



廣藿香性状

〔附注〕 同科植物**藿香** *Agastache rugosa*

功效与广藿香同，部分省区作藿香用。其地下根水煎服，治霍乱吐泻。

藿香はパチヨリと

言います？

❖ 2、(広)陳皮 (こう)ちんぴ

[基源] ミカン科の植物橘/ミカン *Citrus reticulata* Blanco 栽培変種の成熟果皮。

- ❖ 茶枝柑、大红袍（四川）、温州蜜柑、福橘
- ❖ 広陳皮は茶枝柑から作った陳皮です。

陳皮 薬材





廣陳皮の植物（茶枝柑）と薬材



茶枝柑

❖ 《药性赋》云：

“枳壳陈皮半夏齐，
麻黄狼毒及吴萸，
六般之药宜陈久，
入药方知奏效奇。”

❖ “六陈” 中藥：枳殼、陳皮、半夏、
麻黃、吳茱萸、狼毒。

❖ 3、広仏手

こうぶっしゅ

❖ ぶっしゅかん仏手柑

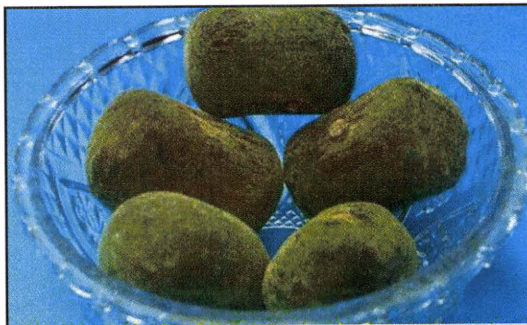


❖ 4、化橘紅 かきっこう

❖ ミカン科化州柚 *Citrus grandis* 'Tomentosa'

柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck の未成熟
又は近成熟の外層果皮。

柚は文旦ブントンか
ザボンか？



毛橘紅

光七爪
光五爪



日中薬局方四つの生薬薄層クロマトグラフィー確認試験の比較

The comparison of TLC methods between Japanese Pharmacopoeia and Pharmacopoeia of China

李書淵 広州大学城広東薬学院, 510006 教授

Abstract: Objective Through the comparison of TLC method between Japanese Pharmacopoeia and Chinese Pharmacopoeia to change the developers of TLC contained benzene or toluene in Chinese Pharmacopoeia. **Methods** To use developer in Japanese Pharmacopoeia or to build up the new developers to instead of the developers contained benzene and toluene. **Results** To change the developers of TLC of four Chinese medicines. **Conclusion** To modify parts of TLC developers in Chinese Pharmacopoeia so that to improve the operational safety of the laboratory.

研究協力者 陳彬 広州大学城広東薬学院 助手

研究協力者 陳藹 広州大学城広東薬学院 助手

A. 研究目的

中国薬典 (2005 版 一部) に収載されている生薬のうち92種類の生薬の薄層クロマトグラフィーの展開溶媒はベンゼンとトルエンを使用している^[1]。ベンゼンとトルエンは毒性がある^[2]^[3]^[4]^[5]。日本薬局方ではクリーンアナリシスによりベンゼンとトルエンを使っていない。本研究では、黄連、厚朴、蛇床子、山茱萸について薄層クロマトグラフィーの展開溶媒のベンゼンとトルエンに代わる溶媒で実験をした。

B. 研究方法

1 材料

実験用生薬は広州中薬材市場で購入し、広東薬学院李書淵が同定した。中国薬品生物製品研究所から生薬：黄連、厚朴、蛇床子、山茱萸標準及びベルベリン塩化物標準品、Magnolol 標準品、honokiol 標準品、osthole 標準品、Ursolic acid 標準品を提供してもらった。

C. 研究結果

1. 黄連 オウレン

中国薬典の黄連の展開溶媒はベン

ゼン/酢酸エチル/イソプロパノール/メタノール-水混液 (6:3:1.5:1.5:0.3) である。日本薬局方の展開溶媒は1-ブタノール/水/酢酸 (100) 混液 (7:2:1) である^[6]。そこで、日本薬局方黄連のクロマトグラフィーの展開溶媒による実験を行った。

試料溶液の整備：試料溶液 a (中国薬典による)：本品の粉末 50mg にメタノール 5 ml を加え、15 分加熱回流して、ろ過し、ろ液にメタノールを加え 5 ml とし、試料溶液 a とする；試料溶液 b (日本薬局方による)：本品の粉末 0.5 g にメタノール 20 ml を加え、2 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液 b とする。

標準溶液の整備：ベルベリン塩化物標準品 0.5 mg をメタノール 1 ml に溶かし、標準溶液とする。

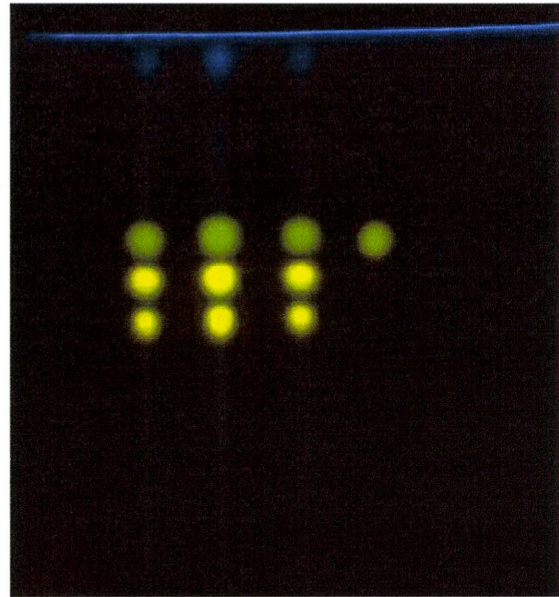
薄層板：薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板；厚度：500 μ m。

