

天然由来殺線虫活性物質に関する研究

木 内 文 之

金沢大学薬学部

Studies on the Nematocidal Constituents of Natural Medicines

FUMIYUKI KIUCHI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University,
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920, Japan*

(Received August 30, 1995)

A new assay method was established for evaluation of nematocidal activity using second-stage larvae of dog roundworm, *Toxocara canis*, a main pathogenic parasite of "larva migrans." By using this method, the nematocidal activities of hot water and methanol extracts of spices (42 samples) and traditional medicines used in South-east Asian countries (615 samples) and commercially available essential oils (82 samples) were determined. Some of the compounds showing a strong nematocidal activity were identified in these samples; Among them were piperamides and alkyl-amides from pepper, and a diarylnonanoid from mace. These compounds and their analogs were synthesized and the structure-activity relationships were investigated. A combination of a tannin and a nematocidal compound caused "burst" of the larvae (tannin burst). Tannins with more galloyl or catechin groups showed a stronger bursting activity. A similar burst of slightly different features was induced by some essential oils (ES-burst) in which the responsible compounds were elucidated to be terpenoids such as citral and perilla aldehyde. Synergistic actions of constituents were observed in nematocidal and bursting activities by some samples. Such synergistic actions of constituents seemed to play a very important role in the effectiveness of natural medicines.

Keywords—nematocidal activity; *Toxocara canis*; spices; traditional medicine; synergistic action; structure-activity relationship

現在の日本では寄生虫症はあまり問題にならなくなってきており、一般の関心もあまり高くない。しかし、世界的な規模で見ると熱帯地域を中心としてマラリア、フィラリア等の寄生虫症は依然として人類の健康に対する大きな脅威となっている。例えば、WHOの推定では全世界で15億人がマラリアの流行地域に生活しており、年間3億のマラリアの症例が報告され、そのうち200万人が死亡していると言う。

様々な寄生虫症のうち回虫、条虫等、消化管内寄生虫症に関しては様々な薬剤が開発されており、投薬に要する費用や、衛生状態を改善するための資金といった経済的な問題を除けば、ほぼ克服できるようになったと言えよう。これに対して血液、リンパ球などを含めた組織内に寄生する寄生虫による疾患については、今もって十分な薬剤の開発が行われているとはいえない。例えば、かつてマラリア治療の主役だったクロロキンは、耐性種の広範な出現によりその役目を終えようとしており、新たな薬剤の開発が急務となっている。また、トリパノソーマやリーシュマニアに

対しては砒素やアンチモン製剤のような毒性の高い薬剤が有効とされているに過ぎない。

マラリア、フィラリア（オンコセルカ症、象皮病）、トリパノソーマ（シャーガス病、アフリカ睡眠病）などの寄生虫症は日本にはなく、流行地から帰国した旅行者が、帰国後発病するケースのみである。現在日本で問題となっている組織内寄生虫症としては、エキノコックス（包虫症）、ツツガムシ病（リッケチア）等があるが、感染源が身近にあるという点で、ペットとして飼われている動物の寄生虫がヒトに感染して起こる幼虫移行症（larva migrans）が、近年注目されている。この疾病は *Toxocara* 属の幼虫によって引き起こされることが多く、Toxocariasisと呼ばれることもあるが、中でもイヌ回虫（*Toxocara canis*）が重要な病原寄生虫である¹⁾。

イヌ回虫の幼虫包蔵卵が本来の宿主であるイヌに経口感染した場合、成熟して成虫となり卵を生む。しかし、これが非固有宿主であるヒトに感染すると、体長0.4 mm程度の第2期幼虫の状態で成長が止まり、そのまま長期にわたって体内に留まって様々な疾患を引き起こす（Fig. 1）。すなわち、幼虫包蔵卵がヒトの消化管に入ると、幼虫は速

本総説は平成6年度日本生薬学会学術奨励賞を中心に記述したものである。

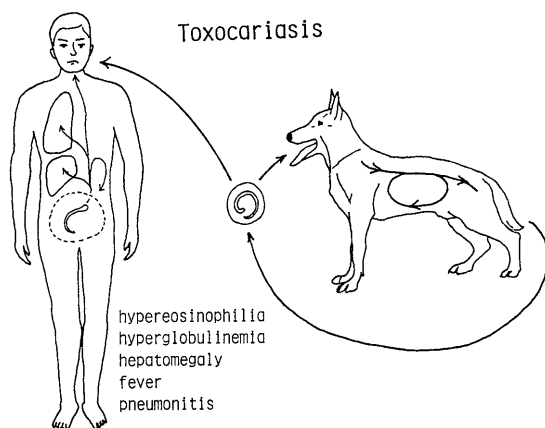


Fig. 1. Toxocariasis

やかに脱殻して腸管壁に侵入し、肝臓を通過して2~3日後には肺へ移行する。ここに数日留まった後、更に血流に乗って脳、眼、全身の筋肉などへ移行し、発熱、全身倦怠、栄養障害、咳、蕁麻疹、時としては肺炎様の症状や癲癇様発作を起こす。これらの症状は、いずれも著しい好酸球の増加や肝肥大を伴うのが特徴である。幼虫が眼に移行した場合は、視力障害や硝子体混濁を起こす。死亡例は希であるが、髄膜炎を起こして死亡した例が報告されている。また1979年には、マンゴーに付いたコウモリの寄生虫(*Toxocara pteropodis*)により、肝炎様の病気(当初原因が分からなかったため Palm Island mystery disease と呼ばれた)が集団発生した例もある²⁾。

この病気の診断は難しく、病変組織内に幼虫を検出した場合に初めて確定する。しかし、組織内から幼虫を検出することはかなり難しく、他の病気と間違えられている場合が多いようである。近年、イヌ回虫幼虫が排出する特異な抗原タンパクを利用した免疫学的な診断法が開発され、比較的容易に診断ができるようになるにつれ、日本での報告例も増えている³⁾。

