物を成分解析の対象植物とした。

種子島研究部において栽培を行っていたヒメキランソウを収穫乾燥後にメタノール抽出を行い、各種クロマトグラフィーにて成分の単離を試みた結果、8-acetylharpagideなどのイリドイド配糖体2種類を得たが、それらについての単独の活性評価においては有意な活性は見られなかった。そのためその他の成分が活性に関与していると考えられたが、最終的に現在までのところ活性化合物の特定には至っていない。

3) 抗感染症 (抗原虫) 活性

19年度94種類, 20年度40種類, 21年度71種類, 合計3か年で205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。

19年度の結果では、パキスタン生薬であるAnjbar (学名*Curcuma amada* Roxb. (Zingiberaceae)), ミャンマー生薬の*Sephaeranthus indicus*

(Compositae), *Carrisa spinarum* (Oleanaceae), 20年度の結果では、パキスタン生薬である*Carissa spinarum* (Rubiaceae), *Alstonia scholaris* (Apocynaceae), *Morinda tomentosa* (Rubiaceae), 21年度の結果では, *Elatostemma novae-britanniae*(Urticaceae), *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson(Compositae), ペルー (イキトス)産の*Annona muricata* (Annonaceae)に強い抗リーシュマニア原虫活性が見られた。特に*Elatostemma novae-britanniae*(Urticaceae), *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson(Compositae)は、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。本研究事業において抗リーシュマニア活性化化合物の探索として成分の検索を行った植物種は、ペルー国協力研究者より提供されたペルー生薬Barbasco (*Lonchocarpus nicou*)葉および枝, Matico (*Piper angustifolium*), ミャンマー産カキノキ科 (Ebenaceae) 植物, クマツヅラ科 (Verbenaceae) 植物, マメ科 (Legminosae) 植物, パキスタン産ナス科 *Withania coagulans*, キク科 *Artemisia scoparia*, キク科 *Cousinia stoksi*, ネパール産薬用植物 *Ocimum sanctum*の9種類である。Barbascoの成分に関しては、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化合物のスポット検出を行うを試み、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、本植物からは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。19年度にはペルー産生薬 Matico (*Piper angustifolium*)からは20種類の化合物を分離

した。構造解析の結果、10種類の化合物が新規化合物と推定された。新規化合物は、*p*-hydroxy- benzoic acid にプレニールが結合した誘導体であった。ミャンマー産カキノキ科植物からは6種類の活性化合物を得た。20年度にはパキスタン産ナス科植物 *Withania coagulans*, から20種あまりの化合物を分離したが、そのうち12の化合物について構造解析を行うことが出来た。その大部分が新規化合物であり、学問的にも価値のある成果と考えられる。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ことは大きな成果と考えられる。パキスタン産キク科植物 *Artemisia scopalia* 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。ネパール産薬用植物である Tulsi (*Ocimum sanctum*) から、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。20年度に報告した *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 α 配置であるが、今回得られた化合物では14位が β 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名の患者に治癒効果が認められた。

D. 考察

19年度にスクリーニングした外国産生薬の活性評価においては、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。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。

20年度から赤血球法による抗酸化活性評価を取り入れたが、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Jamillo de Durazno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。catechin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。しかしながらその他の単離化合物の活性にも興味を持たれ

るところである。これらのフラボノイド配糖体没食子酸エステル類は、後述のACE阻害活性物質に構造が類似していたため、ACE阻害活性も評価を行っている。また本植物は当初学名に *Viscum album* をあてていたが、その形態などから21年度に *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ひとつの例である。

ミャンマー産 *Diospyros burmanial* 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。

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。

脂肪細胞において明確に善玉アディポサイトカインであるadiponectinの分泌を増強したミャンマー産フウチョウソウ科植物についてはDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った結果、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。

コデマリ（花）に含まれる活性成分の単離・同定を実施し、マルターゼ阻害活性を持つ3成分を単離したが、3種類のフラボノールの中で分子内にカフェイル基（糖に結合したコーヒー酸とB/C環）が2個存在する化合物が最も強い活性を示した。これまでに caffeoylquinic acid 類においてコーヒー酸残基の数が1から3個のもの α -グルコシダーゼ阻害活性はコーヒー酸

残基の数が多いほど活性が強いことが知られており、この構造活性相関と同じ傾向を示した。

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のうち、3種類 (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, *Naucleopsis amara* Ducke, *Astronium fraxinifolium* Schott) に強い α -グルコシダーゼ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 *Maytenus 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 α 配置であるが、今回得られた化合物では14位が β 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、予想外の良好な治療効果が認められた。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療効果を発揮したのと考えられた。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

