

氏名(本籍)	こまつ 小松	さかえ 栄
学位の種類	薬学	博士
学位記番号	薬第	269号
学位授与年月日	昭和62年	3月11日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当	

学位論文題目	液体クロマトグラフィーによる生物活性天然物質の分離分析に関する研究
--------	-----------------------------------

論文審査委員	(主査) 教授 南原利夫	教授 曳野宏
		教授 野副重男

論文内容要旨

最近における有機合成農薬の目覚ましい進歩は、農作物を病害虫から保護し、食糧の安定供給に大きな貢献をもたらした。しかし、病害虫撲滅のために農薬を無批判に使用することは、生態系に破壊をもたらし、さらに農作物中への残留、食物連鎖を通じての生物濃縮、病害虫の薬剤耐性の獲得、天敵相の破壊などとなって人類にはねかえってきている。近年、その反省として従来の殺生物剤による無差別殺戮ではなく、防疫上必要な生物のみを選択的にコントロールする方法が求められるようになってきた。

自然界における生物は、生育過程や摂食、休眠、配偶、生殖等の行動を、内外からの種々の化学物質により制御されている。これらの化学物質は、生理活性天然物質として分類され、これを直接あるいは間接に利用する有害生物のコントロール法が、防除の分野でもっとも有望視される。そこで、昆虫の生理活性物質としてホルモンあるいはフェロモン等を利用する選択的害虫防除法の検討、また植物起源の有害生物に対する特異的活性を持つ物質の検索などが広く行なわれるようになってきている。

一方、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、誘導体化法、カラム充填剤、検出器、送液装置等の目覚ましい進歩により、生体内微量成分の分析や、従来分離困難とされた物質の大量分取を可能とするなど、生理活性天然物を扱ううえに不可欠な手法のひとつとなっている。

これらの観点から、有害生物の防除を目的とした生理活性天然物のHPLCによる分離分析法の開発を企てた。

まず、昆虫の生殖機構に関与するecdysteroidおよびprostaglandin（PG）の1-anthroyl nitrile（1）による蛍光プレラベル化を検討し、生体試料の前処理法を確立して、昆虫ecdysteroidおよびPGの超微量分析に応用した。一方、これら水酸基を持つ生理活性物質の高感度分析を目的に、新規蛍光プレラベル化剤を開発し、その反応性について精査した。

ついで、植物起源の昆虫脱皮ホルモン活性物質、phytoecdysteroidと植食性昆虫の生態的関係を明らかにするため、20-hydroxyecdysoneを経口投与した昆虫の糞中代謝物の検索を行った。

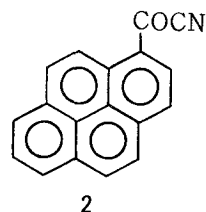
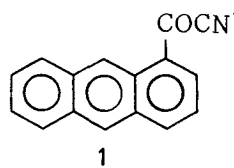
さらに、森林害虫であるキクイムシの集合フェロモンの、HPLCによる光学分割を、光学活性カラム法およびdiastereomer法で検討した。

また、住血吸虫症の撲滅を目的とする殺軟体動物活性物質の検索で見出されたカシュウナツ（*Anacardium occidentale*）中の活性成分のHPLC分離を検討し、単離した成分の構造と生物活性の相関性について考察を加えた。

1. 昆虫EcdysteroidおよびProstaglandinの蛍光検出HPLCによる微量分析

蛍光プレラベル化剤1-anthroyl nitrile（1）を用い、ecdysteroidおよびPGに対する誘導

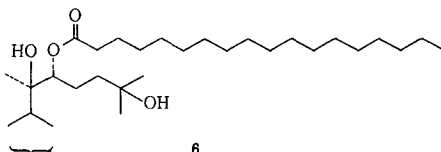
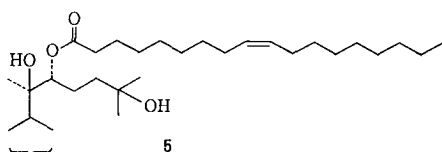
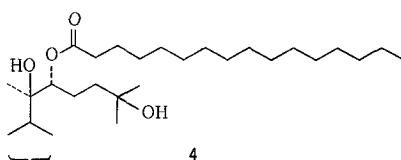
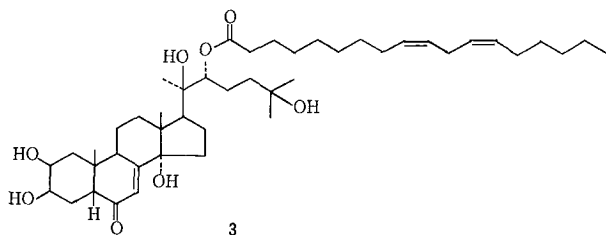
体化を試み、反応性、感度およびHPLCによる分離、定量の条件を吟味した。1は温和な条件下、ecdysteroidの2位水酸基、およびPGの15位水酸基と定量的に縮合し、生成する誘導体の蛍光検出(ex365nm, em 418 nm)による検出限界は約10 pgと高感度であった。ついで昆虫試料の前処理法を検討した。EcdysteroidおよびPGは、Sep-pak C₁₈カートリッジと疎水性陰イオン交換ゲルpiperidinohydroxypropyl Sephadex LH-20により、効率よく生体試料から抽出、分離された。本前処理法と誘導体化法を昆虫ecdysteroidおよびPGの測定に応用したところ、交尾を契機にこれら物質の体液中濃度が劇的に変動することが判明した。



