

Ziya Dum からその下の Wa Sam Dum まで移動した。Ziya Dum も Wa Sam Dum も山岳地帯の村であり、電気も極一部で自家発電が行われている程度であるため、電話などの通信手段が無く、Putao への連絡を確保できなかったが、翌日の 18 日に Putao を目指して移動を開始した。その途中、運良く迎えの車と出会い、当初予定した日程内で戻ることができた。

Putao に帰着した翌日の 19 日には、現地の薬

用植物試験栽培地（図 10）と市場（図 11）などを見学した。市場では生薬を扱っている店があったので、ビルマオウレンを購入した。また、20 日に国内線で移動するにあたり、Putao の空港の店においてもビルマオウレンを購入した。21 日には Pin Oo Lwin にある National Kandawgyi Botanical Gardens を訪問し、薬用植物の試験栽培を見学した（図 12）。また、22 日には Yangon において市場、生薬問屋、薬局



図 8. キャンプ地 Thit Pin Gyi Sakan



図 10. Putao の有用植物試験栽培地



図 9. 発見したビルマオウレン



図 11. Putao の市場及びその中の薬店



図 12. Pin Oo Lwin での有用植物試験栽培



図 13. Yangon の生薬市場及び薬局

(図 13) などを見学した。

採集したビルマオウレンは、宿泊した村においてその根茎を洗い、保湿した状態で保存し、その後毎日その状態を確認した。腊葉標本は、Putao に帰着してからホテルにて作成し、その後毎日乾燥用の古新聞を取り替えるなどしてその状態を確認した。また、これらは日本国内への持ち込み時に植物検疫を受けた。生きた植物体は、帰国後直ぐに鉢植えにして、その状態を観察した (図 14、15)。その後、徳島文理大学香川薬学部以外にも金沢大学及び昭和薬科大学にて保存育種してもらうために預けた。

## 2. TLC による成分分析

ビルマオウレンと日本国内で流通しているオウレンとの定性的な比較をする目的で、まず TLC による成分分析を行った。採集したビルマオウレンの根茎が非常に小さかったため、試験材料にはそれ以外のものを用いた。

まず、局方に準じて分析した。さらに、文献を参考にした条件でも分析を行った。(図 17)

## 3. HPLC による成分分析

ビルマオウレンと日本国内で流通しているオウレンとの定量的な比較をする目的で、HPLC による成分分析を行った。ここにおいても試験材料には採集品以外のものを用いた。

そのクロマトグラム (図 18) と分析結果 (表 1) を示す。定量的な比較は、局方に準じた。

## D. 考察

現地調査は、漢方処方に用いられる生薬の基原種を確保し、種の同定および保存に役立てることが目的であった。今回のミャンマーにおける現地調査により、日本薬局方収載生薬であるオウレンの基原種の一つであるビルマオウレン (*Coptis teeta*) を持ち帰ることができたことは、一応の成果を上げることができたと考えている。

数十年前までは今回採取した地点の野生オウレンの根を現地の人々が伝統薬として利用していたが、採取に出かけた村民が虎に襲われ

て落命したことで採取しなくなった、とのことである。現在、虎は中国薬等の目的で乱獲され野生種は激減している。ミャンマーは周辺地域をトレッキングコースとして開発しつつあるので今後この地域も開発される可能性が大きい。

成分分析においては、生憎、採集したビルマオウレンの根茎が非常に小さく、また個体による変動が激しいと考えられたため、市場品及び別途入手した植物により検討を行った。



図 14. 鉢植えにしたビルマオウレン



図 15. 新たに芽生えたビルマオウレンの葉

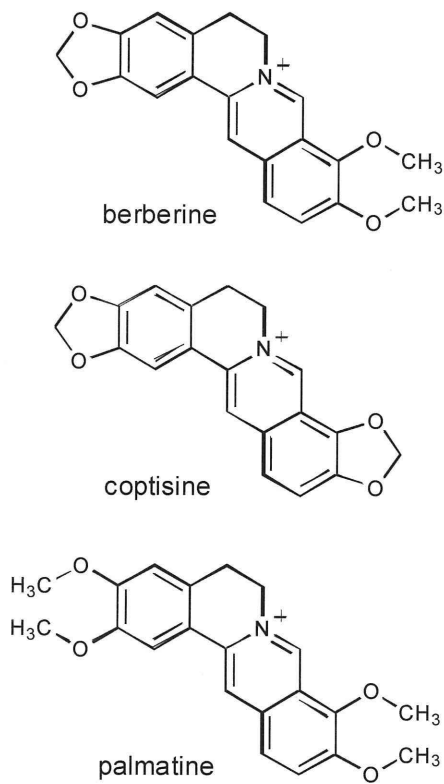
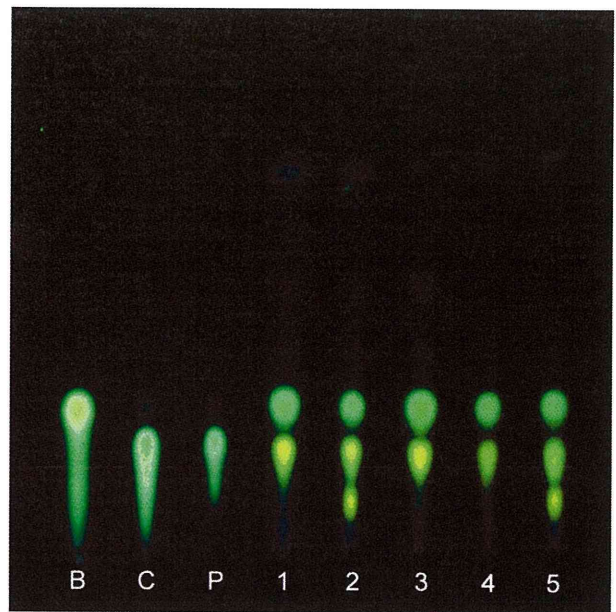