この様な背景から著者らは、組織内寄生虫症に有効な薬物の開発を目標として、Toxocariasisの主たる病原寄生虫であるイヌ回虫の幼虫に対する殺虫作用を指標とした天然薬物のスクリーニングを開始した。

I. イヌ回虫幼虫を用いた新しい殺線虫活性試験法

生物活性を指標として天然物質を分離する場合、微量のサンプルで行え、しかも迅速で再現性のあるアッセイ法が必要不可欠である。著者らが用いているイヌ回虫の第2期幼虫は、各種の薬剤に抵抗性が強く、試験管内で2年間以上培養が可能である。このような線虫に対する殺虫効果を評価するにはLD₅₀または最小致死濃度(MLC)を求めるのが常套手段であろうが、これに要する労力と、イヌ回虫に感染した仔犬の減少により、用いることのできる幼虫の数が制限されていることから、より簡便に行え、しかも

TABLE I. Criteria for the Evaluation of the Mobility of the Larvae

State of the larvae	Score (<i>n</i>)
Moving with whole body	3
Moving with only a part of the body in the observation period	2
Immobile but not dead	1
Dead	0

Mobility index (MI)

$$MI = \frac{\sum n \cdot N_n}{\sum N_n} \quad (1)$$

N_n : number of larvae with the score of n .

Relative mobility (RM)

$$RM = \frac{MI_{\text{sample}}}{MI_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

ある程度定量性のあるアッセイ系を考案した⁴⁾。すなわち、幼虫1群20隻を96穴マイクロプレート上で薬物溶液と24時間培養し、経時的にその運動状態を観察する。そしてTABLE Iに示す基準に従い、幼虫の運動性でランク分けし、各ランクに0から3のスコアを与え、式(1)、(2)から相対運動性値(RM値)を算出して薬物の効果を数量化した。これにより、少量のサンプルで、しかも一度に多数の検体のアッセイが行える。この方法は非常に簡便であるが、運動状態の判定は主観に依るところがあり、一定の結果を得るにはある程度の熟練と、観察者間の基準の統一が必要である。

このアッセイ法を用い、まず市販の駆虫薬について効果を調べたが、サントニン、カイニン酸など虫体を麻痺させて消化管内寄生虫を駆虫するタイプの薬物や、フィラリア症に用いられるジエチルカルバマジンほとんど効果を示さなかった⁵⁾。また、漢方で駆虫効果があるとされる生薬19種についてその効果を調べた結果(TABLE II)、メタノール抽出物は比較的高い割合で殺虫効果を示したが、熱水エキ스가強い活性を示したのは北鶴虱、苦楝皮、蕪夷、シナ花の4種のみだった。このうちシナ花は、水、メタノール両エキスとも強い活性を示したが、その駆虫成分とされるサントニンは活性を示さないの、ほかの活性成分の存在が予想される。この様に、このアッセイ系を用いることにより、新しい殺線虫活性物質を単離できるものと考えられた。

II. スパイス及び天然薬物の殺線虫活性スクリーニング

スパイスは矯味、食欲の増進等の他、食物の防腐剤としての役割も果たしてきた。著者らは、スパイス類を多用する熱帯から亜熱帯の地域では、スパイス類が寄生虫症の予防、治療の面でも役割を果たしてきたのではないかと考え、スパイス、ハーブの殺線虫活性スクリーニングを行った⁶⁾。スパイス類42種の水及びメタノール抽出物を調製し、そ

TABLE II. Nematocidal Activity of Traditional Medicines Used for Anthelmintic Purpose against Second-Stage Larvae of *T. canis*

Name	Botanical source	H ₂ O extract ^{a)}		MeOH extract ^{b)}	
		RM6	RM24	RM6	RM24
Arecae Semen (檳榔子)	<i>Areca catechu</i>	67	43	100	37
Artemisiae Capillaris Herba (茵陳蒿)	<i>Artemisia capillaris</i>	92	36	33	0
Carpesii Fructus (北鶴虱)	<i>Carpesium abrotanoides</i>	33	0	100	0
Dauci Fructus (南鶴虱)	<i>Daucus carota</i>	100	41	95	0
Coicis Semen (薏苡仁)	<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>	90	90	100 ^{a)}	96 ^{a)}
Digenea (海人草)	<i>Digenea simplex</i>	94	70	100	91
Granati Pericarpium (石榴果皮)	<i>Punica granatum</i>	100	66	100	89
Magnoliae Cortex (厚木)	<i>Magnolia obovata</i>	91	35	33	0
Magnoliae Flos (辛夷)	<i>Magnolia kobus</i>	94	35	100	67
Meliae Cortex (苦楝皮)	<i>Melia azedarach</i>	47	0	86	0
Mume Fructus (烏梅)	<i>Prunus mume</i>	97	92	100 ^{a)}	58 ^{a)}
Omphalia (雷丸)	<i>Polyporus mylittae</i>	98	75	55	35
Pharbitidis Semen (牽牛子)	<i>Pharbitis nil</i>	100	47	100	91
Quisqualis Fructus (使君子)	<i>Quisqualis indica</i>	100	51	100	69
Santonica (シナ花)	<i>Artemisia cina</i>	99	0	0	0
Torreyae Semen (榧子)	<i>Torreya grandis</i>	96	84	100	100
Ulmi Pasta (蕪荑)	<i>Ulmus macrocapa</i>	0	0	0	0
Zanthoxyli Fructus (花椒)	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	99	43	100	100
Zanthoxyli Fructus (山椒)	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	96	39	100	0

^{a)} 10 mg/ml. ^{b)} 1 mg/ml.

TABLE III. Nematocidal Activity of Spices

Group	H ₂ O extract	MeOH extract		Spices
	10 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	
A	+	+	+	anise, cinnamon, clove, juniper berry, laurel, mace, oregano, pepper, turmeric
B	—	+	+	cardamon, cumin, ginger, nutmeg, sansho, thyme
C	+	—	—	allspice, baies roses, basil, caraway, coriander, dill, fennel, garlic, marjoram, peppermint, rosemary, sage, savory, tamarind, tarragon
	—	+	—	
D	—	—	—	cayenne pepper, chili pepper, fenugreek, horse radish, mustard, paprika, parsley, red pepper

+: RM=0; —: RM>0.

