

氏名 (本籍)	むら 村      た 田      きよ 清      し 志
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 2 5 4 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 薬学専攻
学位論文題目	常山の新規アルカロイドの構造とその主アルカロイド febrifugine の一酸化窒素 (NO) を介した抗マalaria作用に関する研究

(主 査)

論文審査委員	教授 大 島 吉 輝	教授 大 内 和 雄
		教授 大 泉 康

# 論文内容要旨

マラリア感染症は全世界の熱帯・亜熱帯地方を中心に流行するきわめて重大な寄生虫疾患であり、年間数億人が新たに罹患し、その犠牲者数は数百万人にも及んでいる。先進国においても、海外に渡航した人が帰国後発症する輸入感染症や地球温暖化によるマラリアを媒介するハマダラ蚊の生息地域の北上が危惧されている。これまで種々の抗マラリア剤が開発されているが、薬剤耐性の問題から新たな薬剤の開発および治療の戦略が望まれている。本研究では、漢方あるいは中医学において主に寄生虫の慢性消耗性疾患に対して用いられてきた生薬常山を研究対象とし、このものから新たな抗マラリア剤開発のためのリード化合物をマラリア原虫に対する毒性試験に基づいて検索した。さらに、宿主の免疫系の活性化が寄生虫の増殖を抑えるという報告があることから、近年、抗微生物・抗寄生虫作用に寄与すると報告されている生体内一酸化窒素 (NO) の作用に注目し、常山の抗マラリア作用との関連性を検討した。特に、常山の主活性成分 febrifugine によるマウスの腹腔マクロファージおよび血中の NO 産生増強効果に焦点を当てて研究を進めた。

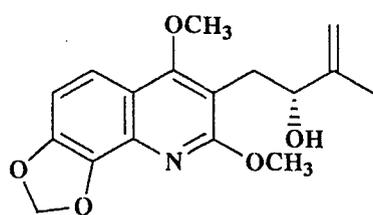
## (1) 各種生薬および活性生薬から単離された成分の原虫毒性スクリーニング

寄生虫疾患に対して用いられてきた生薬を中心として48種のメタノールエキスを熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対する原虫毒性とマウス乳癌細胞 (FM-3 A 細胞) に対する細胞毒性を検討し、各エキスのマラリア原虫に対する選択的な効果を算出した。その結果、13種の生薬エキスを原虫毒性が認められ、そのうち、現在の常山の基原植物であるジョウザンアジサイ (ユキノシタ科) のメタノールエキスとその含有成分である4-キナゾリノンアルカロイド類の febrifugine, isofebrifugine は強い殺マラリア原虫活性を示した。これらの物質の選択性 (230~670倍) は対照化合物として用いた chloroquine や quinine の値 (各々1780, 910倍) には及ばないものの、マラリア原虫に高い選択性をもって作用する。一方、ジョウザンアジサイ以外の常山の基原植物として使われていたコクサギ (ミカン科) のメタノールエキスと、そこに含有されるキノリン系アルカロイド類の *N-methylatanine*, 4-*O*-methylbalfourodinium chloride にも緩和な活性が認められた。1994年に L. K. Basco らはアクリドン系アルカロイドとフラノキノリン系アルカロイドの緩和な殺マラリア原虫活性を報告しており、今回の結果はこれらの系統の化合物の多くが殺マラリア原虫活性を示す可能性を示唆する。

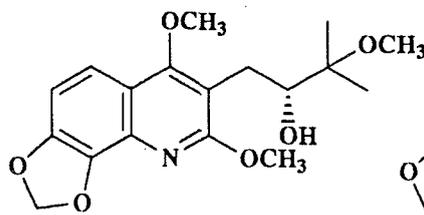
## (2) 常山の新規アルカロイドの構造

コクサギから3種のアルカロイド、(+)-isoptelefolidine, 3'-*O*-methylorixine, 3'-*O*-acetylisopteleflorine を単離し、それらはイソプレン側鎖を有する新規キノリン系アルカロイドであることを明らかにした。ところで、(-)-preorixine は、今回単離した (+)-orixine やフラノキノリンの skimmianine あるいはピラノキノリンの *N*-methylflindersine 等のキノリン系アルカロイドの生合成前駆体と考えられる。(-)-Preorixine をはじめとしたイソプレン側鎖上の不斉炭素についてはこれまでその絶対配置は

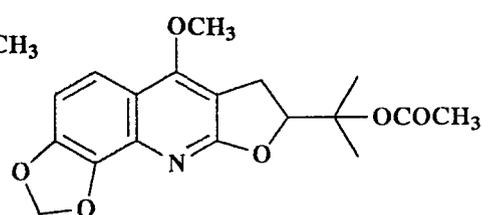
決定されていたものの、その決定法にはあいまいさが残っていた。そこで、これらの化合物について改良 Mosher 法を適用することによりその絶対配置を明らかとした。