また、水酸基を持つ生理活性物質のより高感度な分析を目的とし、新規蛍光プレラベル化剤pyrene-1-carbonyl nitrile (2)を合成し、ヒドロキシステロイドをモデル化合物にとりあげ、各種水酸基に対する反応性および検出感度を検討した。2は1に比して検出感度は同等であるものの、反応性に優れることが判明した。

2. 20-Hydroxyecdysone代謝物の単離と同定

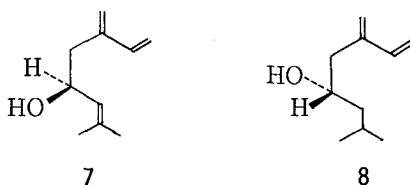
北米大陸における農作物の重大な害虫であるtobacco budworm (*Heliothis virescens*) (鱗翅目)の幼虫は、20-hydroxyecdysoneの経口投与が他の鱗翅目昆虫の幼虫ではホルモンバランスを崩して致死させるのに対し、何ら影響を受けず成虫になることが知られている。今回 *H. virescens*のphytoecdysteroidに対する解毒機構の生理的基盤を探るため、幼虫に1000ppmの20-hydroxyecdysoneを含む人工飼料を摂食させ、糞中の代謝物を検索した。その結果、エーテル抽出画分から比較的極性の代謝物4種を単離した。これら4成分の構造は、各種スペクトルデータから、20-hydroxyecdysoneの22-linoleate (3), 22-palmitate (4), 22-oleate (5), 22-stearate (6)と決定された。



Ecdysteroidの22位水酸基がホルモン活性の発現に必須なことは以前から指摘されている。また、20-hydroxyecdysoneの22-deoxy体、2,22-dideoxy体あるいは22位リン酸エステル、adenosine monophosphateなどの22位抱合体は、ホルモン活性が著しく低いことが知られている。これらの事実から脂肪酸による22位水酸基のアシル化は、*H. virescens*のphytoecdysteroidに対する解毒機構のひとつと推測される。

3. キクイムシ集合フェロモンのHPLCによる光学分割

まず、光学活性カラムChiralpak OT (+)を用いる方法を検討した。本カラムによるキクイムシ集合フェロモン ipsdienol (7) ラセミ体の直接分割を種々の移動相を用いて試みたが、良好な分離は得られなかった。そこで本カラムが芳香族化合物のラセミ体分割に優れる点に着目し、7をbenzoateに導き移動相にメタノールを用いたところ、期待通り良好な結果が得られた。しかし、移動相のメタノールがカラムの著しい劣化を招くことが判明した。

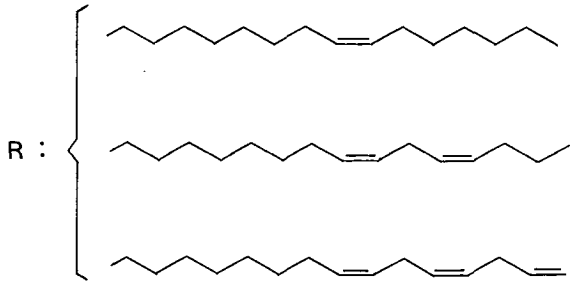
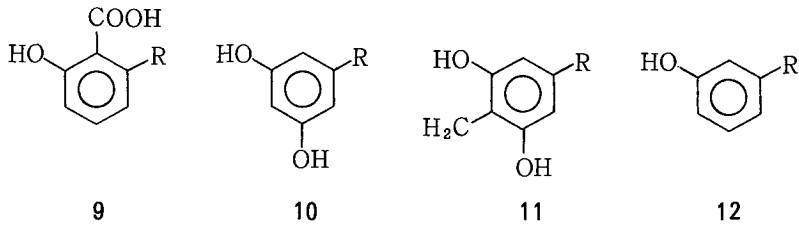


そこでdiastereomerに誘導後通常のカラムによるHPLC分離を試みた。キクイムシ集合フェロモンは不斉炭素につく水酸基を有し、これを介してキラリティーを導入しdiastereomerエステルに誘導する方法を企てた。光学活性試薬としてMosher試薬 (R)-(+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetic acid [(+)-MTPA]を用い、縮合条件を検討した。7および ipsdienol (8) と (+)-MTPAを、無水ジクロルメタン中dicyclohexylcarbodiimideと4-pyrrolidinopyridine存在下縮合反応に付したところ、目的とするdiastereomerが定量的に得られ、本法がこの種の誘導体化法として優れることが判明した。