の殺線虫活性を推定したところ、メース、コショウ、ターメリックなど9種に強い殺線虫活性が認められた (TABLE III). スパイス類は精油を多く含んでいるが、上記の水及びメタノールエキスでは、減圧濃縮の段階で精油などの揮発成分はかなり失われている。そこで、一般に入手可能な精油82種についても、その殺線虫活性を調べたところ、約70%に1 mg/mlで殺線虫活性が認められ、不揮発性成分ばかりでなく揮発性成分の中にも殺線虫活性物質が含まれていることがわかった⁶⁾。

寄生虫症が多いと考えられる熱帯から亜熱帯にかけての地域で用いられている天然薬物の中には寄生虫によって引き起こされる疾患に対して有効なものかなり含まれているのではないかと考えられる。そこで、東南アジア諸国で用いられている生薬について殺線虫活性のランダムスクリーニングを行った。スリランカ (161種)⁷⁾、ネパール (160種)⁸⁾、トルコ (84種)⁹⁾、バングラデッシュ (101種)¹⁰⁾、マレーシア (109種)¹¹⁾ の生薬をテストした結果、水エキ

ス (10 mg/ml) では12~33%、メタノールエキス (1 mg/ml) では13~20%の生薬が強い殺線虫活性 (RM24=0) を示した。

III. 殺線虫活性物質の単離

次に、これらのスクリーニングで強い活性を示したものについて、活性物質の単離を行った。

1. コショウ¹²⁾

コショウはコショウ (*Piper nigrum* L.) の果実であり、世界中で最もポピュラーなスパイスの一つであろう。コショウはスパイスとしてだけではなく、発汗、駆風、健胃薬などとして漢方、アユルベータ医学などでも用いられており、ネパール、スリランカ、トルコ等で入手した生薬のスクリーニングでも強い殺線虫活性を示した。

コショウの精油 (ペッパーオイル) は殺線虫活性を示さず、活性物質はクロロホルム、メタノールで効率よく抽出された。そこで黒コショウのエタノールエキスを、殺線虫

活性を指標としながら溶媒抽出及びシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、新規化合物8種を含む15種のアミド化合物を単離した (Chart 1)。

コショウ属植物からはメチレンジオキシフェニル基を持った構造類似のアミドが多数得られている。そこで著者らはこのようなアミドをピペラミド (piperamide: PA) と総称し、以下のように系統的に命名することを提唱している¹²⁾。すなわち、Chart 2に示すように、アミン部分をXで、芳香環とアミンのNとの間の炭素数とそこにある二重結合の数を各々 m と n で表し、piperamide- $Xm:n$ とする。Xとしては、これまでに知られている天然物に対応して、ピペリジンをA、イソブチルアミンをB、ピロリジンをCとした。また、後述する *N*-メチルピペラジンのアミドのような合成アミドには、Mからのアルファベットを与える。さらに、二重結合の位置と配置はこの後に () をつけてその中に示す。この命名法によると、例えば piperine (1) は piperamide-A5:2 (*E,E*), guineensine (14) は piperamide-B13:3 (2*E*, 4*E*, 12*E*) となり、構造と名前が容易に対応する。

Chart 1 に示した数値はこれらのアミドのイヌ回虫幼虫に対する MLC であるが、ピペリジン及びピロリジンアミ

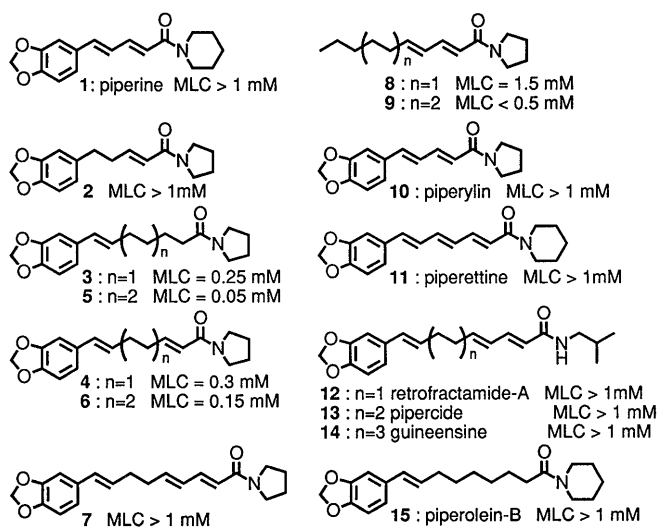


Chart 1. Amide Constituents Isolated from *Piper nigrum*

ドについて見ると、芳香環とアミン部の間の炭素の数と二重結合の数によって活性が大きく変わっている。この点については後で詳しく述べる。

一方、*N*-イソブチルアミド 12~14 はイヌ回虫幼虫には全く殺虫作用を示さなかった。宮門らは、13, 14 のような共役ジエン *N*-イソブチルアミド類がアズキゾウムシ (*Callosobruchus chinensis*) に対して強い殺虫作用を示すことを見だし、新しい殺虫剤のリードとして検討を行っている¹³⁾。これは著者らの結果ときわめて対照的であるが、対象としている生物の差と共に、アッセイ法の差の影響が大きいのではないかと考えている¹⁴⁾。

2. メース¹⁵⁾

メースはニクズク科のニクズク (*Myristica fragrans* Houtt.) の赤い網状の種皮を乾燥したものであり、肉類の風味付けに珍重されている。メースは多量の脂肪類を含んでいるが、これらは活性を示さず、活性はメタノールで効率よく抽出された。そこでメースをまずヘキサンで脱脂後、残渣をメタノールで抽出し、さらにこの抽出物をヘキサンで脱脂して活性フラクションを得た (Chart 3)。このフラクションに含まれる殺線虫活性物質はシリカゲルに対して不安定であったため、ポリアミドカラムによる精製を試みたところ、活性は酢酸エチル溶液からポリアミドゲルに吸着され、メタノールで溶出することにより効率よく精製できた。これを更に Sephadex LH-20 カラムに通し、ベンゼンから再結晶して、殺線虫活性物質を淡黄色プリズム晶として得た。