図 16. ベルベリン、コプチシン、パルマチンの構造

TLC による成分の比較では、標準化合物としてベルベリン、コプチシン、パルマチン (図 16) を用いた。はじめに局方の展開溶媒条件で成分を確認した (図 17. (a))。ベルベリンのスポットがどのサンプルにも確認することができた。しかし、コプチシンとパルマチンのスポットが同じ位置に現れ、分離できなかった。また、サンプル 1 のビルマオウレン野生品とサンプル 3 および 4 の現地商品では、ベルベリンを含めて二つのスポットしか確認できなかったが、サンプル 2 のビルマオウレン栽培品とサンプル 5 の局方品においてはさらにもう一つスポットが確認できた。次に、文献を参考にして展開溶媒条件を変更して成分を確認した (図 17. (b))。この条件においてもコプチシンとパルマチンのスポットが同じ位置に現れ、分離できなかった。しかし、これらのスポット以外にサンプル 1, 3, 4 では一つ、サンプル 2 及び 5 では二つスポットを確認することができた。このことは、標準化合物とした 3 種のアルカロイド以外に、少なくとも一つ若しくは二つ以上の主要成分が含まれていることを示している。*Coptis chinensis* 及び *C. deltoidea* にはプロト



(b)

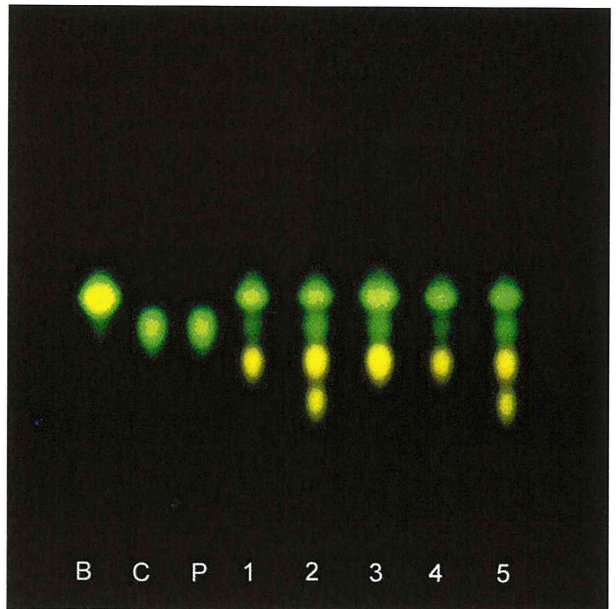


図 17. TLC による成分分析

(a) 展開溶媒: 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液 = 7:2:1

(b) 展開溶媒: メタノール/酢酸アンモニウム(3→10)/酢酸(100)混液 = 20:1:1

B: berberine

C: coptisine

P: plmatine

1: ビルマオウレン野生品

2: ビルマオウレン栽培品

3: 現地商品 1 (Putao 市場購入品)

4: 現地商品 2 (Putao 空港購入品)

5: 日本薬局方オウレン (紀伊国屋)

ベルベリンの含有が含まれていることが報告されているので 5 は中国産オウレンであること、更に、2 のビルマオウレン栽培品の基原植物は 3 と同一種であることが推定される。

	coptisine	berberine	palmatine
(1)	1.30 %	6.71 %	2.13 %
(2)	1.91 %	5.50 %	4.29 %
(3)	1.74 %	7.71 %	3.01 %
(4)	1.56 %	4.95 %	2.34 %
(5)	1.95 %	6.28 %	4.99 %

表1. コプチシン、ベルベリン、パルマチンの含量

次に HPLC による簡易定量を行った。分離の条件は非揮発性緩衝液を用いた局方の方法には沿わず、ギ酸/メタノール系を用いた。表1に示すように、5種のサンプルともベルベリンの含量は概ね5%以上であり、これは局方で示されている4.2%以上という基準を満たしている。また、そのクロマトグラム(図18)では、サンプル5の局方品及びサンプル2のビルマオウレン栽培品においてベルベリン、コプチシン、パルマチンの他に二つのピークが現れた。一方、サンプル1, 3, 4ではその片方のピークのみが現れた。これらのことはTLCのデータと良い一致を示している。現地購入品は地域住民が野生品を採集してきたものとも考えられ、そうであれば野生品と現地購入品が同様のクロマトパターンを示したことがその裏付けとなりうる。また、Putaoで栽培されたとされる生薬は中国に由来する種を栽培したものか、あるいはミャンマーには*C. teeta*以外の種が存在するものと考えられる。今後、未確認である2つの成分の同定及びPutao栽培品の基原植物の同定が必要と考えている。

参考文献

1) Zhi Li and Irmgard Merfort, High-Performance Thin Layer Chromatography for Quality Control of Multicomponent Herbal Drugs: Example of Cangzhu Xianglian San, *J. AOAC Int.*, 93(5), 1390-1398 (2010)

