

生薬および関連植物の抗コクシウム活性成分の探索 (I)  
アジサイからの *cis* ならびに *trans*-febrifugine の単離および  
抗コクシウム活性について

加藤正博<sup>\*,a</sup>, 稲葉美代志<sup>a</sup>, 板鼻秀信<sup>a</sup>, 大原英治<sup>a</sup>, 中村好一<sup>a</sup>  
上里新一<sup>b,c</sup>, 井上博之<sup>b</sup>, 藤多哲朗<sup>b</sup>  
<sup>a</sup>第一製薬株式会社中央研究所, <sup>b</sup>京都大学薬学部

Studies on Anticoccidial Constituents of Crude Drugs and Related Plants (I)  
Isolation and Biological Activities of *cis*- and *trans*-febrifugine  
from *Hydrangea macrophylla*

MASAHIRO KATO,<sup>\*,a</sup> MIYOSI INABA,<sup>a</sup> HIDENOBU ITAHANA,<sup>a</sup> EIJI OHARA,<sup>a</sup>  
KOICHI NAKAMURA,<sup>a</sup> SHINICHI UESATO,<sup>b,c</sup> HIROYUKI INOUYE<sup>b</sup> and TETSURO FUJITA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Research Institute of Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.,  
16-13, Kita-kasai 1-chome, Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan

<sup>b</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,  
Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

<sup>c</sup>Present address: Pharmaceutical Research Laboratories of Japan Tobacco Inc.,  
6-2, Umegaoka, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 227, Japan

(Received March 26, 1990)

Twentythree crude drugs and related plants were examined for their anticoccidial activity by the use of the experimental coccidiosis in chicken. The activity was found in the dry leaves and calyxes of some *Hydrangea* plants. As the active components of *H. macrophylla* subsp. *macrophylla* forma *macrophylla*, febrifugines were isolated which have been known to be contained in *Dichroa febrifuga* and *H. umbellata*. However, although the febrifugines in the latter two plants were reported to be mainly *trans*, in the *H. macrophylla* plants, *cis*-febrifugine was found to be a major component and the *trans*-counterpart, a minor component. Furthermore, the *cis*-isomer showed no anticoccidial activity in chicken even at the concentration level of 25 times the effective dose (3 ppm, *IE*=100) of the *trans*-isomer.

**Keywords**—*Hydrangea* subsp. *macrophylla* forma *macrophylla*; *cis*-febrifugine; *trans*-febrifugine; *Eimeria*; coccidiosis; anticoccidial activity

鶏のコクシウム病は, *Eimeria* 属の原虫によって起る伝染性腸炎である. 現在, 本病の予防にはおもにイオノフォア系抗生物質<sup>1,2)</sup>や halofuginone<sup>3)</sup> が世界各国で使用されている. われわれは, 抗コクシウム活性成分を探索する目的で主に抗菌, 抗寄生虫および整腸作用を有することが知られている生薬<sup>4)</sup> と関連植物23点について実験的鶏コクシウム病モデルを用いて検討した.

その結果, ユキノシタ科アジサイ属 (*Hydrangea*) 植物に活性が認められた. そこで, アジサイについて活性成分の抽出分離を行ったところ, 常山 (*Dichroa febrifuga*)<sup>5)</sup> やヤクシマアジサイ (*Hydrangea umbellata*)<sup>6)</sup> の成分としてすでに知られている febrifugine を単離した. 本実験においては, 緩和な条件下で単離操作を行ったにもかかわらず, 既報告の2植物の場合とは異なり, *cis*-febrifugine が主成分であり, *trans*-febrifugine が副成分であった. そこで, 常山からの febrifugine の分離にわれわれの採用した方法を用いると *cis*-febrifugine が主成分として検出された. 一方, 今回単離した *cis*-febrifugine は既報の場合とは異なり事実上抗コクシウム活性は示さなかった. 本報においてはこれらの研究の過程について述べる.