本化合物は各種スペクトルデータから既に *Myristica malabarica* LAM から得られているジアリールノナノイドの malabaricone C (16) であることがわかった。本化合物の MLC は 6~10 μ M で、著者らが天然から得ている殺線虫物質の中で最も強い活性を示すものの一つである。この化合物の二つの芳香環の間の炭素の数は9個で、コショウから単離したピペラミド類のうち最も強い殺線虫作用を示した PA-C9:1 (8*E*) (5) の炭素鎖と同じ長さであることは興味深い。

さらに二つの芳香環上の置換基を変えてその活性の変化を調べたところ (TABLE IV)¹⁶⁾、やはり天然物である

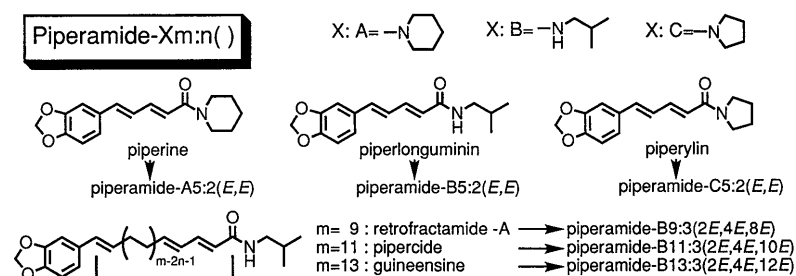


Chart 2. Systematic Nomenclature of Amide Constituents from Piperaceous Plants

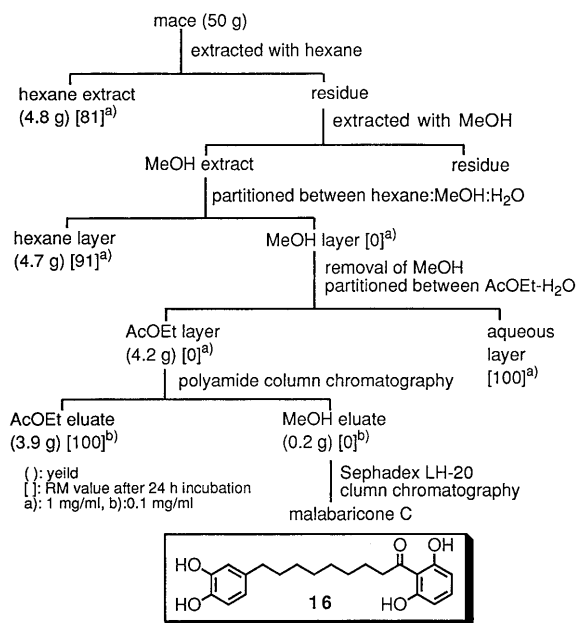


Chart 3. Isolation of the Nematocidal Principle from Mace

malabaricone A (17) が強い活性を示した。また、カテコール或いは *o*-ヒドロキシアセトフェノン構造は殺線虫活性には必ずしも必要ではなく、化合物 30 のような比較的単純な化合物も 16 に匹敵する活性を示すことがわかった。

3. ビンロウジ⁴⁾

ビンロウジはヤシ科のアレカヤシ (*Areca catechu* L.) の種子である。ビンロウジは漢方では駆虫の目的で使う生薬であるが、東南アジア地域では咀嚼嗜好料として広く用いられている。すなわち、ビンロウジの切片に少量の石灰

TABLE IV. Nematocidal Activity of Malabaricone Analogs

Comp.	Ar ₁	Ar ₂	MLC (μM)	Comp.	Ar ₁	Ar ₂	MLC (μM)
16			6-10	24			>300
17			5	25			<300
18			25	26			31
19			20	27			53
20			100-300	28			>300
21			>300	29			124
22			>300	30			8
23			>300	31			>300

を加え、さらに葉タバコや時としてはカルダモン、チョウジ等の香料を添えてキンマ (*Piper betle* L.) の葉に包んで嚙む、いわゆる betel chewing の風習である。

ビンロウジの駆虫作用は主にアルカロイドのアレコリンによるものとされている。しかし、ビンロウジの熱水抽出エキスにはあまり強い殺線虫活性はなく、50%アセトンエキスが強い活性を示し、同時に Fig. 2a のような特徴的な虫体破裂作用が見られた。

この 50%アセトンエキスを定法に従って酸、塩基によって分画したところ、酸性部と塩基性部に活性が見られた。しかし、塩基性部の活性は酸性部に比べて弱く、得られた量も酸性部の 10 分の 1 にすぎなかった。また、酸性部の

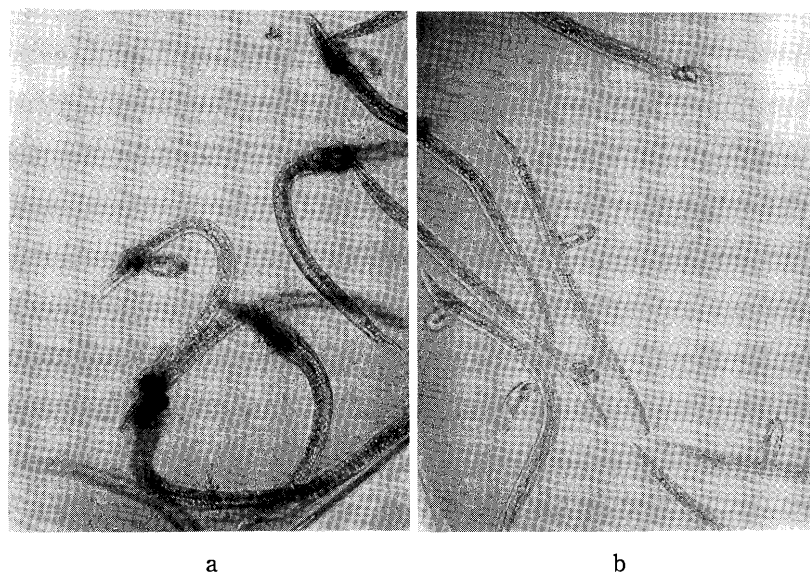


Fig. 2. Burst of Larvae Caused by Tannin and Essential Oil

a. Tannin-burst caused by tannic acid (0.1 mg/ml) + decanoic acid (0.1 mg/ml). b. ES-burst caused by citral (0.1 mg/ml).