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

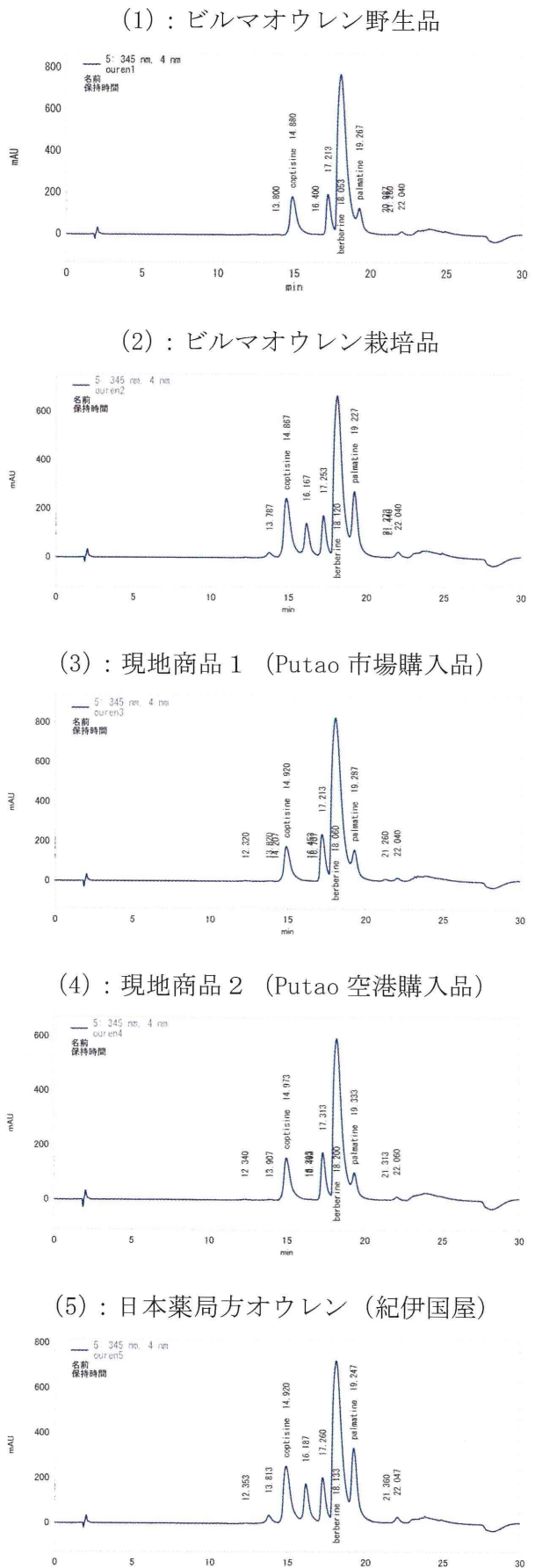


図18. HPLCによる成分分析

*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

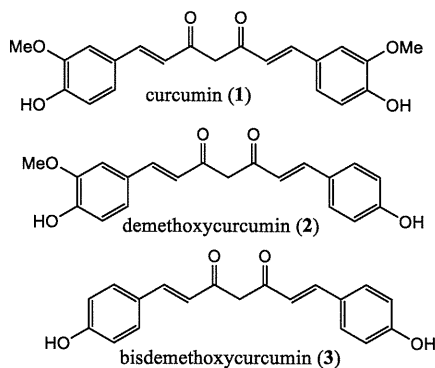


図1 ウコンのクルクミノイド

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1gをすり潰してメタノール5mL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。

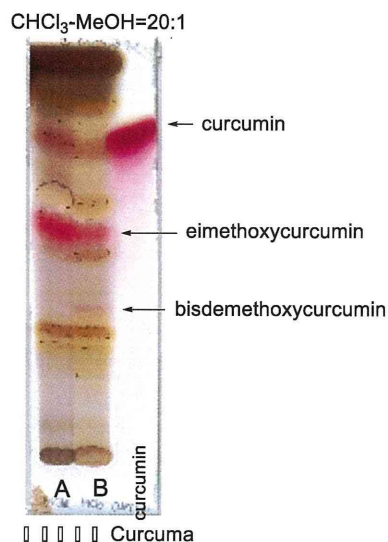


図2 ミャンマー *Curcuma* 属植物A, BのTLC比較

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ため、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10gをメタノールで熱時抽出して3g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(<sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H-HMQC, <sup>13</sup>C-HMBC, ROESY)を含むNMR(<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-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。

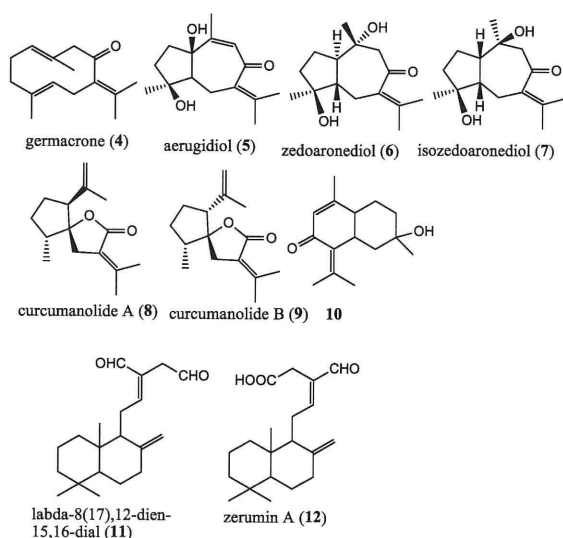


図3 ミャンマー *Curcuma* 属植物から得られた化合物

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  $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O} = 60 : 10 : 1$  から始め、 $\text{CHCl}_3$  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。

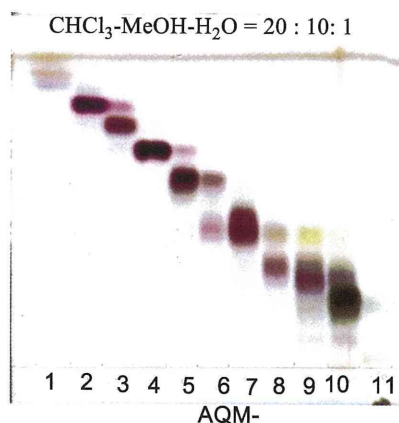


図4 八月札メタノールエキスのカラムフラクションの TLC

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 CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>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 [M+Na]<sup>+</sup> が認められることから、分子式は C<sub>41</sub>H<sub>66</sub>O<sub>13</sub> であることが明らかとなった。<sup>1</sup>H-NMR において、5 本のシングレットメチル基 [ $\delta$  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レットメチル基 [ $\delta$  1.61 (13H, d, *J* = 6.2 Hz)] の存在、2 つのヒドロキシメチル基 [ $\delta$  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 [ $\delta$  4.24 (1H, dd, *J* = 11.9, 3.8 Hz)] の存在、3 置換オレフィン [ $\delta$  7.48 (1H, t, *J* = 3.4 Hz)] の存在が明らかになった。<sup>13</sup>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。<sup>13</sup>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 [ $\delta$  1.19 (3H, s)] と 18 位 H [ $\delta$  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、其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ためと考えている。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ければ、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。