ついで得られたdiastereomerのHPLCによる分離を検討した。まず分析用silica gelカラムを用い分離条件を種々検討したところ、移動相にペンタン/アセトンを用いるとき、満足し得る成績が得られた。そこで分離のスケールアップを検討し、分取用silica gelカラムとリサイクル法を組み合わせ、diastereomerの分取が可能となった。

4. カシュウナッツ中の殺軟体動活性物質のHPLCによる分離分析

カシュウナッツshell oilの主成分、anacardic acid (9), cardol (10), 2-methylcardol (11), cardanol (12) およびそれぞれのC₁₅側鎖の不飽和度1, 2, 3, のフェノール性化合物12種の分離を試みた。カシュウナッツshell oilのヘキサン抽出物をsilica gelを用いるカラムクロマトグラフィーにより9, 10, 11, 12の画分に分離後、各画分を逆相型ODSを用いる中圧



クロマトグラフィーに付し、12成分を分離した。

つぎにshell oilならびに食用に供する部分、すなわちナッツおよび果汁のHPLCによる成分分析を行った。カラムに逆相型ODSを、移動相にメタノール/10%酢酸(88:12)を用いるとき、12成分の一斉分離が可能となった。ナッツには9, 12は検出されなかったが、10および11が含まれることが判明した。また果汁には9のみが検出された。

最後に得られた12成分の殺軟体動物活性試験を行い、構造と生物活性の相関を明らかにした。すなわち、活性の強度は、 $9 \gg 10 > 11 \gg 12$ の順に減少し、側鎖の不飽和度は活性にそれほど影響がなく、ベンゼン環上の親水性基とカルボキシル基が活性の発現に重要な因子となっていることが判明した。また9は、現在実際に使用されている殺軟体動物剤よりはるかに強い活性を有することが明らかとなった。今回、食用に供する部分からも活性成分が検出されたことから、人畜に対する毒性はきわめて小さいものと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、生物活性天然物質のトレース・キャラクタリゼーション並びに分取に液体クロマトグラフィーを中心とする分離分析法の応用を企てたものである。

昆虫の生殖機構を分子レベルで理解するうえで、ecdysteroidおよびprostaglandin (PG)の昆虫における動態の把握が強く望まれてきた。これら生物活性物質は、昆虫にきわめて微量にしか存在しないため高感度な分析法が求められる。そこでHPLC用蛍光プレラベル化剤1-anthroyl nitrileを用いecdysteroidおよびPGに対する誘導体化を試みるとともに、昆虫試料の前処理法、HPLCの条件について検討した。1-Anthroyl nitrileは、温和な条件下ecdysteroidの2位、PGの15位水酸基と定量的に反応し、生成する誘導体は蛍光検出HPLCにおいて検出限界約10pgときわめて高い感度を示した。一方、昆虫のecdysteroidおよびPGは、Sepapak C₁₈カートリッジ並びに疎水性陰イオン交換ゲルPHP-LH-20を用いることにより生体試料から効率よく抽出、分離することができた。これらの前処理操作を組み合わせ両物質の個体レベルでの同時微量分析が可能となった。

北米の農作物の害虫、*Heliothis virescens*の幼虫は、ecdysteroidの経口投与が他の昆虫では致死をもたらすのに対し、何ら影響を受けずに成虫となることが知られている。その生理的基盤を探るため、20-hydroxyecdysoneを経口投与し糞中代謝物を検索した。その結果、20-hydroxyecdysone 22-linoleate, 22-palmitate, 22-oleate, 22-stearateの4種が単離された。Ecdysteroidの22位水酸基がホルモン作用の発現に必須であることを考え合せると、これら長鎖脂肪酸によるアシル化は解毒機構のひとつと推測される。

つぎにキクイムシ集合フェロモンipsdienolおよびipsenol光学異性体のHPLC分離を検討した。まずラセミ体をbenzoateに誘導し、光学活性カラムChiralpak OT (+)を用いたところ良好な分離が得られた。しかし、分取スケールの分離には難点があったため、光学活性Mosher試薬を用いてdiastereomerに変え、順相系シリカゲルのリサイクル分取HPLCに付し、目的を達することができた。

最後にカシュウナツツshell oilの主要構成成分、anacardic acid, cardol, 2-methylcardol, cardanolおよびそれらのC₁₅側鎖異性体12種のHPLCによる一斉分離を行った。住血吸虫の中間宿主となる水棲巻貝に対するこれら成分の殺軟体動物活性を検定し、構造活性相関を明らかにした。

以上、本論文は液体クロマトグラフィーによる生物活性物質の分離、同定並びに光学分割の方法論を確立し、それらの昆虫における生理的意義、構造活性相関を明らかにするなど分析化学の視点に立って生物活性天然物質の化学に数々の新知見を加えたものであり、学位を授与するに十分値する内容と認める。