

氏名	崔 艶梅
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位記授与番号	博甲第 5511 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	補骨脂および呉茱萸のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する作用物質に関する研究

学位論文要約

【背景・目的】

アジア伝統医学、特に中医学や漢方医学で使用されてきた生薬は、長期的な臨床経験の積み重ねがあり、有用性だけでなく、その多くで、少なくとも急性毒性が低いことについては期待できると考えられる。生薬の成分は様々な生理活性を持っており、特に、多くの成分研究が行われてきた生薬についても、これまでに研究が行われてきた成分以外に、未知成分にも活性を有する可能性がある。本研究においては、代表的な繁用生薬の中から補骨脂および呉茱萸の成分について詳細な検討を行った。

補骨脂はマメ科の植物 *Psoralea corylifolia* の乾燥果実であり、中国を中心に臨床において婦人の出血、白斑、乾癬、早漏、遺尿、腰痛、頻尿などに用いられており、補骨脂が配合された主な漢方処方としては補骨脂丸、青娥丸、四神丸などがある。成分としては、bakuchiol (1) を初めとするメロテルペン類、psoralen (23) が代表となるクマリン類、また、様々なフラボノイドが報告されている。これらの成分の中で、補骨脂の主成分である bakuchiol (1) には抗菌活性、抗腫瘍活性、骨量低下抑制作用などが報告されている。さらに、フラボノイドの一つである neobavaisoflavone (8) には骨形成促進作用や抗菌活性が報告されており、クマリン類のうち psoralen (23) については、その光感作促進作用が白斑病、乾癬の治療に応用されている。

呉茱萸はミカン科の植物 *Euodia ruticarpa* の未熟果実であり、鎮痛、止瀉、健胃、利尿などの目的で使用される。漢方では温経湯、呉茱萸湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯などの処方に配合される。呉茱萸の含有成分のうち、アルカロイドがよく知られており、中には evodiamine (43) に代表されるインドールアルカロイド、evocarpine (37) を初めとするキノロンアルカロイドが報告されている。また、ミカン科の植物が共通に含有するリモノイド（トリテルペノイド苦味質）も存在している。これまでに呉茱萸のアルカロイド成分の活性について主に研究されており、例として、キノロンアルカロイドの evocarpine (37) などに抗菌活性が認められ、インドールアルカロイドの evodiamin (43) に抗腫瘍活性や抗菌活性が報告されている。

補骨脂および呉茱萸の含有成分には、いずれも抗菌活性を有するものがあり、中でも、補骨脂の主成分であるメロテルペノイドの bakuchiol (1) および呉茱萸のキノロンアルカロイド成分としての evocarpine (37) が多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) に対し、強い抗菌作用を示している。主成分として知られるこれら以外の抗 MRSA 成分については、詳細な検討がされていない。そこで

本研究では MRSA に対する抗菌活性を指標として、補骨脂および呉茱萸の成分について詳細な研究を行うこととした。補骨脂の成分のうち、bakuchiol (1) と部分的に類似した構造を持つ化合物を多数含有しており、それらも抗 MRSA 活性を示す可能性が高いと考えられる。また、呉茱萸に関して、今までに低極性成分の探索が進んでいる一方、ポリフェノール類などの高極性の成分に関する研究が十分ではない。本研究において、呉茱萸の粗分画について抗 MRSA 活性を調べた結果、酢酸エチルエキスに抗菌活性を認めた。このことから、本研究ではポリフェノールを中心に酢酸エチルエキスの成分の探索を進めた。

【実験方法】

日本国内市場品の補骨脂および呉茱萸を粉末にし、それぞれ各溶媒により抽出を行った。得られたエキスについて、各種カラムクロマトグラフィーによる分画精製、および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分取を行い、化合物の単離を行った。単離した化合物については、質量スペクトル (MS) 分析、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル分析をはじめとする各種スペクトルデータに基づいて、同定および構造解明を行った。また補骨脂については、フェノール性成分の HPLC による一斉分析の条件をも確立した。

単離した化合物の MRSA に対する抗菌活性は、広島大学大学院医歯薬保健学研究院の黒田照夫教授に測定を依頼したが、その一部については黒田教授の指導のもとに申請者自身による測定も行った。本研究では、岡山大学附属病院の臨床分離株 MRSA OM481 および OM584 を使用し、各化合物の存在下で菌を 37 °C, 24 時間培養し、肉眼で菌の発育が認められない濃度を最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) とした。

【結果】

(1) 補骨脂からの成分の単離および単離成分の MRSA に対する抗菌活性

各種溶媒による分画およびカラムクロマト、分取 HPLC による精製を行い、補骨脂から計 31 種の既知化合物を単離した。これらについて標品との直接比較または文献記載の NMR データのとの比較により、メロテルペン類 4 種、フラバノン類 2 種、イソフラボン類 6 種、カルコン類 3 種、フラボン類 4 種、クメスタン類 1 種、クマリン類 2 種、ベンゾフラン配糖体 5 種、その他の化合物 4 種と同定した。

これらの他に新規化合物 2 種を単離した。そのうち化合物 7 については、高速原子衝撃法による高分解能質量スペクトル (HRFABMS) 分析によって分子式は $C_{20}H_{20}O_5$ であることが示された。また、UV スペクトルにより、フラバノン骨格の存在が推定された。 1H - および ^{13}C -NMR スペクトルによってフラバノン骨格とともに 2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl 基を有することが示された。さらに、各種 2D-NMR スペクトル (1H - 1H COSY, HSQC, HMBC) の詳細な解析および円二色性 (CD) スペクトルデータに基づいて、Fig. 1 に示す構造を明らかにした。

