

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21550161

研究課題名（和文）：南方系薬用植物に含まれるシガテラ毒解毒活性物質の構造と機能に関する研究

研究課題名（英文）：Exploration of new antitoxic compounds neutralizing ciguatera fish poisoning from some southern medicinal plants

研究代表者：濱田 季之 (HAMADA TOSHIYUKI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：40321799

研究成果の概要（和文）：

世界中で年間2万人以上の中毒患者を出すシガテラ毒中毒の治療法は、症状の一時的緩和を目的とした伝承植物の使用のみであり、化合物レベルでの治療薬は存在していない。我々は、これまでの報告で知られている31種のシガテラ毒伝承植物のうち、5種類の植物から、CTX/BTXによるNaチャンネル開放の抑制活性を指標にして、数種のシガテラ毒解毒作用を示す伝承薬用植物からのシガテラ毒解毒物質を探索した。

研究成果の概要（英文）：

Ciguatera fish poisoning (CFP) is an ichthyosarcotism caused by the consumption of tropical and subtropical coral fish contaminated with toxic polyether compounds, ciguatoxins (CTXs) and maitotoxin (MTX). Garrec et al. have reported that the extracts of some southern medicinal plants, traditionally used to treat CFP, to prevent *in vitro* neurotoxicity produced by CTX or brevetoxin (BTX). Here, we studied new CFP antitoxic compounds isolated from various southern medicinal plants by using *in vitro* neurotoxicity assay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：シガテラ毒解毒活性、化学構造、NMR(核磁気共鳴)法、薬用植物

1. 研究開始当初の背景

シガテラ (Ciguatera) 中毒とは、海藻に付着する底性渦鞭毛藻の一種 *Gambierdiscus toxicus* が生産する ciguatoxin (CTX; 図1上) や maitotoxin (MTX) などの毒性ポリエーテル化合物を体内に蓄積した熱帯産魚類を摂取することで引き起こされる世界最大規模の食中毒である¹⁾⁻³⁾。死亡率は低いもの

の、下痢や吐き気、筋肉痛、激しいかゆみに襲われる。また、ドライアイス・センサーション (冷たいものを触れたり、食べたりすると激しく痛む) を発症することもある。世界中で年間2万人から6万人の中毒患者を出しながら、このシガテラ中毒の治療法は、症状の一時的緩和を目的とした伝承植物の使用のみであり、「化合物レベルでの治療薬」は

存在していない。

CTXは、Naチャンネルを過剰開放することにより、細胞のイオンバランスを壊し、細胞を死滅させる。Naチャンネル上のCTX結合部位は5番目の膜貫通ドメインの3番目のhelixに位置する³⁾。CTXと同様の活性(Naチャンネル過剰開放や細胞毒性など)を有する赤潮毒のbrevetoxin(BTX; 図1下)もチャンネル上のCTXと同じ結合部位に結合する。また、CTX/BTXと同様にNaチャンネル過剰開放を促すveratridineやフグ毒として知られているNaチャンネルブロッカー、tetrodotoxinは、CTX/BTXと併用することで、Naチャンネルへの作用が増大したり減少したりするが、イオンチャンネルの立体構造上でも非常に近い部位に結合する。今日まで、シガテラ中毒の原因物質(CTX)については様々な誘導体が化学合成され、その作用機序も明らかにされつつある。しかしながら、シガテラが知られるようになってから4世紀以上、村田、安元らによりCTXの化学構造が決定して⁴⁾から20年以上もの時を経ても、その有効な治療薬(解毒物質)を見つけるに至っていない。

