

学位論文題名

Studies on Antitrypanosomal Activity of Medicinal Plants

(薬用植物の抗トリパノソーマ活性に関する研究)

学位論文内容の要旨

*Trypanosoma evansi*はトリパノソーマ科の鞭毛虫であり、ウマ、ラクダ、ウシ、スイギュウ、ヤギ、ヒツジ、ブタなどの血液中で増殖し、スーラとして知られるトリパノソーマ症を引き起こす。本疾病は吸血昆虫、とくにアブ (*Tabanus* spp.) やサシバエ (*Stomoxys* spp.)によって機械的に伝播されるため世界的に蔓延しており、アフリカ、アジアおよび南アメリカにおいては大きな経済的損失をもたらしている。本症の治療に用いるおもな薬剤はdiminazene aceturate、suraminおよびquinapyramineであるが、これら既存の抗トリパノソーマ薬は副作用が大きな問題となっており、また、薬剤耐性株の出現が多くの地域で報告されている。このことから、ヒトのトリパノソーマ症である睡眠病やウシのナガナ病と同様に、スーラの治療に向けた新たな化合物の研究は、緊急かつ重要な課題である。

植物由来の天然化合物はこれまで新薬開発の重要な資源となってきた。薬用植物の1つである*Brucea javanica*は多種類のクアシノイドを含むが、これは多くの熱帯性ニガキ科植物において見いだされる苦味成分である。第一章では、カラムクロマトグラフィー、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC)、質量分析 (MS/MS) および磁気共鳴法を用いて、*B. javanica*に含まれるクアシノイドの種類と各含有量を解析した。筆者らのグループはこれまでの研究において、bruceine A、bruceine B、bruceine C、bruceine D、bruceantanol、bruceantanol B、bruceine Jおよびyadanziolide AなどのC-20型クアシノイドをインドネシア産材料の抽出有機層から分離・精製したこと、また、brusatol、bruceantin、dehydrobruceine A、dehydrobruceine B、dehydrobrusatol、bruceoside Aおよびyadanzioside Gを中国産材料の有機層から分離したことを報告してきた。本研究においては、インドネシア産の本植物乾燥果実を70%メタノールで処理したのち、酢酸エチルを用いて水層と有機層に分離したが、水層にbruceine Dが含まれていることを初めて見出した。次に、これらの分離・精製したクアシノイド類を標準化合物として、UPLC-MS/MSを用いたクアシノイド迅速定量法を開発し、*B. javanica*のメタノール粗抽出液中に含まれるクアシノイド類の含有量の評価を行った。その結果、各種クアシノイドの含有量は*B. javanica*の産地によって異なること明らかとなり、同種植物のクアシノイド類の組成と成分含有量は地理的要因、薬用植物の収穫時期などに依存している可能性が示唆された。本迅速定量法は、未精製の植物抽出液からのクアシノイド類やその他の生理活性物

質の検出と定量的スクリーニングに有用であると考えられる。今後は、有効成分を大量に分離するための簡便かつ安価な手法の開発研究が必要である。

*Brucea javanica*より分離されたクアシノイド類は、その種類に応じて *Plasmodium falciparum*、*Entamoeba histolytica*、*Giardia intestinalis*、*Toxoplasma gondii*、*Babesia gibsoni*などの原虫類の増殖を阻害することが知られている。第二章においては、クアシノイド化合物の *T. evansi*の血流型虫体に対する *in vitro*における増殖阻害活性と化合物構造との相関について検討した。また、クアシノイド類のヒト肺線維芽細胞 (MRC-5) に対する細胞毒性を測定した。その結果、15種類のC-20型クアシノイドのうち、bruceine A、bruceantinol、bruceine C、brusatolおよびbruceine Bは2.9 nMから17.8 nMの範囲の50%増殖阻止濃度 (IC₅₀) を示し、強い抗トリパノソーマ活性を示すことが明らかになった。これらの活性は、diminazene aceturate (IC₅₀ = 8.8 nM) や suramin (IC₅₀ = 43.2 nM) に匹敵するものであった。一方、dehydrobruceine A、dehydrobruceine Bおよびdehydrobrusatolは、bruceine A、bruceine Bおよびbrusatolと比較して、各々約2100倍、900倍、1200倍活性が低く、構造-活性相関解析の結果から、C-15側鎖の性状とAリングのジオスフェノールの存在がクアシノイドの抗トリパノソーマ活性に重要であることが示唆された。また、bruceine A、B、CおよびDの抗トリパノソーマ活性のMRC-5細胞に対する選択指数 (SI) は1900から4200の範囲であり、これらのクアシノイド類の細胞毒性は比較的低いことが示された。