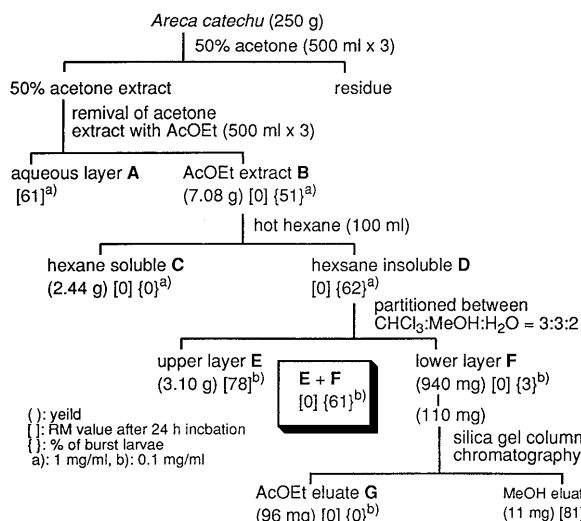


Chart 4. Fractionation of the Nematocidal Principle of *Areca catechu*

みに虫体破裂作用が見られたことから、ビンロウジの殺線虫作用は主としてこの酸性部によるものと考えられた。

殺線虫活性物質は酢酸エチルに可溶であり、ヘキサンにも一部可溶であった (Chart 4)。しかし虫体破裂作用はヘキサン不溶部 (D) のみに見られたので、このフラクションをさらに親水性部 (E) と疎水性部 (F) に分画したところ、殺線虫活性は疎水性部 (F) にのみ見られ、虫体破裂作用はほとんど消失してしまった。しかし、この二つのフラクションを等量ずつ混合すると、殺線虫作用を示すと同時に虫体破裂作用も現れた。このことから親水性部 (E) には、それ自身は殺線虫作用を持たないが、殺線虫成分と組み合わせると虫体破裂作用を引き起こす成分が存在すると考えられた。この虫体破裂成分は縮合型タンニン類であったが、これについては後で述べる。

さて、殺線虫成分であるが、殺線虫作用を示したフラクション C と F は、いずれも直鎖脂肪酸の混合物と思われる。そこでこれらをメチルエステルとして、GC-MS で分析したところ、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸の混合物であった。そこでこれらの直鎖脂肪酸及び脂肪酸アルコールの殺線虫作用を調べたところ、メチレン鎖の長さによって活性が大きく異なり、脂肪酸の場合鎖の長さが長くなるに従って活性が強くなり、ラウリン酸 (炭素数 12) が $MLC=150\ \mu M$ で最も強く、炭素数 13 以上では活性は減少した。一方直鎖脂肪酸アルコールでは活性の変化が急激で、テトラデカノールが $MLC=20\ \mu M$ で最も活性が強く、ペンタデカノールになると $1\ mM$ でも活性を示さなかった。

ビンロウジはラウリン酸、ミリスチン酸等の脂肪酸類及びタンニン類を大量に含んでいる。後で述べるように、これらの組み合わせは脂肪酸の殺線虫作用を増強し、虫体の破裂を引き起こす。従って、ビンロウジを噛む習慣は、衛

生状態が悪く寄生虫の感染の危険性の高い東南アジア地域において、寄生虫症の予防に少なからぬ役割を果たしているものと考えられる。

上記の他に、*Tephrosia purpurea* PERS. からロテノイドを¹⁷⁾、カンゾウからフラボノイドを¹⁸⁾、山奈 (*Kaempferia galanga* L.) からケイヒ酸誘導体を¹⁹⁾、オールスパイス (*Pimenta dioica* L.) から eugenol, methyleugenol を⁵⁾、ローレル (*Laurus nobilis* L.) から verlotorin, santamarin 等のセスキテルペノイドを⁵⁾、*Alpinia galanga* SWARTZ から [S]-1'-acetoxychavicol acetate を⁸⁾、"Oakmoss Absolute" からは ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate 誘導体を²⁰⁾ 各々活性物質として単離した。

IV. 長鎖アルキルアミド類の殺線虫活性

先に述べたようにピペラミド類ではアミン部の種類、アルキル鎖の長さ及び二重結合の数により殺線虫活性が大きく異なっていた。そこでまず、アルキル鎖の長さを変えた飽和ピロリジンアミド (PA-Cm:0) を種々合成し、その活性を比較した²¹⁾。その結果、 $m=11$ が最も殺線虫活性が強いことがわかった。また、アミン部を *N*-メチルピペラジンに変えた非天然型ピペラミド (PA-Mm:0) では、 $m=13$ の活性が最も強く、 $MLC=25\ \mu M$ であった。

既に述べたように、ビンロウジの殺線虫活性成分は長鎖脂肪酸であり、またコショウからは長鎖のアルキルアミドも殺線虫活性成分として得られている。そこで、長いアルキル鎖を持つアミド化合物を種々合成し、殺線虫作用を検討した²²⁾。まずアミン部についてみると、1級アミンのアミドは全く活性を示さず、小さなアルキル置換基を持つ2級アミン、特に環状アミンのアミドに強い活性が見られた。そして活性の強さはアゼチジン (AZ) > ピロリジン (PR) > ピペリジン (PP) > ヘキサメチレンイミン (HI) の順で、アミン部の環が小さいほど活性が強かった。更に各アミドの同族体で最も強い活性を示すもののアルキル鎖の長さは AZ で C14, PR で C12~C13, PP で C12, そして HI では C10 と、環が大きくなるほど短くなっていた。またモルホリン (MO) や *N*-メチルピペラジン (MP) のようにヘテロ原子を含み極性の大きい環状アミンのアミドは C14~C16 と長い側鎖を持つものが最大活性を示した。