スポット量：試料溶液及び標準溶液 1 μ l。

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸 (100) 混液 (7:2:1)。

検出方法：紫外線 (主波長 365 nm) を照射。

結論：ベンゼンを使わない日本薬局方の方法が良好であった。なお、今年 10 月 1 日施行の中国薬典 [2010 版 一部] はベンゼンを用いない条件に変更した。しかし、新しい展開溶媒は複雑で：シクロヘキサン/酢酸エチル/イソプロパノール/メタノール/水/トリエチルアミン混液 (3:3.5:1:1.5:0.5:1)，そして、展開前に薄層板をアンモニア試液のなかに 20 分飽和することとされている。(図 1)



1 2 3 4

図 1

1. 試料溶液 a 2. 試料溶液 b 3. 黄連標準生薬溶液 4. ベルベリン塩化物標準溶液

2. 厚朴コウボク

中国薬典収載の展開溶媒はベンゼン/メタノール混液 (27:1) で、マグノロール (Magnolol) と honokior を確認し、日本薬局方厚朴の薄層クロマトグラフィーの展開溶媒は 1-ブタノール/水/酢酸 (100) 混液 (4:2:1) で、マグノロール (Magnolol) と honokior を用いずに Rf 値と発色により確認している。本実験は《中药薄层色谱彩色图集》^[4]を参考とし、薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて 1%水酸化ナトリウム溶液で調製した薄層板を使い、展開前に高湿度の環境に 15 分置いてからシクロヘキサン/酢酸エチル混液 (2:1) で展開した。

試料溶液の整備：試料溶液 a (中国薬典による)：本品の粉末 0.5g にメタノール 5 ml を加え、密塞、30 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液 a と

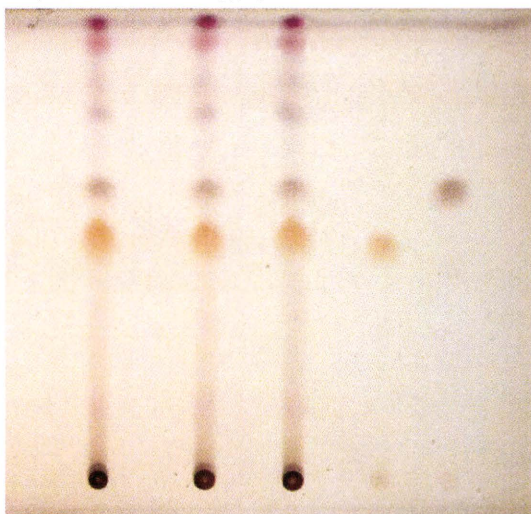
する；試料溶液 b（日本薬局方による）：本品の粉末 1.0g にメタノール 10 ml を加え，10 分間振り混ぜた後，ろ過し，ろ液を試料溶液 b とする。

標準溶液の整備：マグノロール (Magnolol) と honokior 標準品 1 mg ずつをメタノール 1 ml に溶かし，混和溶液を標準溶液とする。

薄層板：薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて 1% 水酸化ナトリウム溶液調製した薄層板；厚度：500 μ m。
スポット量：試料溶液及び標準溶液 1 μ l ずつ。

展開溶媒：シクロヘキサン/酢酸エチル混液 (2:1)。

検出：1% バニリン・硫酸試液を均等に噴霧し，100 ° C でスポットが明確に見えるまで加熱する。



1 2 3 4 5

図 2

1. 試料溶液 a 2. 試料溶液 b 3. 厚朴標準生薬溶液 4. マグノロール (Magnolol) と honokior 混和標準溶液

結果：本実験は中国薬典収載の展開溶媒より分離度が良く，ベンゼンに代わる溶媒であり，よりよい結果を与えた。(図 2)

3. 蛇床子 ジャシヨウシ

中国薬典収載の展開溶媒はトルエン/酢酸エチル/ヘキサン混液 (3:3:2) で，日本薬局方収載の展開溶媒はヘキサン/酢酸エチル混液 (2:1) である。しかし，Osthole の Rf 値は 0.5 以上である。本実験はヘキサン/酢酸エチル/シクロヘキサン混液 (6:3:1) を採用した^[8]。

試料溶液の整備：試料溶液 a（中国薬典による）：本品の粉末 0.3g にエタノール 5 ml を加え，5 分間超音波抽出した，溶液を試料溶液 a とする；試料溶液 b（日本薬局方による）：本品の粉末 1.0g に酢酸エチル 10 ml を加え，10 分間振り混ぜた後，ろ過し，ろ液を試料溶液 b とする。

標準溶液の整備：オストール標準品 1 mg をメタノール 1ml に溶かし，標準溶液とする。

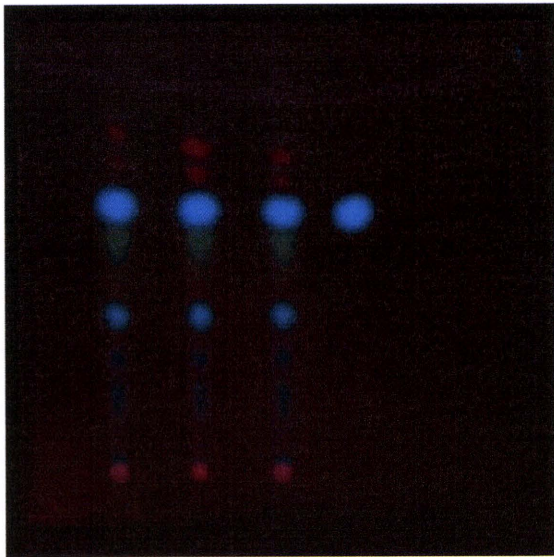
薄層板：薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて CMC-Na 溶液で調製した薄層板；厚度：500 μ m。