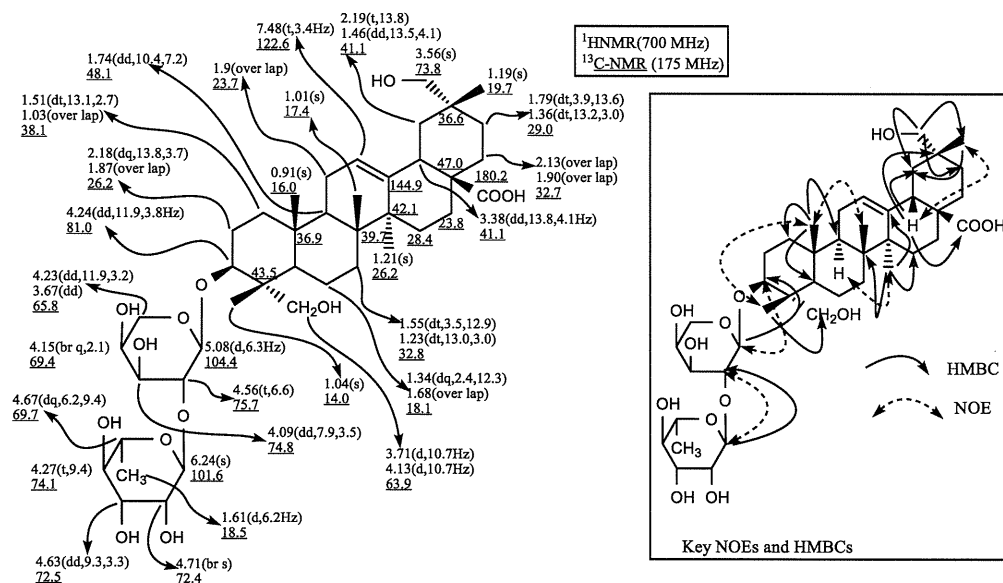


図4 AQ7 の NMR データのアサインと 2D-NMR 相関

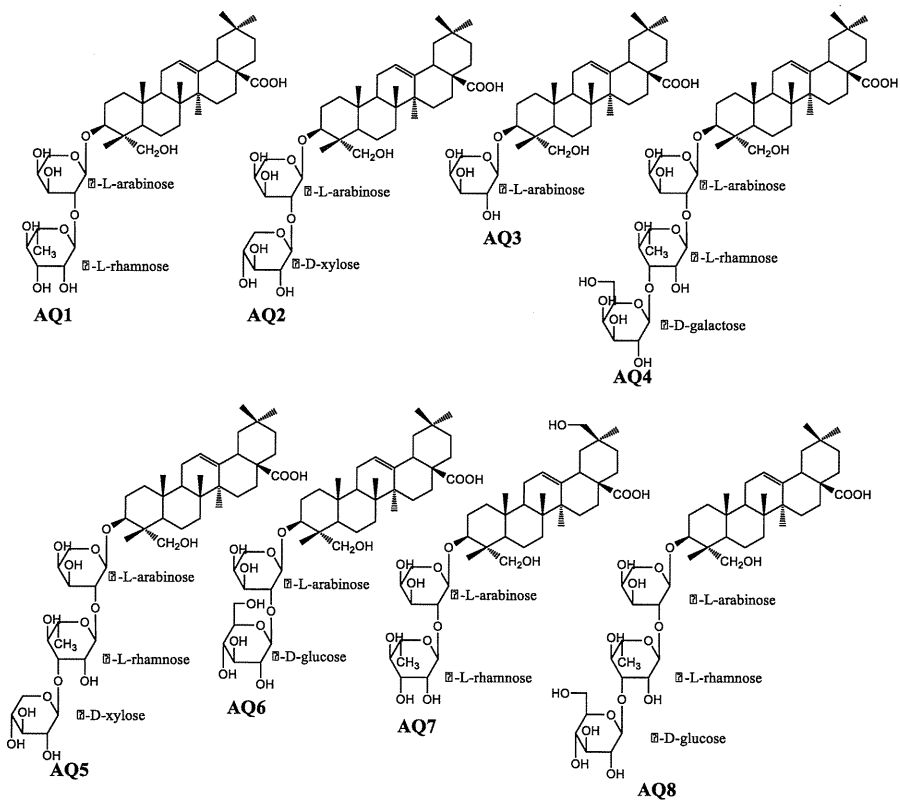


図5 *A. quinata* から得られたトリテルペンサポニン

厚生労働省科学研究補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）  
分担研究報告書

パキスタン産 *Artemisia scopalia* の含有成分に関する化学的研究

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；リーシュマニア原虫の感染により引き起こされるリーシュマニア症は、比較的貧しい熱帯地域の途上国では深刻な問題になっている。その治療薬は高価で、確実な効果が認められない。貧しい地域の感染者が有効な治療を受けることができるよう、安価で、しかも効果が期待できる治療薬の開発が望まれる。そこで、感染地域の薬用植物資源から抗リーシュマニア活性物質の探索を行ってきており、我々の関連グループでは多くの成果を挙げている。今回、パキスタン産の薬用植物について活性を検討した結果、いくつかの植物材料に抗リーシュマニア活性が認められた。そのうち、*Artemisia scopalia* について活性物質の分離構造決定を行った。その結果40種余りの化合物を分離し構造を決定し、そのうち10種余りが新規化合物であることが明らかになった。これらの化合物の抗リーシュマニア活性についても検討する。

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. リーシュマニア症 (leishmaniasis) はトリパノソーマ科のリーシュマニア原虫の感染により引き起こされる人獣共通の感染症の総称で、吸血昆虫であるサシチョウバエによって媒介される。原虫の種類により症状に差が有り、ヒトでは、内蔵型、皮膚型、粘膜型に分類される。WHO によれば、88カ国、1200万人が感染しており、緊急に対策を要する WHO の重要指定6大感染症の一つとされている。治療薬としては、5価アンチモン剤やアンフテリシン B 等の抗生物質が使用されているが、高価で、有効性や副作用に問題が有る。そのため、安価で、発症地域で簡便に使用可能で、かつ、有効な治療薬の開発が望まれている。そのため、熱帯の感染地域を中心に、薬用植物を集め、その抗リーシュマニア活性物質の探索を行ってきた。その結果多くの成

果を挙げているが、今回、パキスタン産の薬用植物についてスクリーニングを行った結果いくつかの植物に活性が認められたが、そのうち、キク科植物 *Artemisia scopalia* のメタノール (MeOH) エキスについて活性物質の分離構造決定を行う。