## 材料および方法

## 1. 試験材料

青蒿 (*Artemisia annua*), 鷹爪 (*Artabotrys hexapetalus*), 鴉胆子 (*Brucea javanica*), 南瓜子 (*Cucurbita moschata*), 白頭翁 (*Gerbera piloselloides*), 川楝皮 (*Melia toosendan*), 使君子 (*Quisqualis indica*) は中国科学院昆明植物研究所 Dr. Sun Han-dong より, 朝鮮人参 (*Panax ginseng*) は韓国慶北大学校医科大学 Dr. Donng Wik-Choi より分与された。ニンニク (*Allium sativum*), タマネギ (*Allium cepa*), 黄耆 (*Astragalus membranaceus*), トウガラシ (*Capsicum annuum*), 桂皮 (*Cinnamoni cassia*), 桔梗 (*Platycodon grandiflorum*), センブリ (*Swertia japonica*), 阿仙薬 (*Uncaria gambir*), 生薑 (*Zingiber officinale*) は日本粉末薬品株式会社より, 常山は小城製薬株式会社より購入した。アジサイ (*Hydrangea macrophylla* subsp. *macrophylla* forma *macrophylla*), アロエ (*Aloe arborescens*), アマチャヅル (*Gynoslemma pentaphyllum*), セラニウム (*Pelargonium hortorum*), ステビア (*Steviae rebaudiana*) は関東で, チャ (*Camelia sinensis*) は静岡県で栽培されていたものを, それぞれ採集した。生薬原料および採集新鮮植物材料は 20~22°C の空調室でよく乾燥し, 細切りにしたのち, ライカイ器で微粉末とし試験に供した。

## 2. 分析機器

融点は微量融点測定器 (柳本製作所) により測定, 未補正值である。旋光度は日本分光 DID-181 型 Digital polarimeter, 高分解能マス (HR-MS) スペクトルは日本電子 JEOL JMS-01SG-2, 赤外吸収 (IR) スペクトルは島津 IR-435 型赤外分光光度計, 紫外吸収 (UV) スペクトルは日立 323 型自記分光光度計を用いて測定した。クロマトスキャナーは島津 Dual-Wavelength TLC Scanner CS-930 を用いた。

## 3. 抗コクシジウム活性の測定

活性試験対象原虫には, ニワトリの盲腸に特異的に寄生する *Eimeria tenella* 株を用いた。使用動物はバブコック系の雄ヒナ (6~7日齢) で, *E. tenella* のオーシストを1羽当り  $1.0 \times 10^4$  個を強制経口感染させた。各試験材料はニワトリ飼料に添加し, 感染1日前より感染後7日間自由摂取法により投与した。1試験材料の活性試験にヒナ3羽を供した。活性の評価は角田, 石井<sup>7)</sup>の方法により感染3日後より出現する臨床所見と感染8日後の剖検所見に基づき, 病変の程度を-~++++の段階にグレード付けした。これを0~8点の指数に変換し, ヒナ3羽の指数総和を基に次式により有効性を求めた。有効率60%以上を活性ありと判定した。

$$\text{有効率 (IE)} = \frac{(\text{感染対照群の指数総和} - \text{試験群の指数総和}) \times 100}{(\text{感染対照群の指数総和})}$$

## 4. アジサイからの抗コクシジウム活性成分の分離

Chart に示すように, アジサイ花部乾燥粉末 (1 kg) を 80% MeOH (3 l) で冷浸抽出した。その抽出濃縮エキス (168 g) を各種有機溶媒で分配し, 活性画分の *n*-BuOH 移行部 (41 g) を得た。この画分を H<sub>2</sub>O-MeOH 系溶媒を溶出液とし, HP-20 カラムクロマトグラフィー (Pharmacia Fine Chemicals; 内径 125 mm, 高さ 1300 mm), 次いで LH-20 カラムクロマトグラフィー (Pharmacia Fine Chemicals; 内径 18 mm, 高さ 1300 mm) に付し活性分画 Fr. 1 (1.45 g) を得た。さらに, この画分を順次 HW-40 カラムクロマトグラフィー (東洋曹達; 内径 125 mm, 高さ 450 mm), C<sub>18</sub>ODS 逆相中圧カラム (山善; 内径 10 mm, 高さ 300 mm, 1~3 気圧) に付し, Fr. 1 (110.9 mg) および Fr. 2 (189.6 mg) を得た。活性画分 Fr. 2 は TLC Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck; 厚さ 0.25 mm) CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O = 65: 38: 6) 上, R<sub>f</sub>; 0.29 および R<sub>f</sub>; 0.44 に Dragendorff 試薬に陽性の二つのスポットを示した。Fr. 2 を Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck; 厚さ 0.5 mm) を用いた分取 TLC (CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O = 75: 25: 2, 二重展開) に付し, R<sub>f</sub>; 0.11 と R<sub>f</sub>; 0.16 の二つの主バンドをかき取り, それぞれ氷冷下 0.1 N-HCl で抽出した。この両抽出液をそれぞれ 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で pH 8.5~9.0 に調節し, CHCl<sub>3</sub> で3回抽出した。CHCl<sub>3</sub> 抽出液をそれぞれ飽和食塩水で洗浄し, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で乾燥後減圧濃縮し, 無色粉末状の結晶として HM-1 (22.3 mg, R<sub>f</sub>; 0.16), HM-2 (70.3 mg, R<sub>f</sub>; 0.11) を得た。HM-1 (*trans*-febrifugine): mp 139~141°,  $[\alpha]_D^{23} + 13.01^\circ$  (*c* = 0.21, 0.1 M acetate buffer, pH 4.5). HR-MS *m/z* [M]<sup>+</sup> 301.14263. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 301.14277. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3280, 3180, 2920, 2800, 1718, 1670, 1615. HM-2 (*cis*-febrifugine): mp 126~128°.  $[\alpha]_D^{25} + 24.37^\circ$  (*c* = 0.30, 0.1 M acetate buffer, pH 4.5). HR-MS *m/z* [M]<sup>+</sup> 301.14179. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 301.14277. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3400, 3050, 2910, 1685, 1610, 1470.