これらの結果から、このようなアミドの殺線虫活性には分子全体としての親水性と疎水性のバランスが重要であると考えられた。そこで化合物の疎水性と生物活性との関係を解析するのによく用いられている Kubinyi の bilinear model²³⁾ を用い、疎水性パラメーターとして逆相 HPLC での保持容量 ($\log V_R$) を使ってこの結果を解析した。その結果 Fig. 3 に示すように AZ, PR, PP 等の中性化合物では、最も強い活性を示す疎水性がほぼ同じ範囲にあったが、塩基性を有する MP や *N*-メチルホモピペラジン

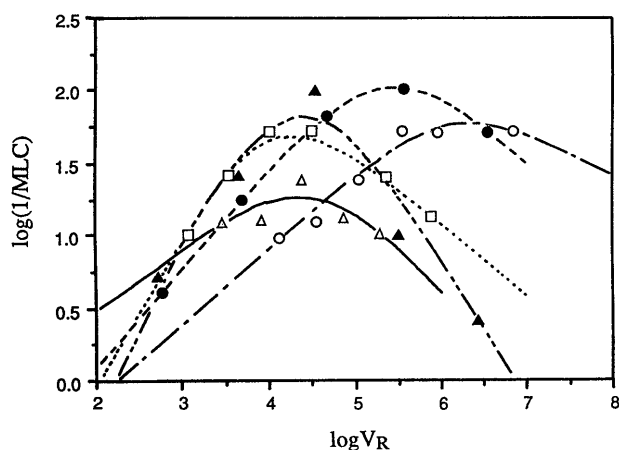


Fig. 3. Bilinear Model Analyses of the Relationship between Nematocidal Activity and Hydrophobic Parameter

▲, azetidine homologues; △, pyrrolidine homologues; □, piperidine homologues; ●, *N*-methylpiperazine homologues; ○, *N*-methylhomopiperazine homologues.

(HM) ではこれより更に疎水性の大きなところで最大活性を示すことがわかった。

V. 活性成分間の共同作用

漢方の特色は、いくつかの生薬を組み合わせることにより、いくつかの成分が協力的に働いて単味の生薬よりも優れた薬効を示す点にある。著者らは、イヌ回虫幼虫に対する殺線虫作用を指標として活性物質の単離を行ってきたが、一つの天然薬物であってもそのエキスは多数の成分の混合物であるため、成分間の協力作用は当然考えられる。先に述べたビンロウジの脂肪酸とタンニン類との作用がまさにその例であるが、ウコン（ターメリック）の殺線虫成分において成分間の協力作用が顕著に見られた²⁴⁾。

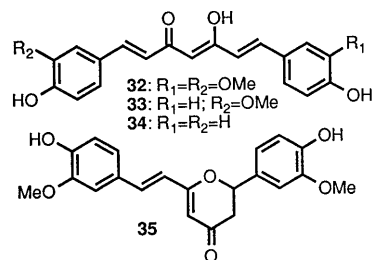
ターメリックはショウガ科のウコン (*Curcuma longa* L.) の根茎で、カレー料理にはなくてはならないスパイスである。ターメリックの殺線虫物質はクロロホルム、メタノールで効率よく抽出され、黄色色素成分である curcumin (32), demethoxycurcumin (33), bisdemethoxycurcumin (34) を含むフラクションに見られた。そこでこれらのクルクミノイド及び cyclocurcumin (35) と命名した微量成分をこのフラクションから単離してその活性を調べたが、単独では全く活性を示さなかった。しかし、これらを等量ずつ混合すると殺虫活性が現れ、特に 33 と 34 の組み合わせを含むものの活性が強かった (TABLE V)。

これらのクルクミノイドは水に溶け難く、アッセイ中に結晶が析出してきてしまう。化合物の組み合わせにより各成分の溶解度が増し、クルクミノイド全体としての濃度が上昇することが考えられたので、各成分の溶解度を測定した。化合物の混合により、確かにクルクミノイド全体とし

TABLE V. Nematocidal Activity of Curcuminoids and Their Combinations

Sample	RM value ^{a)}	
	6 h	24 h
Curcumin (32)	100	100
Demethoxycurcumin (33)	100	100
Bisdemethoxycurcumin (34)	100	100
Cyclocurcumin (35)	100	100
32+33 (1:1)	93	33
32+34 (1:1)	67	23
32+35 (1:1)	98	98
33+34 (1:1)	15	0
33+35 (1:1)	96	42
34+35 (1:1)	96	96
32+33+34 (1:1:1)	9	0
32+33+35 (1:1:1)	98	70
32+34+35 (1:1:1)	72	45
33+34+35 (1:1:1)	11	0
32+33+34+35 (1:1:1:1)	10	0

^{a)} 1 mg/ml.