## B. 研究方法・結果

### 1. パキスタン産 *Artemisia scopalia* の MeOH エキスから抗リーシュマニア活性物質の分離

パキスタン産 *A. scopalia* (キク科) の MeOH エキスに抗リーシュマニア活性が認められた。そこで、*A. scopalia* の乾燥地上部 (1 kg) を MeOH により還流抽出した。抽出液は減圧下濃縮し MeOHext. (150 g) を得た。MeOHext. は酢酸エチル (AcOEt) と水で分配し、水相はさらにブタノール (*n*-BuOH) と分配し AcOEt,

n-BuOH, H<sub>2</sub>O 相を得た。このうち、AcOEt 相に強い活性が認められたので、クロロホルム (CHCl<sub>3</sub>)–MeOH 系溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、10 のフラクションに纏めた。得られたフラクションについて活性試験を行った結果、図 1 の分離チャート示すように、Fr. 2 に最も強い活性が認められ、その他のいくつかのフラクションにも活性が認められた。そこで、Fr. 2 を始めとして、活性の強いフラクションについて分離

を進めていった。フラクションのうち比較的その重量が多いフラクションや、含有される化合物の数が多いと推察されるフラクションは、さらにシリカゲルによるカラムクロマトグラフィーをおこない、最終的には、逆相系 ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離を行った。必要に応じて、分取 TLC (PLC) を行い成分の分離を行った。分離の流れは図 1 に示す。その結果 40 種余りの化合物を分離することが出来た。

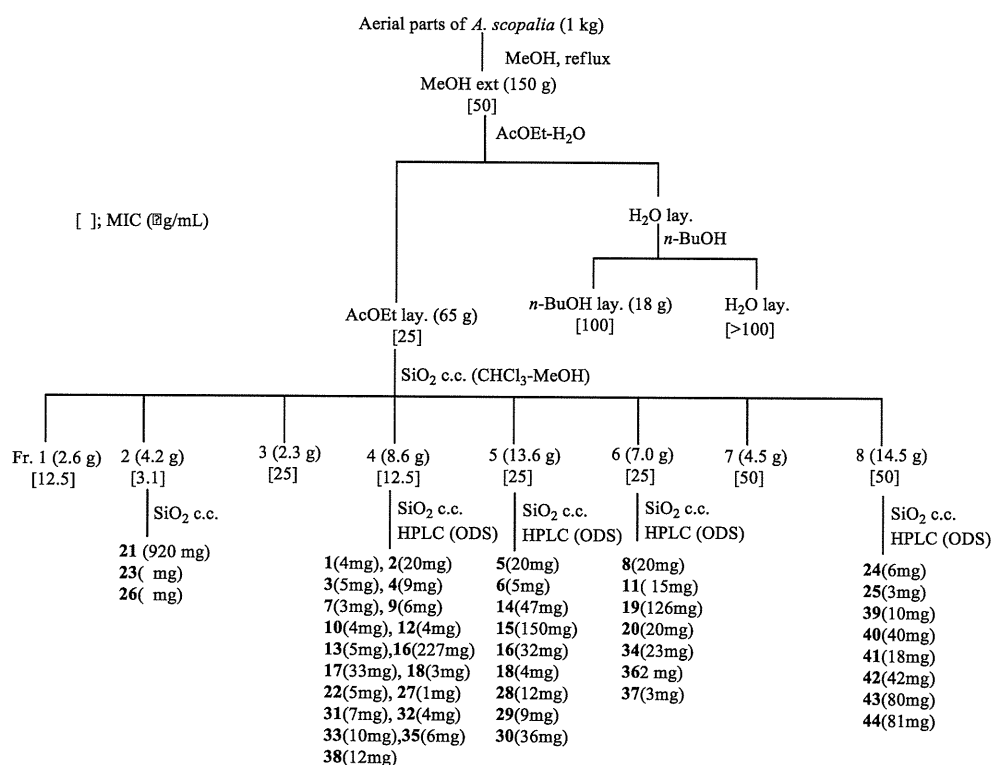


図 1 *Artemisia scopalia* 地上部の抽出分離のスキーム

## 2、分離化合物の構造決定

既知化合物については、HR-ESI-MS および 1D-NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR), 2D-NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC, ROWSY) データ等を検討することにより構造決定をし、報告されているデータと比較することにより、既知化合物と同定した。

新規化合物 (comp. 1 – 10) については以下のようなスペクトルデータの解析により構造決定した。

Comp. 1 は HR-ESI-MS において *m/z* 329.1373 に疑似分子イオン [M+H]<sup>+</sup> (計算値 329.1389 for C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>) を示すことから分子式は C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> と決定した。

$^1\text{H-NMR}$  においては、二重結合上の3つのメチル基 [ $\delta_{\text{H}}$  1.99 (3H, s), 1.76 (3H, s), 1.72 (3H, s)], お互いに *trans* の関係にあるオレフィンプロトン [ $\delta_{\text{H}}$  7.68 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz), 6.26 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz)], 2つのオレフィンプロトン [ $\delta_{\text{H}}$  6.55 (1H, d,  $J = 6.7$  Hz), 5.28 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz)], 2つの芳香環上のプロトン [ $\delta_{\text{H}}$  6.93 (1H, s), 6.91 (1H, s)], アセタールプロトン [ $\delta_{\text{H}}$  6.97 (1H, d,  $J = 6.7$  Hz)], ホルミル基のプロトン [ $\delta_{\text{H}}$  9.55 (1H, s)], 芳香環と2重結合に挟まれたメチレンプロトン [ $\delta_{\text{H}}$  3.30 (1H, dd,  $J = 15.4, 7.4$  Hz), 3.28 (1H, dd,  $J = 15.4, 8.2$  Hz)] が認められた。 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルにおいて、共役ケトン ( $\delta_{\text{C}}$  194.0), カルボキシル基 ( $\delta_{\text{C}}$  172.0), アセタール炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  106.2), 1,2の芳香環及び2重結合炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  147.5, 147.4, 146.9, 143.8, 141.8, 134.2, 128.6, 125.7, 123.5, 120.4, 115.1, 104.8), 1つのメチレン炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  27.6), 3つのメチル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  25.8, 17.9, 9.9) が認められる。HMBC スペクトルを検討した結果、図2に示すように、1つのオレフィンメチル ( $\delta_{\text{H}}$  1.99) からホルミル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  194.0), オレフィン炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  143.8, 141.8) への相関、アセタールプロトン ( $\delta_{\text{H}}$  6.97) から芳香環炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  147.5, 147.4), オレフィン炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  143.8, 141.8) への相関、メチレンプロトン ( $\delta_{\text{H}}$  3.30, 3.28) からオレフィン炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  134.2, 120.4), 芳香環炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  147.4, 125.7, 123.5) への相関、オレフィンプロトン ( $\delta_{\text{H}}$  7.86) からカルボキシル基炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  172.0), 芳香環炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  128.6, 125.7, 104.8) への相関などが観測されたことから、1の平面構造が図2のように決定された。7,8位の2重結合は  $J = 15.8$  Hz から