## 5. 常山からの febrifugine の分離

常山 500 g を 80% MeOH, 1.5 l で一昼夜冷浸 2 回繰り返した。その抽出濃縮エキス (19.5 g) をアジサイから



TABLE I. Anticoccidial Activities of Several *Hydrangea* and *Deutzia* Plants

Plants	Parts	% in Feed	Activities IE*
<i>H. macrophylla macrophylla</i> forma <i>macrophylla</i> (アジサイ)	Leaf	3	96.9
		4	99.0
		5	100.0
	Calyx and Petal	3	92.7
		4	99.9
		5	100.0
<i>H. macrophylla</i> subsp. <i>macrophylla</i> forma <i>normalis</i> (ガクアジサイ)	Leaf	3	97.9
		4	99.0
		5	100.0
	Calyx and Petal	3	64.5
		4	79.2
		5	86.8
<i>H. involucrata</i> (タマアジサイ)	Leaf	4	98.4
<i>H. macrophylla</i> var. <i>oamacha</i> (アマチャ)	Leaf	3	98.8
		5	100.0
<i>D. crenata</i> (ウツギ)	Leaf	5	0-21.3
		10	Done**

\* Index of efficacy. \*\* 全例死亡.

## 結 果

### 1. 生薬および関連植物の抗コクシジウム活性

抗コクシジウム活性試験に供した23点の植物材料のうち、アジサイのみに活性が認められた。試験に用いたアジサイの部位は花部(萼および花)で、10%飼料添加投与で、*E. tenella* の感染を完全に阻止した。他の試験材料には感染阻止効果および腸炎の軽減効果は見られなかった。

そこで、このアジサイと他のアジサイ属植物(ガクアジサイ、アマチャ、タマアジサイ)およびこれと同科の、ウツギ(*Deutzia crenata*)について活性比較試験を実施した(TABLE I)。アジサイ属植物の葉部間では活性に差異はなく3%飼料添加投与でIE 96以上の感染阻止効果を示した。また、アジサイの花部は葉部と同程度の活性を示したのに対し、ガクアジサイ(*H. macrophylla* subsp. *macrophylla* forma *normalis*)では花部は葉部より弱い活性を示した。ウツギは*E. tenella* の感染阻止効果および腸炎の軽減効果を示さず、むしろ強い毒性の発現がみられた。

### 2. アジサイからの活性物質の分離

アジサイ花部乾燥粉末(1 kg)の80% MeOH 抽出エキスの *n*-BuOH 移行部を Chart に示すように抗コクシジウム活性を指標として HP-20, LH-20, HW-40 および C<sub>18</sub>ODS 逆相中圧カラムカラムクロマトグラフィーに付した。IE 90 以上を示した飼料添加濃度は、MeOH 抽出エキスでは 4,000 ppm であり、C<sub>18</sub>ODS 逆相中圧カラムクロマトグラフィー Fr. 2 では 70 ppm であった。さらにこの画分を分取 TLC に付し HM-1 および HM-2 を得た。前者は 3 ppm 飼料添加で IE 100 の活性をしめしたが、後者は 75 ppm でも活性を示さなかった。なお、HM-1 と HM-2 の物理的恒数と既報告<sup>6)</sup>の febrifugine のそれらとの比較検討により、前者は *trans*-febrifugine (1)、後者は *cis*-febrifugine (2) と同定された。*cis*-febrifugine の立体化学に関する詳細な検討は次報で報告する。