スポット量：試料溶液及び標準溶液 1 μ l。

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/シクロヘキサン混液 (6:3:1)。

検出方法：紫外線（主波長 365 nm）を照射。

結果：中国薬典収載のトルエンを用いずに，ヘキサン/酢酸エチル/シクロヘキサン混液 (6:3:1) を採用したところオストール Osthole の Rf 値は約 0.5 と良好な効果を示した。中国薬典 [2010 版 一部] でも蛇床子の展開溶媒はトルエン使用の条件をそのまま継続している。(図 3)



1 2 3 4

図 3

1. 試料溶液 a 2. 試料溶液 b 3. 蛇床子標準生薬溶液 4. オストール標準溶液

4. 山茱萸 サンシュユ

中国薬の山茱萸の展開溶媒はトルエン/酢酸エチル/ギ酸混液 (20:4:0.5) で、日本薬局方の展開溶媒は酢酸エチル/水/ギ酸混液 (6:1:1) である。たがいに確認成分は異なっている。中国薬典はUrsolic acidで、日本薬局方はloganinである。本実験では、シクロヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液 (9:2:0.3) を採用したところ、良好な結果を得た。

試料溶液の整備：試料溶液 a (中国薬典による)：本品の粉末 0.5g に酢酸エチル 10 ml を加え、15 分間超音波で抽出した後、ろ過し、ろ液を乾燥し、エタノール 2 ml に溶かした溶液を試料溶液 a とする；試料溶液 b (日本薬局方による)：本品の粗切 1g にメタノール 10 ml を加え、5 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液 b とする。

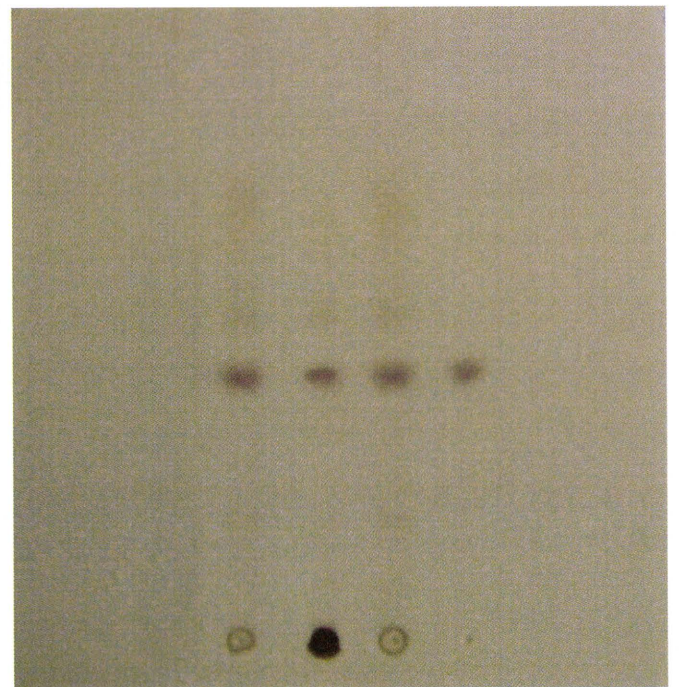
標準溶液の整備：Ursolic acid 標準品 1 mg を無水エタノール 1 ml に溶かし、標準溶液とする。

薄層板：薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板；厚度：500 μ m.

スポット量：試料溶液 5 μ l、標準溶液 2 μ l.

展開溶媒：シクロヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液 (9:2:0.3) .

検出方法：10%硫酸試液を均等に噴霧し、105° C で5 分間加熱.



1 2 3 4

図 4

1. 試料溶液 a 2. 試料溶液 b 3. 山茱萸標準生薬溶液 4. Ursolic acid標準溶液

結果：中国薬典の展開溶媒のトルエンを除く新しい展開溶媒で良い効果が得られた。中国薬典 [2010版 一部] では山茱萸の展開溶媒は従来のみである。

(図 4)

D. 考察及び結論

1. 四種類の生薬のうち黄連は、日本薬局方の展開溶媒を採用したところ、展

開時間が少し長くなるもののベンゼンを使用する中国薬典の展開溶媒より良好な効果を得た。ほかの三つの生薬厚朴、蛇床子、山茱萸は中国薬典のベンゼンかトルエンを含む展開溶媒に代わる新しい条件を試みたところ良い結果を得た。日本薬局方でも参考とされた。

2. 中国薬典と日本薬局方では確認方法が異なっている。大きな差異はないものの日本薬局方のほうが簡便で結果も良好であった。

3. 日中両国の交流が大切で、生薬の試験法の調和の必要がある。

参考文献 (中文)

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 : 2005 版一部[S]. 北京 : 化学工业出版社, 2005

[2] 万世波. 苯(C₆H₆)一种有芳香味的“毒液”[J]. 职业生与应急救援, 2008,26(3):129-130

[3] 徐海燕. 苯毒性作用机制研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 1998,25(3) : 129-132

[4] 任振华, 李光武. 甲苯神经毒性对小鼠神经行为功能的影响[J]. 环境与职业医学, 2006,23(3):264-266

[5] 徐雷, 甘德秀, 王充等. 甲苯对作业工人体液免疫功能影响[J]. 中国公共卫生, 2008, 24 (1) : 94-95

[6] 日本药局方編集委員会. 第十五改正《日本药局方》[S]. 东京 : 广川书局, 2006

[7] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 药材 [M] 中华人民共和国药典中药薄层色谱彩色图集, 广州 : 广东科技出版社, 1993 : 59