*trans* と、2'',3''位の二重結合は ROESY スペクトルにおいて、ホルミルプロトンと H-2'' の間、Me-5'' と H-1'' との間の NOE 相関が認められたことから、*trans* 配置であることが明らかとなった。Comp. 1の構造と  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  のアサインを図3に示す。1''位の立体配置については未決定である。1は文献未記載の新規化合物と考えられる。なお、1はプレニールユニットがアセタールの形で母核に結合した非常に特異的な構造を有しており興味を持たれる。

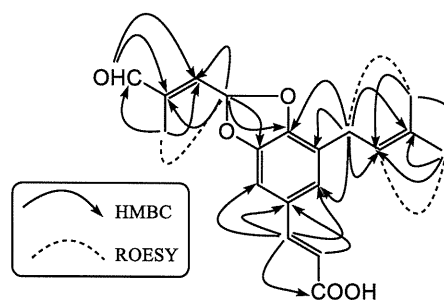


図2 Comp. 1のHMBCとROESY

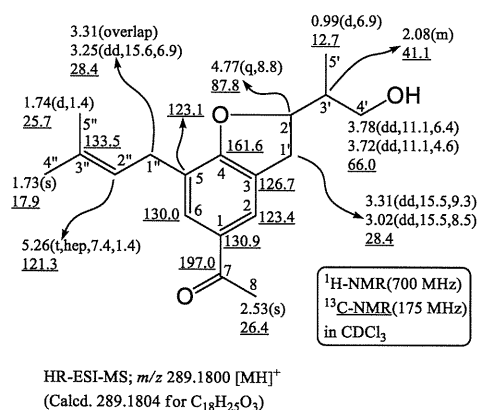


図3 Comp. 1のNMRのアサインとHR-ESI-MSデータ

Comp. 2はHR-ESI-MSにおいて  $m/z$  289.1800に疑似分子イオン [M+H]<sup>+</sup> (計算値 289.1804 for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>)を示すことか

ら分子式は  $C_{18}H_{24}O_3$  と決定した。 $^1H$ -NMR スペクトルにおいて、2重結合上のメチル基2つ [ $\delta_H$  1.74 (3H, d,  $J = 1.4$  Hz), 1.73 (3H, s)], アセチルメチル基 [ $\delta_H$  2.53 (3H, s)], ダブルレットメチル基1つ [ $\delta_H$  0.99 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz)], 酸素の結合したメチレン [ $\delta_H$  3.78 (1H, dd,  $J = 11.1, 6.4$  Hz), 3.72 (1H, dd,  $J = 4.6$  Hz)], ベンゼン環に隣接したメチレン [ $\delta_H$  3.31 (1H, dd,  $J = 15.5, 9.3$  Hz), 3.02 (1H, dd,  $J = 15.5, 8.5$  Hz)], オレフィンとベンゼン環に挟まれたメチレン [ $\delta_H$  3.31 (1H, overlap), 3.25 (1H, dd,  $J = 15.6, 6.9$  Hz)], 酸素の結合したメチン [ $\delta_H$  4.77 (1H, q,  $J = 8.8$  Hz)], メチルの結合したメチン [ $\delta_H$  2.08 (1H, m)], 3置換オレフィン [ $\delta_H$  5.26 (1H, t, hept,  $J = 7.4, 1.4$  Hz)], ベンゼン環の2つのプロトン [ $\delta_H$  7.66 (1H, s), 7.62 (1H, s)] の存在が明らかとなった。 $^{13}C$ -NMR スペクトルにおいては、ベンゼン環及びオレフィンの8つの炭素 ( $\delta_C$  161.6, 133.5, 130.9, 130.0, 126.7, 123.4, 123.1, 121.3), カルボニール ( $\delta_C$  197.0), 酸素の結合したメチレン ( $\delta_C$  66.), メチン ( $\delta_C$  87.8) 等のピークが観察された。以上の結果アセトフェノン骨格に2つのプレニール基の結合した化合物であることが推察された。図5に示すように、HMBC スペクトルをを丹念に検討した結果、8-位のメチル基 ( $\delta_H$  2.53) からカルボニール ( $\delta_C$  197.0) 及び1-位の炭素 ( $\delta_C$  130.9) への相関が、Me-5' ( $\delta_H$  0.99) からC-2', 3', 4' ( $\delta_C$  87.8, 20.8, 66.0) への相関が、H-4 プロトン ( $\delta_H$  3.78, 3.72) からC-2', 5' ( $\delta_C$  87.8, 12.7) への相関が、H-1' ( $\delta_H$  3.31, 3.72) からC-2, 4, 3' ( $\delta_C$  123.4, 161.6, 66.0) への相関が、H-1' ( $\delta_H$  3.31, 3.25) からC-4, 6, 3'' ( $\delta_C$  161.6, 130.0, 133.5) への相関が認められたことから、**2** の構造を図6に示すような構造と決定した。ROESY スペクトルにおいても、H-2 と H-1' との相関及び、H-6 と H-2'' との相関が認められ、この構造を支持している。図6に **2** の構造と  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR のアサインデータを示す。Comp. **2** は文献未記載の新規化合物と考えられる。2', 3'-位の立体配置については未決定である。

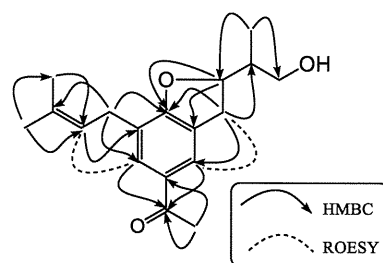
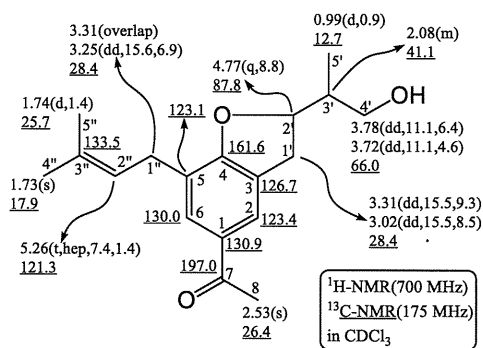