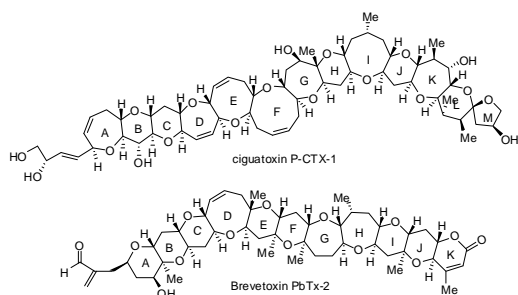


図1. ciguatoxin (CTX) と brevetoxin (BTX)の化学構造

シガテラ中毒の薬剤開発の遅れを招いたさまざまな理由の中で、(1) Naチャンネルの過剰開放を抑制する物質を探索するための(希少物質であるCTXやBTXを用いた)アッセイ系の確立が困難であったこと、(2) シガテラを解毒するとされる伝承薬用植物が、「CTX/BTXによるNaチャンネル過剰開放を直接的もしくは間接的に抑制することで、解毒している」という確証が得られていなかったことの2点が、大きな障壁となった。Mangerらは、マウス神経芽細胞 Neuro-2aを用いた実験系で、veratridineとNa⁺/K⁺-ATPase阻害剤のouabain共存下、極微量のCTXやBTXを加えることで、その細胞のNaチャンネルの過剰開放を促し、細胞を死に至らしめることを報告した⁵⁾。この報告により、96 wellsマイクロプレートの1wellあたり、わずか1~2 pg量のCTXまたは2~3 ng量のBTXを用いることで活性試験できるようになった。さらに、2005年にGarrecらは、上記の安元ら

の方法を用いて、今回の私達の研究試料であるモンパノキを含めた31種類のシガテラの伝承薬用植物の抽出液がCTX/BTXにより誘発されるNaチャンネル過剰開放を抑えることを報告した⁶⁾。つまり、これら伝承植物には、CTX/BTXによるNaチャンネル過剰開放を抑える化学物質を含んでおり、その化学物質の働きによりシガテラを解毒するという確証を得たことになる。ここで、私達は鹿児島県以南に自生する南方系の薬用植物からシガテラを解毒する化学物質を探索することにした。

2. 研究の目的

本研究では、シガテラ毒治療薬の開発を目的とし、「CTX/BTXによるNaチャンネル開放の抑制活性」を指標にして、モンパノキなどのシガテラ解毒活性をもつ薬用植物の有機溶媒抽出物からの天然物化学的手法によるシガテラ毒解毒活性物質の単離および化学構造の決定を行うこととした。化合物レベルでの治療薬を開発することで、これまで専門家によるシガテラ毒含有の魚の選定や伝承植物による症状の緩和という手段でのみ対応していたシガテラ毒の予防・治療に対し、格段レベルの違う治療法が期待できる。本研究で、解毒物質を見つけ出し、化学構造を決めることができれば、その治療薬の作用メカニズムを解明するために、解毒活性物質を光アフィニティー標識誘導体に導き、Naチャンネル上の結合部位の同定や標的タンパク質の解明を試みたい。そして、最終的には副作用のないシガテラ毒治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

シガテラ解毒作用を持つと考えられている伝承薬用植物のうち、鹿児島以南に自生するモンパノキ(*Argusia Argentea*)とハマゴウ(*Vitex rotundifolia* Linne fil.)の2種類の植物の葉から、グンバイヒルガオの根から、パパイヤの雄花から、そして、キダチトウガラシの実から、それぞれ、図2に示す有機溶媒抽出及び二層分配を行い、活性の見た画分についてシガテラ解毒物質の探索を試みた。

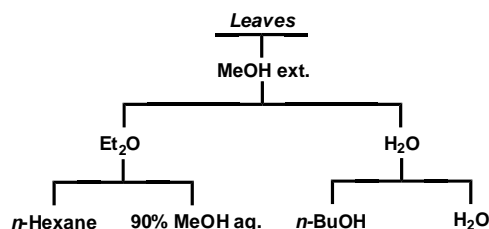


図2. 薬用植物の有機溶媒抽出及び二層分配

活性試験については、Mangerらが開発した

マウス神経芽細胞 Neuro-2a を用いた細胞増殖抑制活性試験⁵⁾の系を立ち上げた。発色試薬は WST-8 を用いた。活性試験に用いる CTX/BTX については、CTX-3C と BTX-B (PbTx-2) の 2 種を用いて、veratridine や ouabain の濃度条件と合わせて最適条件を検討した。その結果、veratridine 21 μ M、ouabain 210 μ M の条件下で brevetoxin BTX-B 120 nM の最終濃度で観測される細胞増殖抑制を薬用植物の抽出物がどの程度回復させるのかを活性の指標とした。