[8] 郭清峰, 王晓琦, 毛巍巍等. 对《中国药典》一部薄层色谱法中含苯展开剂的改进[J]. 中国药事, 2003, 17 (5) : 309-310

II. 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）

「漢方処方配合生薬の安定供給及び持続的品質保持における国際標準化に関する研究」

分担研究報告書

Curcuma 属植物及び *Akebia* 属植物の含有成分に関する研究

研究分担者 関田 節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

研究要旨；ショウガ科 *Curcuma* 属植物の根茎は、医薬品原料、食品原料として世界中で広く用いられている。これらの植物は、東南アジアを中心とした地域で栽培されており、野生植物としても広く分布している。*Curcuma* 属植物の未利用資源の開発の一環としてミャンマーで自生している *Curcuma* 属植物の成分の調査研究を行い、その種の検討を行った。

また、中国の生薬市場で入手可能な生薬のうち、基原植物は共通でも部位の違いによってわが国では従来用いられていない生薬素材について成分の調査研究を行い、その有用性の検討を行う。その一環として、アケビ (*Akebia quinata*) の果実から調整された八月札の成分についても検討を行った。

研究協力者氏名・所属及び職名：黒柳 正典・徳島文理大学香川薬学部 研究員

研究協力者氏名・所属及び職名：代田 修 ・徳島文理大学香川薬学部 准教授

A. 研究目的

1. ショウガ科 *Curcuma* 属植物は香辛料、生薬原料、健康食品素材等として広く用いられている。特に、同属のウコン (*C. longa*) には、3 種の黄色色素クルクミノイド (curcumin (1), demethoxycurcumin (2), bisdemethoxycurcumin(3)) が主成分として含有されている。しかも、クルクミノイ

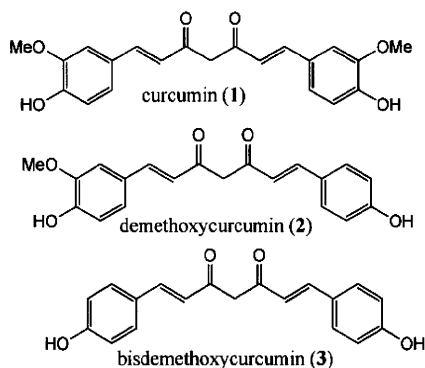


図1 ウコンのクルクミノイド

ドはメタボリックシンドロムに対して有効な植物成分の一つとしてよく知られており、クルクミノイドを配合した特定保健用食品なども広く市販されている。アジア諸国には未利用の *Curcuma* 属素材が眠っている可能性が期待される。そこで、今回ミャンマーで自生する *Curcuma* 属と考えられる二種類の植物を採集したので、その成分比較を行い、その種の特定を試みた。そこで、その成分について検討を行う。

2. 中国では疾病治療に用いられており、中国の生薬市場で入手可能であるが、わが国においては通常用いられておらず、わが国の市場では入手も困難な生薬材料の有用性を検討するため、中国市場で入手した生薬のうち今回は、アケビ (*Akebia quinata*) の果実から調整された八月札の成分について検討を行うこととした。

B. 研究方法・結果

1. ミャンマーの野生 *Curcuma* 属植物の成分研究

ミャンマーにおいてショウガ科 *Curcuma* 属植物と考えられる2種類の植物AとBを採取した。Aは白い花を咲かせ、葉は緑色であるのに対して、Bは花の色が赤く、葉の中心に赤褐色の筋が見られる。外見上の観察からは、Aはウコン *C. longa*、Bはガジュツ *C. zedoaria* ではないかと推測された。その根茎部は十分に成長していないため、量的に十分ではなかったが実験を行った。両植物の根茎部、乾燥重量約 1 g をすり潰してメタノール 5 mL を加えて 10 分間加温、冷後濾過し、濃縮し TLC の試験液とした。TLC の結果、予想に反して、両者はほとんど同じ TLC パターンを示した。しかも、クルクミノイドの存在が認められるが、従来観察されているウコンのクルクミノイドの含有状況とは大きく異なっていることが明らかとなった。即ち、ウコンにおいては、**1** が主成分であり、**2, 3** も同様に主成分として存在しているのに対して、A, Bでは **2** の存在は認められるが、**1, 3** は痕跡程度にしか確認できない。しかも、**2** の存在量もウコンに比べればはるかに低いことが明らかであった。

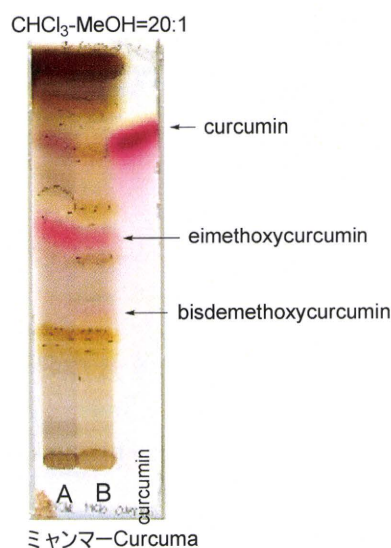


図2 ミャンマー *Curcuma* 属植物A, B の TLC 比較

そこで、クルクミノイド以外の成分の検討を行った。

AとBの TLC 観察の結果、両者にほとんど差が見られなかったので、比較的量の多い材料Aを用いることとした。Aの乾燥粉末 10 g をメタノールで熱時抽出して 3 g のエキスを得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、得られたフラクションをさらに分取 TLC (PLC) で分離を行い、8種類 (**4-11**) の化合物を得た。これら化合物をHR-ESI-MS スペクトルおよび 2 次元 NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC, ROESY) を含む NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR) の測定を行い、データを詳細に解析した結果、**4-11** の構造を図2に示すように決定した。