での溶解度は上昇したが、顕著な殺虫活性の上昇を説明できるものではなく、実際活性のある組み合わせでも析出した結晶の部分を濾過した濾液には活性は見られなかった。

現在のところクルクミノイドの組み合わせによりどうして殺線虫活性が現れるかは不明である。このような成分間の協力作用は、生薬ひいては漢方処方薬の有効性を考える上で避けて通ることの出来ない問題であり、このような多成分系の解析が今後の課題である。

VI. 虫体破裂（バースト）作用

1. タンニン類による虫体破裂作用²⁵⁾

先に述べたように、タンニン類はそれ自体には殺線虫作用はないが、殺線虫活性物質と組み合わせることにより、特徴的な虫体破裂作用を示す (Fig. 2a)。タンニンは、カテキン、エピカテキンの脱水縮合体である縮合型タンニンと、糖類に没食子酸やヘキサヒドロキシジフェン酸等がエステル結合した加水分解型タンニンの二つに大別されるが、虫体破裂作用はどちらのタイプのタンニンにも見られた。TABLE VI にはガロイルグルコース類の虫体破裂活性を示したが、トリガロイル体までは活性を示さず、テトラガロイル体で初めて活性が現れた。そしてガロイル基の数が増えるほど活性が強くなり、デカガロイル体では90%の幼虫を破裂させた。また、ポリガロイルグルコースの混合物

TABLE VI. Bursting Activity of Galloylglucoses

Compound	RM24 ^{a)}	Burst % ^{b)}	Compound	RM24 ^{a)}	Burst % ^{b)}
Gallic acid	100	0	1,2,4,6-tetra-	—	24
Galloylglucoses			1,2,3,4,6-penta-	—	36
1-mono-	—	0	hexa-	—	62
6-mono-	—	0	hepta-	—	68
1,6-di-	—	0	octa-	—	70
1,2,6-tri-	—	0	nona-	—	84
1,4,6-tri-	—	0	deca-	—	90
1,2,3,6-tetra-	—	20	Tannic acid	85	83

^{a)} RM value after 24 h incubation at a sample concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$.

^{b)} Burst % was determined at 100 $\mu\text{g/ml}$ of the sample with 100 $\mu\text{g/ml}$ of decanoic acid after 24 h of incubation. Under these conditions, the RM value was 0 for all runs.

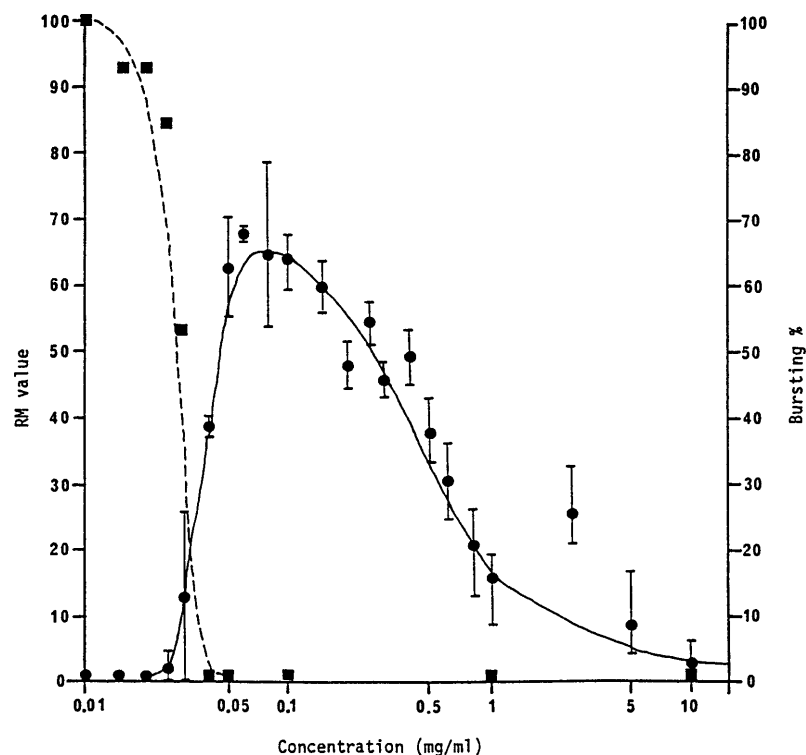


Fig. 4. Concentration Dependence of Bursting Activity of Citral

■, RM value; ●, bursting %.

であるタンニン酸は、強い虫体破裂作用を示すだけでなく、殺線虫物質であるデカン酸の殺線虫活性を約2倍に増強した。一方縮合型タンニンにおいても、カテキン単位がC4-C8結合したものではトリマーまではほとんど虫体破裂作用を示さず、テトラマー以上に強い作用が見られた。また、カテキン単位の結合様式によっても活性が異なり、C4-C6結合を含む化合物の方がC4-C8結合のみの化合物より強い活性を示した。

タンニン類はどのような殺線虫物質と組み合わせても虫体破裂作用を示すわけではなく、脂肪酸、アルコール、フェニルプロパノイド等との組み合わせではバーストを起こすが、強力な殺線虫物質であるテトラデカノイルピロリジンとの組み合わせではバースト率は低かった。

2. 精油成分による虫体破裂作用 (ES-バースト)⁶⁾

虫体破裂作用は、精油成分によっても引き起こされる。この場合、タンニンによるものとは異なり、他の殺線虫成分の共存を必要としない。すなわち精油成分自身が殺虫成分でありかつ虫体破裂活性成分である。また、バーストの様子もタンニン類の場合とは異なり、不規則な位置でキューティクルが膨れて破裂する (Fig. 2b)。Citralは単独で虫体破裂作用を示す代表的な精油成分であるが、Fig. 4に示すように MLC より少し高い濃度で最も強い虫体破裂作用を示す。

また、ペリラオイルやネロリオイルでは複数の成分による虫体破裂作用の増強が見られた。例えば、ペリラオイルの主成分は perilla aldehyde でありこれが殺線虫作用及び

バースト作用の活性成分となっているが, perilla aldehyde 単独のバースト活性は, ペリラオイルそのものよりもはるかに低い. そこでペリラオイル中に共存している他の成分と perilla aldehyde の組み合わせを種々検討した結果, 殺線虫作用もバースト作用も持たない limonene がバースト作用を大幅に増強していることがわかった.

バーストが起こるメカニズムは今のところわかっていないが, この過程には複数の作用点に関与しているものと考えられる. 虫体が破裂すること自体, 殺虫という観点から興味ある現象であるが, その発現する過程は自然が用意した化合物の組み合わせの妙と言うべきもので, 天然薬物の有効性を考える上でも非常に興味深い.