### 3. 常山における *cis*- と *trans*-febrifugines の含量比

常山から、80% MeOH 冷浸、HP-20, HW-40 カラムクロマトグラフィーという緩和な条件下で febrifugine 混合物を分離した。分離された febrifugine の *cis*, *trans* の比を TLC クロマトスキャナーで求めたところ、その比は 5:1 であった。

## 考察および結論

Koepfli<sup>5)</sup> らは、常山の主成分は febrifugine (*trans* 体) であり *iso*-febrifugine (*cis* 体) は副成分として報告し

ている。また, Ablondi<sup>6)</sup>らは, ヤクシマアジサイから febrifugine (*trans* 体)のみを得たと報告している。それらに対し, われわれの場合はアジサイから主成分として *cis*-febrifugine が得られ, 副成分は *trans*-febrifugine であった。彼らは抽出に際し塩酸の存在あるいは非存在下で, 加熱還流を行っているのに対し, われわれの場合は冷浸抽出による緩和な条件を採用している。

そこで, 常山について, われわれの抽出, 分離方法を採用したところ Koepfli らの報告とは逆に, *cis* 体と *trans* 体が 5:1 の比率で分離された。したがって Ablondi らが, ヤクシマアジサイから *trans* 体のみを得たのは, *trans* 体が *cis* 体よりはるかに結晶性が良かったためであろうと考えられる。それゆえアジサイ属植物および常山の主成分は *cis*-febrifugine であり *trans*-febrifugine は副成分と推定される。また, *cis* 体は *trans* 体の 1/10 の抗原虫活性を有することが Barringer<sup>8)</sup>らによって報告されている。しかしながら, われわれが単離した *cis* 体は *trans* 体の 25 倍濃度の投与でも抗コクシジウム活性をまったく示さなかった。彼らが活性試験に供した *cis* 体には少量の *trans* 体を含むことが報告されていることから, その抗コクシジウム活性は混在する *trans* 体によるものであろうと考えられる。ゆえに *cis* 体の抗コクシジウム活性はきわめて低いかまったく活性を有しないものと考えられる。以上のように febrifugine の *cis* 体と *trans* 体との間で抗原虫活性に大きな違いがあることに興味もたれる。両物質の物理的, 化学的性質をさらに検討すれば, 構造と活性との相関解明への手掛かりを得ることができるかもしれない。この点につき現在研究を実施している。

**謝 辞:** 本研究を進めるに当たり, 生薬材料を提供していただいた中国科学院昆明研究所, Dr. Sun Han-Dong, 韓国慶北医科大学, Dr. Dongg Wik-Choi, 高分解能マスペクトルを測定くださいました京都大学薬学部, 秋元直茂博士ならびに貴重なご助言を賜りました第一製薬株式会社参事, 傍士和彦博士に感謝いたします。

#### 引用文献および注

- 1) R.M. Weppelman, G. Olson, D.A. Smith, T. Tomas, A.V. Iderstin, *Poultry Sci.*, **56**, 1550 (1977).
- 2) J.W. Westley, *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**, 208 (1977).
- 3) J.F. Ryley, R.G. Wilson, *Parasitology*, **70**, 203 (1975).
- 4) X. Pe-Gen, F. Shan-Lin, *Parasitology Today*, **2** 12, (1986).
- 5) a) J.B. Koepfli, J.F. Mead, J.A. Brockman, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1837 (1947); b) *ibid.*, *idem.*, **71** 1048 (1949).
- 6) F. Ablondi, S. Gordon, J. Morton II, J.H. Williams, *J. Org. Chem.*, **17**, 14 (1952).
- 7) 角田 清, 石井俊雄, 鶏病研究会, p. 21 (1971).
- 8) D.F. Barringer, Jr., G. Berkelhammer, R.S. Wayne, *J. Org. Chem.*, **38**, 1937 (1973).