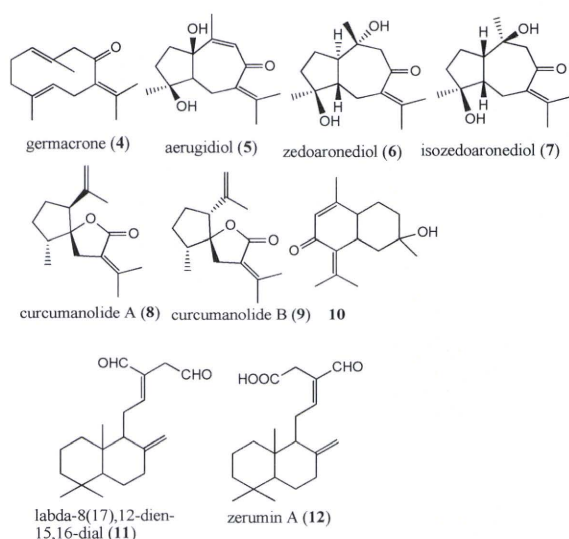


図3 ミャンマー *Curcuma* 属植物から得られた化合物

このうち、セスキテルペン 4–8 及びジテルペン 10 はウコンからの分離報告があることから、本材料植物はウコンに分類され、クルクミノイドの成分において栽培品とは異なる野生品種である可能性と、用いた材料の根茎が未熟であるため、クルクミノイドの含有量とその成分パターンが栽培品種とは異なっていた可能性も考えられる。このことを確かめるためには、十分に成長した多くの材料を用いてさらなる研究を行う必要がある。

なお、ジテルペン 11 は同じショウガ科の *Alpinia zerumbet* から分離報告されている。また、カジナン型セスキテルペン 9 の構造は推測段階であるが、文献検索の結果、新規化合物の可能性が示された。

2. 中国の生薬八月札の成分研究

八月札はアケビ *A. quinata* の果実から調整した生薬であることから、実験に入る前に、アケビの蔓性の茎から調整され、わが国において漢方処方生薬として広く用いられている生薬木通との成分比較を行った結果、木通と同様にサポニンを主成分としているが、お互いに異なるサポニンを含有していることが明らかになったので八月札の成分分離研究を行った。

八月札 (800 g) を粉末としてメタノールで還流抽出をし、200 g のメタノールエキスを得た。そのうち 100 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。溶媒として $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O} = 60:10:1$ から始め、 CHCl_3 の比率を小さくすることにより、溶媒の極性を上げながらクロマトグラフィーを行い、フラクション 1–11 を得た。そのフラクションの TLC の結果を図 3 に示す。

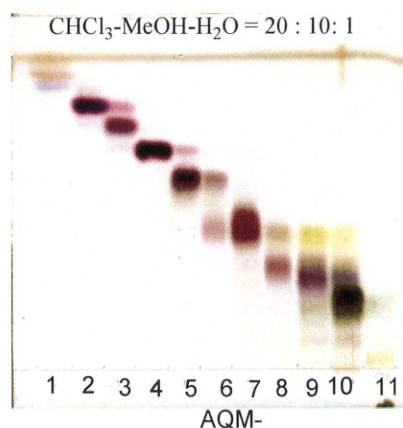


図4 八月札メタノールエキスのカラムフラクションの TLC

ここに示したように本クロマトグラフィーによる分離が非常に良好に行われ、希塩酸噴霧加熱による発色の様子から、多くのサポニンの存在が予想された。それぞれのフラクションについて、さらに HPLC 分析

を行い、その結果を参考に分取 HPLC を行った。HPLC には逆相系 ODS カラムを用いた。溶媒系としては $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (0.1 % ギ酸) 系溶媒を用いた。分取後、ギ酸の除去には HP 20 カラムを用いて行った。その結果、13 種類の化合物 **AQ1** – **AQ13** を分離した。得られた各化合物は HR-ESI-MS および 2D-NMR を含む NMR の測定とこれらのデータの詳細な解析の結果、**AQ1** – **AQ8** の構造を図 4 のように決定した。このうち **AQ7** が新規化合物であることが明らかになった。**AQ7** の構造決定について以下に述べる。

AQ7 は HR-ESI-MS の結果、 m/z 111 に分子イオン $[\text{M}+\text{Na}]^+$ が認められることから、分子式は $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{O}_{13}$ であることが明らかとなった。 ^1H -NMR において、5 本のシングレットメチル基 [δ 0.91 (3H, s), 1.01 (3H, s), 1.04 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.21 (3H, s)] の存在が明らかになり、アグリコンのヘデラゲニンのメチル基の一つがさらに酸化された構造であることが明らかである。またアノメリックプロトンが 2 本認められること、ラムノースに基づくと考えられるダブルットメチル基 [δ 1.61 (13H, d, $J = 6.2$ Hz)] の存在、2 つのヒドロキシメチル基 [δ 3.71 (1H, d, $J = 10.4$ Hz), 4.13 (1H, d, $J = 10.4$), 3.56 (2H, s)] の存在、アグリコンの 3 位と考えられる 2 級水酸基 [δ 4.24 (1H, dd, $J = 11.9, 3.8$ Hz)] の存在、3 置換オレフィン [δ 7.48 (1H, t, $J = 3.4$ Hz)] の存在が明らかになった。 ^{13}C -NMR においては 14 本のシグナルが認められ、2 本のアノメリック炭素、1 本のカルボキシ炭素、タスウノカルビニル炭素の存在が明らかとなった。 ^{13}C -NMR の化学シフト値

から糖はアラビノースとラムノースで構成されていることが推察された。2次元 NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC, ROESY) の詳細な検討を行った。30 位メチル基 [δ 1.19 (3H, s)] と 18 位 H [δ 3.38 (1H, dd, $J = 13.8, 4.1$ Hz)] との間に NOE が認められたことから 29 位がヒドロキシルメチル基になっていることが明らかとなった。また、アグリコンの 3 位にアラビノースが結合し、アラビノースの 2 位にラムノースが結合していることが明らかになり、その他の構造についても HMBC (図 4) の解析により決定することが出来た。