薬用植物 *Brucea javanica*の果実より分離されたクアシノイド類が抗バベシア活性ならびに抗トリパノソーマ活性を有するという発見は、家畜における原虫疾病に対する薬用植物抽出物の有用性を示唆している。豊富な植物資源を有するミャンマーでは、長い歴史の中で薬用植物による独自の伝承医薬療法が発達している。第三章では、ミャンマーの薬用植物の中から抗トリパノソーマ活性を有する植物を探索した。60種類の薬用植物より得られた55種類の新鮮材料と16種類の乾燥材料について、それぞれ70%エタノールと70%メタノールで粗成分を抽出し、*T. evansi*に対する *in vitro*における増殖阻害活性とMRC-5細胞に対する細胞毒性を測定した。その結果、本スクリーニング法において、3つの新鮮材料と6つの乾燥材料の粗抽出液が *T. evansi*に対して100 µg/ml未満のIC₅₀値を示したことから、これら9種の薬用植物を活性成分の分離・精製を実施する候補薬用植物として選出した。とくに、*Vitis repens*、*Eucalyptus globulus*そして *Jatropha podagrica*は高い抗トリパノソーマ活性と選択指数を示し、その有望性が示唆された。結論として、ミャンマーにおいて、マラリア、赤痢、腫瘍及び肺疾患などの様々な疾患の治療に使用されているいくつかの薬用植物は、*T. evansi*感染の治療薬としての潜在的有用性をもつことが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 倉 賢
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 教 授 杉 本 千 尋
副 査 准教授 奥 祐三郎

学位論文題名

Studies on Antitrypanosomal Activity of Medicinal Plants

(薬用植物の抗トリパノソーマ活性に関する研究)

*Trypanosoma evansi*はトリパノソーマ科の鞭毛虫で、アブなどの吸血昆虫によって機械的に伝播されるため世界的に蔓延し、多種動物においてスーラとして知られる消耗性疾患を引き起こす。既存の抗トリパノソーマ薬は副作用や薬剤耐性株の出現が問題となっており、スーラの治療薬開発は重要である。本研究では、植物由来天然化合物がマラリア治療の中心的役割を果たしていることを踏まえ、薬用植物から抽出したクアシノイド化合物の抗トリパノソーマ活性について検討し、また、ミャンマー産薬用植物の中から本活性を有する植物を新たに探索した。

ニガキ科植物に含有される苦味成分であるクアシノイド化合物は、マラリア原虫やバベシアなどの原虫類の増殖を阻害することが知られている。本研究では、クアシノイド化合物の*T. evansi*の血流型虫体に対する*in vitro*における増殖阻害活性と二倍体ヒト線維芽細胞に対する細胞毒性を測定した。その結果、15種類のC-20型クアシノイド化合物のうち、bruceine A、bruceine B、bruceine C、bruceantinolおよびbrusatolは、既存の治療薬に匹敵する強い抗トリパノソーマ活性を有すること、また、クアシノイドの化学構造と活性には相関があることが示された。なお、検査したクアシノイド化合物の細胞毒性は比較的低いものであった。

豊富な植物資源を有するミャンマーでは独自の伝承医薬療法が発達している。そこで、60種のミャンマー産薬用植物より得られた71種類のアルコール粗抽出物について、抗トリパノソーマ活性と細胞毒性を測定した。その結果、9種の薬用植物が潜在的有用性をもつ候補植物として選出された。

本研究は、薬用植物由来の天然化合物が*T. evansi*の増殖阻害活性をもつことを示したものであり、トリパノソーマ症治療薬開発に向けての有用な情報を提供している。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者ソウ ボン君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。