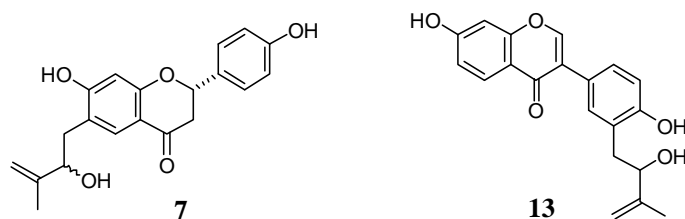


Fig. 1 Structures of new compounds isolated from fruits of *P. corylifolia*

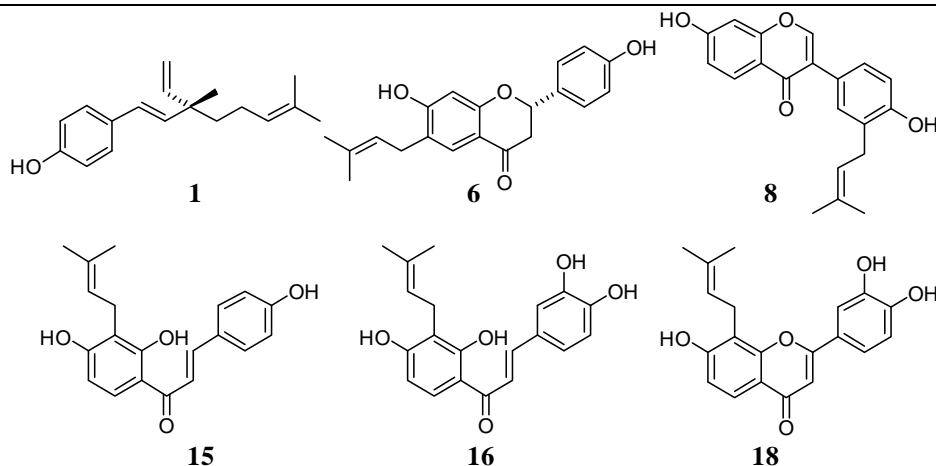


Fig. 2 Compounds which showed anti-MRSA effects isolated from fruits of *P. corylifolia*

また、新規化合物 **13** についても同様に FABMS, 紫外スペクトル (UV), ^1H -, ^{13}C -NMR, 各種 2D-NMR スペクトルの解析により, Fig. 1 に示す構造を確立した。

補骨脂の粗分画の抗 MRSA 活性を評価したところ酢酸エチルエキスに抗菌活性が認められたので、さらに、酢酸エチルエキスから単離した 17 種の化合物についての MRSA に対する抗菌活性の検討の結果, Fig. 2 に示す bakuchiol (**1**) を含む 6 種の化合物が比較的強い抗 MRSA 活性を示した。さらに、本生薬から得た酢酸エチルエキスについて、抗菌活性を認めた化合物 5 種を含む計 9 種の化合物について、HPLC での一斉分析の条件を確立し、定量を行った。その結果、抗菌活性の強い化合物の含有量は高く、補骨脂エキスの抗菌薬資源としての利用可能性が示唆された。

(2) 呉茱萸からの成分の単離および単離成分の MRSA に対する抗菌活性

呉茱萸について同様に抽出、分画、精製を行い、計 38 種の化合物を単離した。そのうち既知化合物については、キノロンアルカロイド類、インドールアルカロイド類、リモノイド類、フラボノイド配糖体、カテキン関連化合物、その他のフェノール性化合物と、それぞれ同定した。また新規化合物についても、各種スペクトルデータおよび化学的誘導等に基づいてそれらの構造を確立した。

単離した化合物についての MRSA に対する抗菌活性の検討の結果、その一部に抗菌活性が認められた。それらの中では結合様式および立体構造の違いによる抗菌活性にも差異が認められた。

【結論】

補骨脂および呉茱萸からポリフェノール性成分を中心に成分の検討を進め、それらのうち既知化合物の同定を行うとともに、新規化合物については、各種スペクトルの解析や合成反応によって、それぞれの構造を明らかにした。

補骨脂からは、新規化合物 2 種を含む計 33 種の化合物を単離し、同定および構造解明を行った。また、単離した化合物のうち 6 種には比較的強い抗 MRSA 活性が見出された。補骨脂の主要なポリフェノール成分についての一斉分析の条件を確立した。定量的な分析の結果、

抗菌性成分のエキス中での含有量も高いことから、補骨脂は抗菌作用物質の資源として期待される。

一方、呉茱萸からは新規化合物を含めて計 38 種の化合物を単離し、既知化合物の同定と新規化合物の構造解明を行った。また、単離した化合物のうち数種については、ミカン科植物中に存在していることを初めて見出した。さらに、呉茱萸から単離した化合物の中に MRSA に対する抗菌活性を示すものがあることを見出した。

【参考論文】

Constituents of *Psoralea corylifolia* fruits and their effects on methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Yanmei Cui, Shoko Taniguchi, Teruo Kuroda, and Tsutomu Hatano. *Molecules*, **20**, 12500-12511, 2015 (IF 2.465).