また、活性は示さないものの、興味深い化学構造をもつ化合物についても単離・構造決定した。

4. 研究成果

鹿児島県喜界島産モンパノキ 20 kg、鹿児島県いちき串木野市産ハマゴウ 10 kg、鹿児島県指宿産グンバイヒルガオの根 2.3 kg、奄美大島産パパイヤの雄花 0.14 kg、そして、沖縄県産キダチトウガラシの実 0.4 kg について、シガテラ毒解毒活性物質を探索した。植物をメタノール抽出した後、ヘキサン層、90%メタノール層、ブタノール層、水層の 4 つの層に分離した。4 つの層に対して、Neuro-2a を用いたシガテラ解毒活性試験を行なった。結果として、全ての植物で水溶性画分 (ブタノール層と水層) に活性が見られた。それに加えて、グンバイヒルガオ、パパイヤ、キダチトウガラシには、hexane 層にシガテラ解毒活性が見られた。キダチトウガラシにおいては、当初活性物質ではないかと考えていたカプサイシン類が含まれている 90%メタノール層は、かなり弱い活性しか示さないという結果であった。(表 1)

表 1 植物の二層分配抽出液の活性試験結果

◎とても強い、○強い、△弱い、
×活性なし、- 毒性のため未測定

二層分配抽出物	モンパノキ	ハマゴウ	グンバイヒルガオ	パパイヤの雄花	キダチトウガラシ
Hexane層	-	-	◎	○	◎
90%MeOH aq. 層	-	-	-	×	△
n-BuOH層	○	○	△	○	◎
H ₂ O層	○	○	○	○	○

活性を示した層については、それぞれフラッシュクロマトグラフィー、ゲルろ過、および逆相 HPLC を用いて解毒活性物質の分離・精製を試みた。得られた化合物については、主に NMR (核磁気共鳴) 法を用いて決定した。また、質量分析 (MS) 法、赤外吸収分光 (IR) 法、紫外吸収分光 (UV) 法なども NMR 法と相補的に用いることで最終の立体化学を含めた

化学構造を決定した。

モンパノキからは 13 種類の有機化合物を単離し、そのうち、5 種類の化合物にシガテラ毒解毒活性が見られた。5 種の活性物質のうち、3 種については化学構造を決定した。当初、3 つの糖が結合した化合物と推定したが、詳細な解析の結果、3 つの単糖、つまり、グルコースと鎖状と環状のフルクトースの混合物であることが分かった (図 3)。残る 2 つの化合物も NMR 解析により糖質であると考えられる。更に、活性は示さなかった化合物についても図 4 のように化学構造を決定した。

ハマゴウからは 7 種類の有機化合物を単離した。そのうち、シガテラ毒解毒活性を示す 2 種の化合物について構造決定したところ、図 5 に示すように、イリドイド配糖体の Agnuside と aucubin であることが分かった。また、パパイヤの雄花からも、解毒活性物質としてケルセチン配糖体の rutin と manghaslin の 2 種を単離・構造決定した。

グンバイヒルガオとキダチトウガラシについては、分離の途中段階であるが、NMR 解析から水溶性画分には糖類と思われるシグナルが見られている。解毒活性を示す hexane 層には多量の脂肪酸が含まれていることが分かっているが、今後、分離・精製を検討し、活性物質を探索する予定である。

上記の南日本に自生する 5 種類の南方系薬用植物についてシガテラ解毒活性物質を探索してきた。その結果、解毒活性をもつ糖質、配糖体を数種単離した。また、脂肪酸関連化合物も解毒活性をもつことが示唆された。糖質やイリドイド配糖体は、シガテラ解毒活性を示すが、効果 (作用機序) として浸透圧効果による細胞内の余分な水分排出を行い、一時的にはシガテラ中毒症状の緩和には有効であるが、イオンチャンネルおよびそれに結合したシガトキシンには直接は影響を与えておらず、シガテラ中毒の根本的な治癒には使えないと考える。本研究結果から、薬用植物のシガテラへの効果は、浸透圧効果による一時的なシガテラ中毒症状の緩和効果であると考えられるが、更に、引き続き、シガテラの特効薬開発を目指した研究を進めていく。