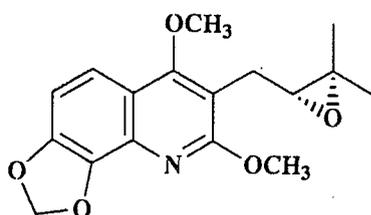
(+)-Isoptelefolidine



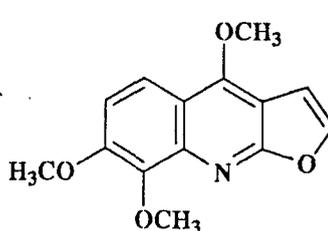
3'-O-Methylorixine



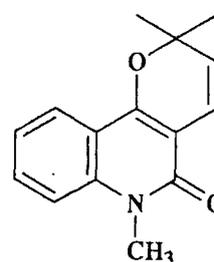
3'-O-Acetylisopteleflorine



(-)-Preorixine



Skimmianine

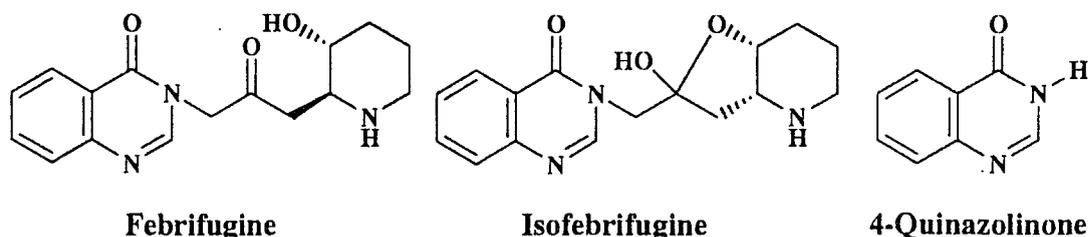


N-Methylflindersine

### (3) Febrifugine の結核菌 (BCG) 誘導腹腔マクロファージ (Mφ) の NO 産生増強作用

マクロファージ (Mφ) が産生する細胞障害性の一酸化窒素 (NO) は、マラリア原虫に対しても障害性があることが知られている。著者は生薬常山のメタノールエキスおよびその主アルカロイド成分である febrifugine が結核菌 (BCG) 誘導マウス腹腔 Mφ の NO 産生を増強するかを検討した。BCG (1 mg/mouse/0.2ml *i. p.*) の接種 2 日前から 3 日間、常山メタノールエキス (20mg/kg/day) を ICR マウスに経口投与した。BCG 接種 5 日後に腹腔 Mφ を採取し、エンドトキシン (LPS) 存在下に 24 時間培養して NO を産生させ、培養液上清中の NO 量を Griess 試薬によって比色定量した。その結果、常山メタノールエキスを投与したマウスの Mφ は、生理食塩水を投与したコントロール群に比べて NO 産生が有意に増強された。エキスを分画したところ、活性はアルカロイド画分に移行した。さらに、アルカロイド画分から得た febrifugine, isofebrifugine, 4-quinazolinone をそれぞれマウスに経口前投与 (1 mg/kg/day) した結果、その主活性成分は febrifugine であることが明らかとなった。Febrifugine を BCG の接種前あるいは接種後に投与した場合、接種前投与がより多くの NO を産生することが判明した。一方、BCG 誘導マウス腹腔 Mφ に febrifugine, LPS を加えて培養した場合、その NO 産生量に増強は認められず、逆に減少する結果となった。その結果、febrifugine の NO 産生増強作用は、Mφ への直接的な賦活化によるものではなく、Mφ 活性化における上流部分にあたる IFN- $\gamma$  の産生や T 細胞を活性化する IL-12 の産生などの関与によって生じることが示唆された。また、既存の抗マラリア剤は febrifugine

と同用量では NO 産生を増強しなかった。



#### (4) Febrifugine のマラリア感染赤血球誘導腹腔浸潤細胞の NO 産生増強作用

常山は抗マラリア作用を目的として使用される生薬である。そこで、マウスマラリア原虫感染赤血球 (*Plasmodium berghei* NK65,  $2 \times 10^7$  PRBC/mouse *i. p.*) で誘導した腹腔浸潤細胞 (M-PEC) の NO 産生への febrifugine の影響を検討した。その結果, febrifugine は BCG の場合と同様に, 生理食塩水を経口投与したコントロール群と比較して腹腔浸潤細胞の NO 産生を増強した。