図 4 に **AQ7** の構造と NMR データのアサイン、主要な HMBC, NOE の相関を示す。

今回分離したサポニンのうち、**AQ1** が主成分で、**AQ2** を含む混合物として得られるが、メタノールから再結晶することにより g 単位で **AQ1** を得ることが出来た。今回分離したサポニン **AQ1** – **AQ8** の構造を図 5 に示す。

C. 考察

ミャンマー産の 2 種類の *Curcuma* 属植物はともに *C. longa* に分類され、花の色や葉の模様などの外部形態に変異が見られる同一種の植物と考えるのが良いのではないか。クルクミノイドが通常のウコンとやや異なっているのは採取サンプルの成熟度が低いと想定している。いずれにしても、時期の異なる、当該植物のより多くの材料を用いた検討が必要と考えられる。

中国産八月札の成分研究においては、丹念な各種クロマトグラフィーにより 13 種類のサポニンの分離を行うことができ、そ

のうち **AQ1** – **AQ8** の 8 種のサポニンの構造を決定することが出来た。 **AQ1** – **AQ6**, **AQ8** はヘデラゲニンをアグリコンとするトリテルペンサポニンで既知化合物であった。 **AQ7** は新規化合物であることが分かり、各種スペクトルデータ、特に、2 次元 NMR を含む NMR データの詳細な解析によりその構造を決定した。

D. 結論

ミャンマー産 *Curcuma* 属植物はクルクミノイドの含量が低いいため、その供給資源としては期待が持てないが、其の他の成分については、従来知られている *Curcuma* 属植物と比較して、含有成分に大きな差は無いと考えられる。

アケビの果実を起源とする中国産八月札から得られたサポニン成分は、アケビの蔓

性木部を起源とする生薬木通とはそのサポニン成分には違いが有り、また、サポニンの収量も比較的高く、特に **AQ1** の収量は高く精製が比較的良好であることから、**AQ1** を始めとする **AQ2** – **AQ8** になんらかの生物活性が見つかれば、有用サポニン資源材料として有用な素材となりえると考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