図5 Comp. **2** の HMBC と ROESY



HR-ESI-MS;  $m/z$  321.1698 [MH]<sup>+</sup>  
(Calcd. 321.1702 for  $C_{18}H_{25}O_3$ )

図6 Comp. **2** の NMR のアサインと HR-ESI-MS データ

Comp. **3** は HR-ESI-MS において  $m/z$  263.1276 に疑似分子イオン [M+H]<sup>+</sup> (計算値 263.1283 for  $C_{15}H_{19}O_4$ ) を示すことから分子式は  $C_{15}H_{18}O_4$  と決定した。

$^1\text{H-NMR}$  においては、ダブルットメチル [ $\delta_{\text{H}}$  0.99 (3H, d  $J=6.9$  Hz)], メトキシ [ $\delta_{\text{H}}$  (3H, s)], ハイドロキシメチル [ $\delta_{\text{H}}$  3.77 (1H, dd,  $J=11.0, 6.3$  Hz), 3.73 (1H, dd,  $J=11.0, 4.6$  Hz)], ベンゼン環に隣接したメチレン [ $\delta_{\text{H}}$  3.28 (1H, dd,  $J=15.6, 8.9$  Hz), 3.01 (1H, dd,  $J=15.6, 8.7$  Hz)], O に隣接したメチン [ $\delta_{\text{H}}$  (1H, q,  $J=8.7$  Hz)], メチル基の根もとのメチン [ $\delta_{\text{H}}$  2.08 (1H, hept,  $J=6.7$  Hz)], お互いに *trans* の関係にある隣接オレフィン [ $\delta_{\text{H}}$  7.63 (1H, d,  $J=15.9$  Hz), 6.27 (1H, d,  $J=15.9$  Hz)], 1,2,4-置換ベンゼン環 [ $\delta_{\text{H}}$  7.37 (1H, br s), 7.30 (1H, br d,  $J=8.3$  Hz), 6.75 (1H, d,  $J=8.3$  Hz)] が認められる。 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルにおいては、エステルカルボニール ( $\delta_{\text{C}}$  167.9), ベンゼン環及びオレフィン炭素 8 つ ( $\delta_{\text{C}}$  161.4, 144.9, 127.8, 129.6, 127.4, 124.5, 114.7, 109.7), メトキシ ( $\delta_{\text{C}}$  51.6), O に結合したメチレン及びメチン ( $\delta_{\text{C}}$  66.1, 87.7) の存在が明らかになった。その結果、クマール酸にプレニールが結合したメチルエステルであることが予想され、HMBC スペクトルを検討した結果、図 7 に示すような相関が得られ、図 8 に示すような構造と決定した。Comp. 4 は HR-ESI-MS ( $m/z$  263.1275  $[\text{MH}]^+$ ) から 3 と同じ分子式を有することが明らかとなり、 $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータも、3 のものとほとんど同じシグナルパターンであった。唯一明確な違いは、2'-位のプロトンが、3 では  $\delta_{\text{H}}$  4.73 にクインテット (q,  $J=8.7$  Hz) として認められるのに対して、4 では  $\delta_{\text{H}}$  4.98 にダブルトリプレット (dt,  $J=4.4, 9.6$  Hz) に表れている点であった。 $^{13}\text{C-NMR}$  においても、2', 5'-位の

ケミカルシフトに約 2 ppm 程度の違いが認められた。以上の結果から、3 と 4 はお互いに 2' 或いは 3'-位における立体異性体であるものと考えられる。図 8 に 3 と 4 の構造と  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  のアサインの結果を示す。

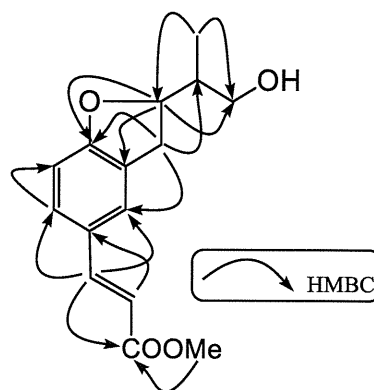


図 7 Comp. 3 の HMBC と ROESY



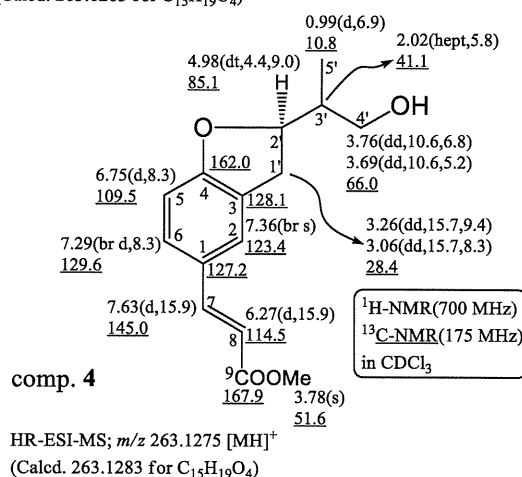
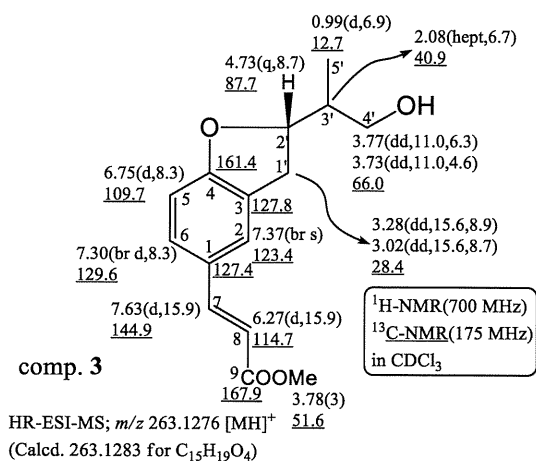