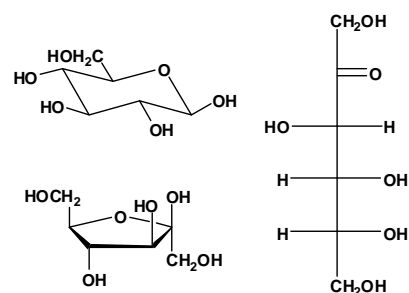


図 3. モンパノキ水溶性画分より単離・構造

決定したシガテラ解毒活性物質

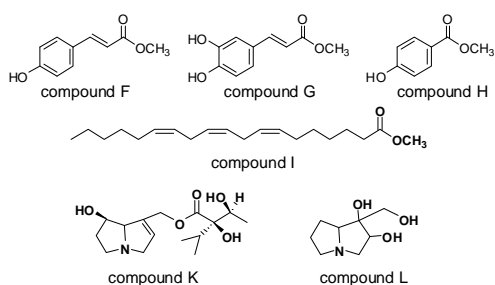


図 4. モンパノキ脂溶性画分より単離・構造決定した化合物

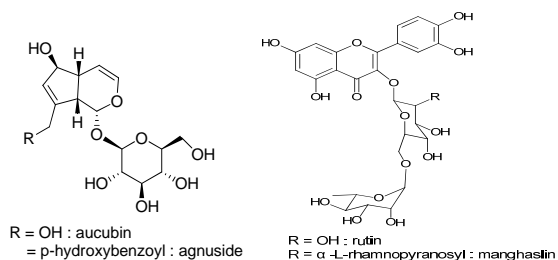


図 5. ハマゴウの葉およびパイヤ雄花の *n*-BuOH 抽出物より単離・構造決定した化合物

【参考文献】

- 1). Yasumoto, T.; Murata, M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1897-1909.
- 2). Yasumoto, T.; Satake, M. *J. Toxicol-Toxin Rev.* **1996**, *15*, 91-107.
- 3). Nicholson, G. M.; Lewis, R. J. *Marine Drugs* **2006**, *4*, 82-118.
- 4). Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8929-8931.
- 5). Manger, R. L.; Leja, L. S.; Lee, S. Y.; Hungerford, J. M.; Hokama, Y.; Dickey, R. W.; Granade, H. G.; Lewis, R.; Yasumoto, T.; Wekell, M. *J. AOAC. Int.* **1995**, *78*, 521-527.
- 6). Garrec, R. B.-L.; Benoit, E.; Sauviat, M.-P.; Lewis, R. J.; Molgo, J.; Laurent, D. *Toxicon* **2005**, *46*, 625-634.
- 7). Cloyd, J. C.; Snyder, B. D.; Cleeremans, B.; Bundlie, S. R. *J. Pharmacol. exp. Therap.* **1986**, *236*, 301-306.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

①濱田季之、平田美信、利光幸恵、鳥塚真璃亜、岡村浩昭、岩川哲夫、南方系薬用植物に含まれるシガテラ毒解毒活性物質の探索、第 52 回天然有機化合物討論会、2010 年 9 月 30 日、静岡

②平田美信、利光幸恵、鳥塚真璃亜、北村龍彦、岡村浩昭、岩川哲夫、濱田季之、南方系薬用植物に含まれるシガテラ毒解毒活性物質の探索研究、第 24 回海洋生物活性談話会、2010 年 6 月 5 日、広島

③利光 幸恵、濱田 季之、モンパノキ由来の「CTX/BTX による Na チャンネル開放」抑制物質、第 23 回海洋生物活性談話会、2009 年 5 月 23 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 季之 (HAMADA TOSHIYUKI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：40321799