特になし

G. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

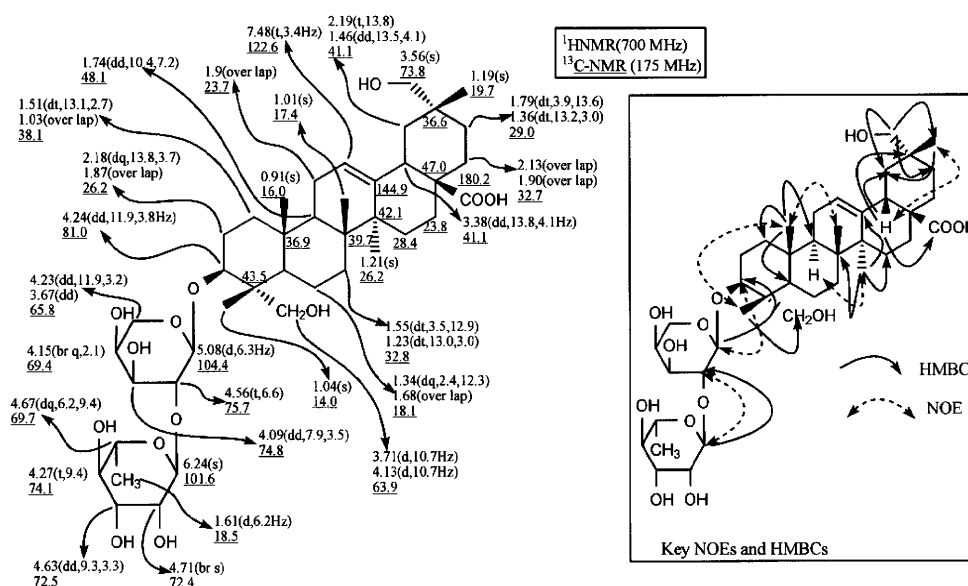


図4 AQ7 の NMR データのアサインと 2D-NMR 相関

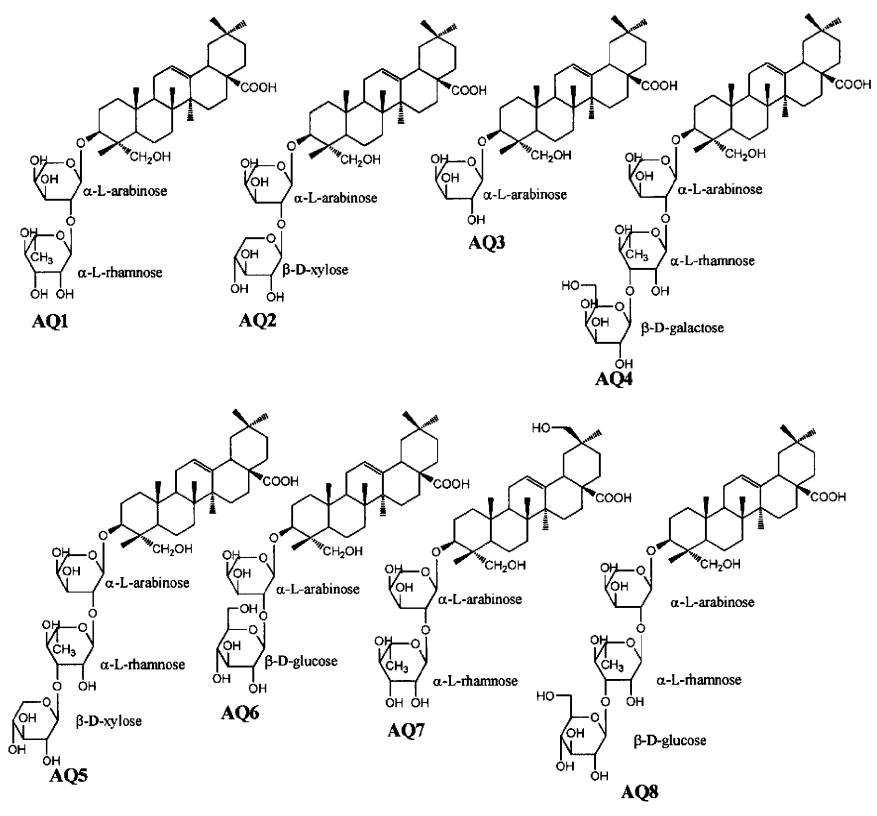


図5 *A. quinata* から得られたトリテルペンサポニン

熱帯薬用植物の有効成分に関する研究
-抗リーシュマニア活性物質の探索-

分担研究者 関田 節子 徳島文理大学 香川薬学部 教授

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、感染地の植物から新たな活性成分を得るため、2種の熱帯産植物について成分探索を行った。バイオアッセイガイドにより分画・精製を行ったところ、10種の化合物を得た。これらの構造を各種機器分析により決定し、抗リーシュマニア活性試験に付した。また、マクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞、骨肉腫（オステオサルコーマ）細胞 MG63 について、増殖抑制試験を行い、その選択性を検討した。

研究協力者 安元 加奈未 徳島文理大学 香川薬学部香川薬学部 助教

A. 研究目的

熱帯感染症リーシュマニア症は、原虫性の寄生虫疾患であり、世界 88 カ国でおよそ 1200 万人の感染者がいると言われている (1)。現在第一選択薬はアンチモン製剤が用いられているが、高価で毒性が強く、近年では薬剤耐性の報告例もある (2)。リーシュマニア症は、いわゆる特效薬が無く、感染者が治療を受けられない現状から neglected diseases（顧みられない病気）とも呼ばれ、WHO が定める最も治療が困難な 6 大熱帯感染症の一つである (1)。このような背景から、早急な治療薬の開発が必要とされている。

我々は、これまでミャンマー産植物ムラサキ科 *Cordia fragrantissima* よりベンゾキノン及びハイドロキノンである cordiaquinone (3)、カキノキ科青黒檀 *Diospyros burmanica* よりナフトキノンおよびビスナフトキノン、クマツヅラ科チーク葉 *Tectona grandis* から lapachol 類縁体を単離構造決定し、*in vitro* 抗リーシュマニア活性成分の探索について研究を行ってきた。

今回、予備実験においてエキスが抗リーシュマニア活性を示したミャンマー産の 2 種の植物、マメ科 *Dalbergia cultrata*（メタノールエキスの MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、ゴマノハグサ科胡黄連 *Picrorhiza kurrooa*（メタノールエキスの MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）について、抗リーシュマニア成分の単離を目的として分離を行ったので報告する。

また、得られた化合物について抗リーシュマニア活

性を検討すると共に、リーシュマニア原虫がほ乳類体内で増殖する際に宿主細胞となるマクロファージに対する影響を検討するため、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞を用いて XTT 試験（改良 MTT 試験）により増殖抑制を調べた。また、*D. cultrata* より得られた化合物については悪性ガン由来細胞である骨肉腫オステオサルコーマ細胞 MG63 についても同様に行い、その選択性を検討した。

B. 研究方法

使用機器:旋光度は JASCO 1010

polarimeterにて測定した。IR スペクトルは JASCO FT/IR-6300

spectrophotometer を用いた。UV スペクトルは JASCO International V-530 spectrophotometer を使用した。1D- および 2D-NMR スペクトルは, Bruker AVANCE 400 MHz, 700 MHz, Varian Unity INOVA 500 MHz spectrometer を用いた。ESITOFMS は, JASCO International Q-TOF Micro mass spectrometer を使用した。MPLC は, 逆相系システム (Ultrapak, Yamazen Co., Ltd.) を使用した。ODS-フラッシュカラムクロマトグラフィーは Cosmosil C₁₈ (Nakalai Tesque Co., Ltd.) を用いた。HPLC システムは, JASCO Co., Ltd., を使用した。TLC は, silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) 及び RP-18 F_{254s} (Merck) を用いて, UV 照射 (254 nm) で確認した後, *p*-methoxybenzaldehyde-H₂SO₄ 試薬を噴霧後加熱し発色させた。

植物体について:ミャンマー産植物 *D. cultrata* は Ministry of Forestry of Myanmar より供与され, 分類学者である Dr. Nyan Tun (Institute of Forestry, Forest Department, Ministry of Forestry, Union Myanmar) によって同定された。*P. kurrooa* はミャンマーヤンゴンの生薬マーケットにて入手され共同研究者によって供与された。

Leishmania 原虫の培養: 原虫は *Leishmania major* のプロマスチゴート体を使用し 25cm² tissue culture Flask 中 10%FCS 入り Medium199 培地を用いて 26.5 度 5% CO₂ に設定した CO₂ 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 1x10⁶ promastigotes/mL に希釈して用いた。

RAW264.7 細胞の培養:RAW264.7 細胞 (ATCC) は, 100 mm セルカルチャーディッシュ中にて調整 DMEM 培地 (10% 非働化

FCS, 抗生物質混合)を用いて 37 度 5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター内で培養を行い, 70%コンフルエント到達後 スクレイピングにより剥離し 1:3-1:6 に希釈し, 継代とした。