#### (5) Febrifugine のマラリア感染マウスにおける血中 NO 産生増強作用

Febrifugine がマラリア感染マウスの血中の NO 産生量にどのような影響を与えるか検討した。Febrifugine (1 mg/kg/day) はマラリア原虫 (*P. berghei* NK65,  $2 \times 10^6$  PRBC/mouse *i. p.*) の感染 2 日前から 3 日間, 感染開始後の 3 日間あるいは感染の前後 5 日間にわたって経口投与した。血中  $\text{NO}_3^-$  量はマウスから経時的に採血して得た血漿を硝酸塩還元酵素を用いて  $\text{NO}_2^-$  に還元した後, Griess 試薬で反応させ  $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$  の総量として表示した。マラリア原虫感染率は採血したものの一部から血液塗末標本を作製し, ギムザ染色後, 顕微鏡下にて計測した。マラリア感染マウスでは, 感染開始から 4 日後に血液原虫感染率が上昇し, 7~8 日で全てのマウスが死亡した。この際, これらのマウスから得た血液の  $\text{NO}_3^-$  濃度を経時的に調べたところ, この濃度はいずれの時間においても変化は認められなかった。一方, febrifugine を投与したマウスの血中  $\text{NO}_3^-$  濃度は全ての投与方法において上昇した。また, febrifugine は血液原虫感染率を抑制し, マウスの生存率も上昇させた。なお, febrifugine による血中  $\text{NO}_3^-$  濃度の上昇効果には 0.33 から 1.0 mg/kg/day の範囲で用量依存性が認められた。Febrifugine (1 mg/kg/day) を正常マウスに経口投与した場合, 血中  $\text{NO}_3^-$  濃度は正常マウスのそれと比較して変化が認められないことから, febrifugine による抗マラリア効果に NO 産生の増強作用が寄与する可能性を明らかにする目的で, febrifugine を投与したマラリア感染マウスに NO 合成酵素阻害剤である L-NMMA あるいは aminoguanidine を投与して, febrifugine の抗マラリア効果にどのような影響を及ぼすか検討した。その結果, febrifugine 投与により上昇する血中  $\text{NO}_3^-$  濃度はこれらの NOS 阻害剤の投与により正常値にまで下がり, febrifugine の投与により改善される血液原虫感染率の上昇とマウスの生存日数をともに悪化した。このことから, febrifugine による抗マラリア機序の一部に NOS から産生される NO が関与している可能性が強く示唆された。

しかし、febrifugine は、マラリアの根治を目的として連続経口投与した場合、febrifugine の投与期間中は原虫の血液感染率は血中  $\text{NO}_3^-$  濃度の上昇とともに改善されるが、投与を中止するとマラリア原虫の増殖が再度始まった。この事から、本研究で使用した用量で、febrifugine はマラリアの治療において根治はむずかしいと考えられる。しかしながら、既存の抗マラリア剤に対して耐性を示すマラリア原虫が広がってきている中で、宿主免疫応答の一部を担っている NO はこれらの原虫種に耐性を生じさせない利点があり、既存の抗マラリア剤との併用を前提とした実験を行うなど新たな戦略を立てることが可能であると考えられる。

## 審査結果の要旨

マラリアは、熱帯地方を中心に多くの人々が感染する疾病である。マラリアは、正しい診断のもとで、適切な治療がなされれば完治する。しかしながら、既存の薬剤に対する多剤耐性マラリア原虫の出現が治療上の大きな問題となっていることから、現在新たな薬剤の開発が強く要望されている。本研究は、新規抗マラリア剤の開発にとって基礎となりうるデータを提供することを目的とした。すなわち、中国で現在でもマラリア治療に使用されている生薬・常山に注目し、その基原植物であるコクサギ、ジョウザンアジサイについて、天然物化学および免疫薬理学的な観点から検討を加えた。

実験結果は下記の内容から構成されている。

(1) コクサギに含まれる成分を詳細に検討し、3種の新規キノリン系アルカロイド ((+)-isoptelefolidine, 3'-O-methylorixine, 3'-O-acetylisopteleflorine) を含む22種のキノリン系アルカロイド、6種のクマリンを単離した。そこで、3種の新規アルカロイドの構造を分光学データをもとに決定するとともに、これまで未確定だった (+)-orixine をはじめとするコクサギアルカロイドの立体化学を改良 Mosher 法を適用することにより明らかにした。単離した化合物については、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* を用いた *in vitro* での殺マラリア原虫活性試験を行い、2種のアルカロイド (*N*-methylatanine, 4-O-methylbalfourodinium chloride)、2種のクマリン (bergapten, imperatorin) に殺マラリア原虫活性を見いだした。

(2) *in vitro* による抗マラリア活性試験できわめて強い殺マラリア原虫活性を示したジョウザンアジサイから、その主活性成分として febrifugine を単離した後、febrifugine がマラリア原虫感染マウスに対しても抗マラリア作用を示すことを確認した。ところで、マラリア原虫に対する直接作用や生体の免疫系を介する作用など、さまざまな抗マラリア作用発現メカニズムが考えられた。本研究では、特にマラリアの感染防御においてその役割が注目されている一酸化窒素 (NO) に対する febrifugine の影響を検討した。その結果、febrifugine が、BCG 誘導マウス腹腔マクロファージ、マラリア原虫感染マウスの腹腔内浸潤細胞・血中の NO 量を増加させることを明らかにした。さらに、NOS2 阻害剤を用いた実験により、febrifugine が血中 NO を増加させることによって抗マラリア作用を発現することを明確にした。この結果は、febrifugine の有用性を示すだけでなく、NO を介した作用を考慮した新たな薬剤開発の可能性を示唆したものといえる。

以上のように、新たな抗マラリア剤の創製において、本研究は化学的のみならず免疫薬理学的に新たなタイプのリード化合物を提示したといえる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として十分な内容を持つと認める。