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合物の探索を行った。その結果、コデマリ花、スズメノナスの α -glucosidase 阻害活性成分、ミャンマー産生薬 *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*, Matico (*Piper angustifolium*)、ミャンマー産カキノキ科 (Ebenaceae) 植物、クマツヅラ科 (Verbenaceae) 植物、マメ科 (Legminosae) 植物、パキスタン産ナス科 *Withania coagulans*, キク科 *Artemisia scoparia*, キク科 *Cousinia stoksi*, ネパール産薬用植物 *Ocimum sanctum* からは多種多様な多くの新規化合物を含む活性化合物を単離した。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)

1. Yosida, K., A. Hishida, O. Iida, K. Hosokawa, J. Kawabata Flavonol caffeoylglycosides as α -glucosidase inhibitors from *Spiraea cantoniensis* flower. *Journal of Agricultural FOOD Chemistry*, 56(12), 4367-4371 (2008).
2. 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).
3. Fuchino, H., Sekita, S., Mori, K., Kawahara, N., Satake, M., and Kiuchi, K. A New Leishmanicidal Saponin from *Brunfelsia grandiflora*. *Chem Pharm Bull* 56 (1) 93-96 (2008).
4. 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)
5. Takahashi, K., Y. Yoshioka, E. Kato, S. Katsuki, O. Iida, K. Hosokawa and J. Kawabata, α -Glucosidase inhibitor from *Solanum torvum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74,741-745(2010) (学会発表)
1. 鈴木亜希子, 黒柳正典, 瀧野裕之, 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, 臼井陽平, 関田節子, 瀧野裕之, 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
3. 森加奈未, 橋本幸大, 瀧野裕之, 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
4. 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.
5. 橋本幸大, 安元(森)加奈未, 瀧野裕之, 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 16) . 日本生薬学会第 55 年会, 平成 20 年 9 月 19-20 日, 長崎(2008)
6. 黒柳正典, 村田美紀, 代田修, 安元加奈未, 関田節子, 瀧野裕之, 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)
7. 瀧野裕之, 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)

8. 安元(森) 加奈未, 浏野裕之, 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)

9. 浏野 裕之, 河野 真理衣, 木内 文之¹, 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)

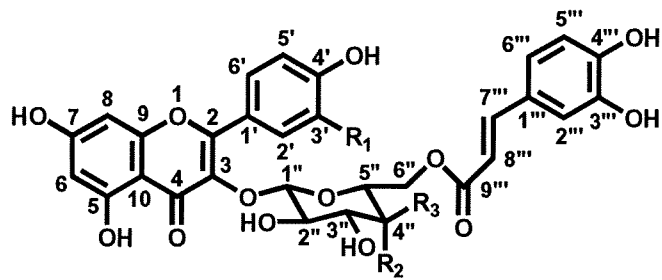
10. 浏野 裕之, 川原 信夫, 安元 加奈未, 関田 節子, 佐竹 元吉: 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索 (その 19) —ペルー産生薬 Barbasco 枝の成分について—日本薬学会第 130 年会, 3 月 29 日, 岡山 (2010)

11. 安元(森) 加奈未, 浏野 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—日本薬学会第 130 年会, 3 月 29 日, 岡山 (2010)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし (ただし一部検討中)
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

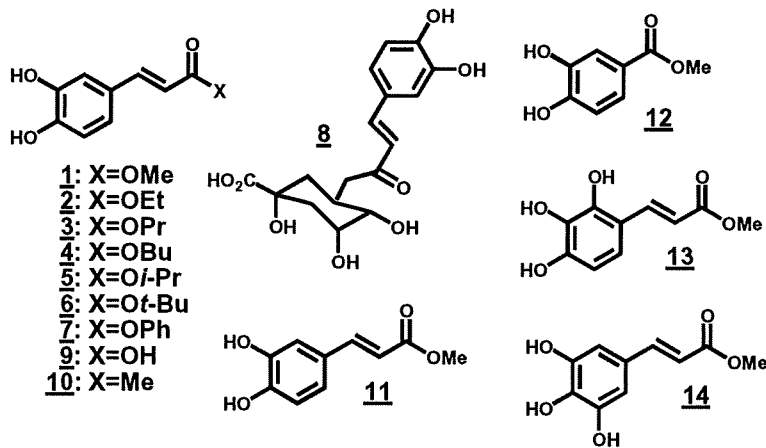
1-1)



- 1: $R_1=R_2=OH, R_3=H$
 2: $R_1=H, R_2=OH, R_3=H$
 3: $R_1=R_2=H, R_3=OH$

コデマリより得られた α -glycosidase 阻害活性化合物

1-2)



スズメノサスビから得られた α -glycosidase 阻害活性化合物

2-1)

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

Diospyros burminia の ACE 阻害活性結果 (***: $p < 0.001$)