MG63 の培養:MG63 細胞 (HS 研究資源バンク, 徳島文理大学田元浩一教授より供与)は, 100 mm セルカルチャーディッシュ中調整 DMEM 培地 (10% 非働化 FCS, 抗生物質混合)を用いて 37 度 5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター内で培養を行い, 70%コンフルエント到達後 0.05%トリプシン-EDTA により剥離し 2 x 10⁵ cells/mL に調整し継代とした。

活性評価 (*in vitro*):抗リーシュマニア活性試験(4) 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 μL と, 1x10⁵ promastigotes/mL となるように調製した *L. major* 液 50 μL をそれぞれ接種し, 培養液の全量を 100 μL とした。27 度 5% CO₂ 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。エキス等の混合物については MIC (吸光度がコントロールの 70%に到達したときの濃度, μg/mL) で求め, 化合物は IC₅₀ 値 (μg/mL) をグラフより求めた。ポジティブコントロールはアムホテリシン B を用いた。

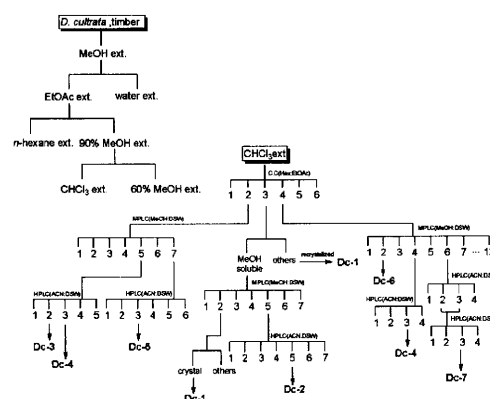
RAW264.7 細胞に対する増殖抑制試験 試料は DMSO に溶解した後, 調整培地で希釈し, メンブレンフィルターを通した。70%コンフルエントに到達した細胞を 1x10⁴ cells/100 μL/well となるように調製し 96 穴マイクロタイタープレートに播種した。24 時間接着後, 試料溶液を各濃度に調製し, 細胞を播種したウェルから 50μL の培地と各濃度の試料溶液 50 μL とを置換し, 培養液の全量を 100 μL とした。37 度 5% CO₂ 下で 48 時間インキュベートを行った後, XTT 試薬 (Roche) を加え, インキュベート

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、平均値を求めてグラフを作成し、IC₅₀ を求めた。ポジティブコントロールはプロテアソーム阻害剤である MG132 (10 μM)で確認した。

MG63 細胞に対する増殖抑制試験 試料は DMSO に溶解した後、調整培地で希釈し、メンブレンフィルターを通した。70%コンフルエントに到達した細胞を 2x10⁴ cells/100 μL/well となるように調製し 96 穴マイクロタイタープレートに播種した。24 時間接着後、試料溶液を各濃度に調製し、細胞を播種したウェルから 50μL の培地と各濃度の試料溶液 50 μL とを置換し、培養液の全量を 100 μL とした。37度 5% CO₂ 下で 48 時間インキュベートを行った後、Tetracolor ONE (生化学工業)を加え、2 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、平均値を求めてグラフを作成し、IC₅₀ を求めた。ポジティブコントロールはプロテアーゼ阻害剤である MG132 (10 μM)で行った。

抽出と単離: *D. cultrata* 材は荒削り後、メタノールで温浸抽出した。メタノールエキスは、水と酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層は n-ヘキサンで脱脂後クロロホルムと 60%メタノールで分配した。クロロホルム抽出物を、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 = 9:1, Silica gel 60N, 40-50 μm, Kanto Chemical Co.)さらに、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 を繰り返して行うことで化合物 Dc1-7 を得た。(スキーム 1) (HPLC condition: Mobile Phase/ acetonitrile:water-7:3, Detection/UV at 210 and 254 and 280, RI range 64, Column/ Shiseido CapcellPak C18 MG 5 μm, ø20*250 mm, Flow Rate/ 10.0 mL/min). *P. kurrooa* 根は、グラインダーで粉碎後メタノールエキスを得た。メタノールエキスは、水と酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層は n-ヘキサンで脱脂後 90%メタノールで分配した。抗リーシュマニア活

性試験の結果、活性の移行した n-ヘキサン抽出物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに繰り返して2回付した (n-hexane: ethyl acetate = 95:5, Silica gel 60N, 40-50 μm, Kanto Chemical Co.)さらに、逆相中圧液体クロマトグラフィー (MPLC, methanol: water = 8:2, Yamazen), HPLC を繰り返して行うことで化合物 Pk1-2 を得た。(Scheme 1) (HPLC condition: Mobile Phase/ acetonitrile:water-8:2, Detection/UV at 210 and 254 and 280, RI range 64, Column/ Shiseido CapcellPak C18 MG 5 μm, ø20*250 mm, Flow Rate/ 10.0 mL/min). 化合物 Pk-3 については、UV 吸収が僅かにしか認められなかったため、プレパラティブ TLC (n-hexane: ethyl acetate 95:5, 0.5 mm) による掻き取りにより分取した。



スキーム 1 *D. cultrata* の分離スキーム

C. 研究結果

1. ミャンマー産 *Dalbergia cultrata* の活性成分の単離、構造決定とその活性

メタノールエキスを酢酸エチルと水で分配した後、抗リーシュマニア活性試験を行ったところ、同様の活性 (MIC 50 μg/mL) を示したことから、比較的画ししやすい脂溶性の高い酢酸エチル分画から分離することとした。各種クロマトグラフィー分離の結果、7 つの化合物が得られ(図 1)、このうち Dc-3~5 は新規化合物であることが明らかになった。以下にこれらの構造決定について記した。

その他の既知化合物について、Dc-1 は (S)-methoxydalbergione (5), Dc-2 は obtusafuran (6), Dc-6 は 3'-hydroxy-2,4,5-