終 わ り に

本研究は, 組織内寄生虫症に有効な薬物の開発をめざして開始したものであるが, 実際に幼虫移行症の薬となり得るような物質は今のところ得られていない. しかし, この研究の中から得られたアミド系の化合物の中には, 線虫のみならず昆虫に対する殺虫作用や抗菌性の他, 血液機能の修飾やガン細胞に対する細胞毒性を示すものなど, 様々な生物活性を持つものが見いだされている.

生物活性を指向した天然物の探索研究が盛んになって久しい. 世界各地に伝わる伝統薬物は, 人類がその長い歴史の中で自然界から選り出してきたものであり, いわば人体による1次スクリーニングを通過した生物活性物質の宝庫である. 現在製薬企業等でも, エイズ, ガン, 心血管系疾患など様々な疾病をターゲットとしたアッセイ系を用いて天然薬物のスクリーニングを行っているが, 医学, 生化学分野での進歩を取り入れた新たなアッセイ系を考案することにより, 更に新たな薬のリードとなる活性物質を見いだし得るものと思う. 遺伝子工学の進歩により, 微生物や植物に文字通り望みとする化合物を「作らせる」ことが夢ではなくなりつつある昨今ではあるが, 新しい生物活性物質あるいは既知化合物の新しい生物活性を見いだそうとする努力の重要性は今後とも変わることはないと信じている.

謝 辞: 本研究を終始強力にバックアップし, 適切なお助言とご鞭撻を賜りました, 金沢大学薬学部 津田喜典教授に心から感謝いたします. 本研究は, 金沢大学薬学部生薬学教室において行われたものであり, 中村憲夫博士をはじめとする教室内外の多くの共同研究者の方々の熱意と努力によってなされたものです. また, イヌ回虫幼虫の培養に関しては, 金沢大学医学部寄生虫学教室の近藤力王至助教授, 赤尾信明講師をはじめとする教室員の皆様に終始お世話になりました. 厚くお礼申し上げます.

本研究の一部は, 文部省科学研究費補助金, 医薬資源研究振

興会, 山崎香辛料振興財団, 金沢大学薬学部浅野奨学金の援助を受けました. ここに感謝の意を表します.

最後に, 生物活性天然物化学の世界に私を導いてくださいました, 恩師三川潮教授に深く感謝いたします.

引用文献および注

- 1) a) P. C. Beaver, R. C. Jung, E. W. Cupp, "Clinical Parasitology," 9th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1984, p. 325; b) L. T. Glickman, P. M. Schantz, *Epidemiologic Rev.*, **3**, 230 (1981); c) 近藤力王至, 赤尾信明, 大山卓昭, 岡田 茂, 小西喜彦, 高倉吉正, 岡沢孝雄, 高橋あけみ, 畑 直宏, *臨床獣医*, **12**, 77 (1994).
- 2) D. E. Moorhouse, *Med. J. Aust.*, **1982**, 172.
- 3) 近藤力王至, 赤尾信明, 大山卓昭, 岡沢孝雄, *小児科*, **35**, 48 (1994).
- 4) F. Kiuchi, N. Miyashita, Y. Tsuda, K. Kondo, H. Yoshimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2880 (1987).
- 5) F. Kiuchi, N. Nakamura, N. Miyashita, S. Nishizawa, Y. Tsuda, K. Kondo, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 279 (1989).
- 6) N. Nakamura, F. Kiuchi, Y. Tsuda, K. Kondo, T. Sato, *Shoyakugaku Zasshi*, **44**, 183 (1990).
- 7) F. Kiuchi, M. Hioki, N. Nakamura, N. Miyashita, Y. Tsuda, K. Kondo, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 288 (1989).
- 8) F. Kiuchi, M. Hayashi, N. Nakamura, M. Mikage, Y. Tsuda, K. Kondo, T. Namba, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 294 (1989).
- 9) F. Kiuchi, N. Koshimaru, Y. Tsuda, K. Kondo, M. Tabata, G. Honda, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 353 (1989).
- 10) M. A. Ali, M. Mikage, F. Kiuchi, Y. Tsuda, K. Kondo, *Shoyakugaku Zasshi*, **45**, 206 (1991).
- 11) 未発表データ.
- 12) F. Kiuchi, N. Nakamura, Y. Tsuda, K. Kondo, H. Yoshimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2452 (1988).
- 13) M. Miyakado, I. Nakamura, N. Ohno, *ACS Symp. Ser.*, **387**, 173 (1989).
- 14) 著者らは検体を水溶液としてアッセイを行っているのに対し, 宮門らは有機溶媒に溶かした検体を昆虫に直接塗布している.
- 15) N. Nakamura, F. Kiuchi, Y. Tsuda, K. Kondo, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2685 (1988).
- 16) 未発表データ.
- 17) F. Kiuchi, X. Chen, Y. Tsuda, K. Kondo, V. Kumar, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 42 (1989).
- 18) F. Kiuchi, X. Chen, Y. Tsuda, *Heterocycles*, **31**, 629 (1990).
- 19) F. Kiuchi, N. Nakamura, Y. Tsuda, K. Kondo, H. Yoshimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 412 (1988).
- 20) A. M. Ahad, Y. Goto, F. Kiuchi, Y. Tsuda, K. Kondo, T. Sato, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1043 (1991).
- 21) 未発表データ.
- 22) F. Kiuchi, S. Nishizawa, H. Kawanishi, S. Kinoshita, H. Ohsima, A. Uchitani, N. Sekino, M. Ishida, K. Kondo, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3234 (1992).
- 23) H. Kubinyi, *Arzneim.-Forsch.*, **26**, 1991 (1976).
- 24) F. Kiuchi, Y. Goto, N. Sugimoto, N. Akao, K. Kondo, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1640 (1993).
- 25) F. Kiuchi, Y. Tsuda, K. Kondo, H. Yoshimura, I. Nishioka, G. Nonaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1796 (1988).