図8 Comp. 3, 4 の NMR のアサインと HR-ESI-MS データ

Comp. 12 は HR-ESI-MS において  $m/z$  215.0715 に疑似分子イオン [M+H]<sup>+</sup> (計算値 215.0708 for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>) を示すことから分子式は C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> と決定した。<sup>1</sup>H-NMR において、シングレットメチル基 [δ<sub>H</sub> 1.93 (3H, s)], お互いにカップリングした4つの芳香環上のプロトン [δ<sub>H</sub> 8.28 (1H, dt,  $J$  = 7.9, 0.6 Hz), 7.72 (1H, dt,  $J$  = 1.1, 7.8 Hz), 7.53 (1H, dt,  $J$  = 1.1, 7.9 Hz), 7.47 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz)], 1つのオレフィンプロトン [δ<sub>H</sub> 6.74 (1H, s)], 水酸基の根もとのメチンプロトン [δ<sub>H</sub> 5.22 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz)] が認められる。<sup>13</sup>C-NMR スペクト

ルにおいて、ラクトン環 (δ<sub>C</sub> 162.1), 1つのベンゼン環 (δ<sub>C</sub> 136.6, 135.0, 129.8, 128.7, 126.2, 120.8), 2つのオレフィン炭素 (δ<sub>C</sub> 154.4, 103.1), 三重結合の炭素 (δ<sub>C</sub> 84.2, 75.4), 酸素の結合したメチン炭素 (δ<sub>C</sub> 61.9), メチル基の炭素 (δ<sub>C</sub> 3.8) が認められることから、12 はイソクマリン骨格にアセチレン構造を持つ側鎖が結合した capillarine の類縁体と推測された。2D-NMR (HMQC, HMBC) スペクトルを丹念に検討した結果、図6に示すような構造と決定した。<sup>13</sup>C-NMR において、三重結合に隣接するメチル基及びメチン基のケミカルシフトが異常に高磁場シフトしていることも、三重結合の磁気異方性によるものと説明でき、この構造の正しいことを示している。Comp. 12 の <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR のアサイン結果を図6に示す。

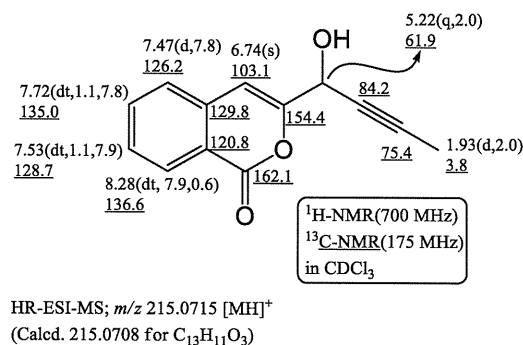


図9 Comp. 12 の NMR のアサインと HR-ESI-MS データ

その他の新規化合物 5 - 11 及び 13 についても、同様に HR-ESI-MS, 1D-NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR), 2D-NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC, ROESY) のデータを丹念に解析することにより構造を明らかにした。構造が明らかになった新規化合物の構造を図10に示す。既知化合物 14 -

44 についても同様に構造を明らかにした。 既知化合物の構造を図 1 1 に示す。

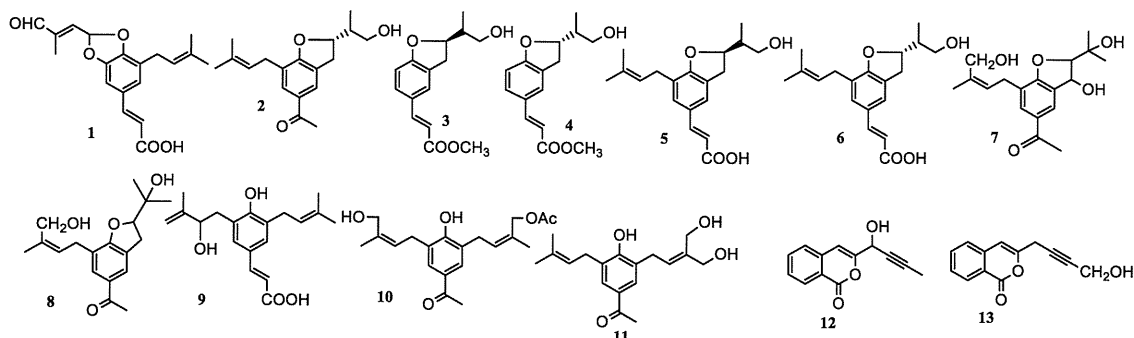


図 1 0 *A. scopalia* から分離した新規化合物

図 1 1 *A. scopalia* から得られた既知化合物。

得られた 44 種類の化合物のうち量的に確保されている化合物については、リーシュマニア原虫 *Leishmania major* に対する抗リーシュマニア活性を測定している。

### C. 考察

今回、*A. scopalia* から得られた化合物は大きく分けて、*p*-ヒドロキシ桂皮酸及び *p*-ヒドロキシアセトフェノンにプレニル基が付加した特徴的な化合物、**capillarine** を代表するイソクマリンにアセチレン側鎖の結合した化合物、フラボン誘導体及びキナ酸のジカフェオイル誘導体の 4 つのグループに分類される。いずれの化合物群にも活性が期待されるが、カラム

クロマトグラフィーのフラクションのうち最も活性の強かった Fr. 2 (MIC; 3.1  $\mu\text{g/mL}$ ) から主成分として得られた **comp. 21** (**capillarine**) はイソクマリン構造とアセチレン構造を持った特異的な化合物である、その活性に期待が持たれる。また、キナ酸のジカフェオイル誘導体も比較的珍しい化合物で、色々な活性が報告されていることから、活性に期待が持たれる。*P*-ヒドロキシ桂皮酸及び *p*-ヒドロキシアセトフェノンのプレニル誘導体の新規化合物のうち、不斉炭素を持つ化合物の立体配置の決定には至っていない。これら化合物の立体配置を明らかにすることと、分離化合物の抗リーシュマニア活性を明らかにし、

構造活性相関等の検討を進める必要がある。

#### D. 結論

今回の研究では、パキスタン産キク科植物 *A. scopalia* から13種の新規化合物が得られその構造を決定することが出来、既知化合物を含め44種の化合物を分離構造決定した。今回得られた化合物は、4つのカテゴリーに分けられる興味ある結果が得となった。抗リーシュマニア活性試験の結果に期待が持てる。以上の結果、期待以上

の成果が得られたものとする。

#### 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。

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、4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、いわゆる特効薬が無く、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