

ショウガ科有用植物・サンナに含有される抗アニサキス作用物質の検索

鈴木 淳^{*1}, 安田 一郎^{*2}, 村田 以和夫^{*3}, 村田 理恵^{*1}, 西谷 潔^{*4}

Studies on Larvicidal Compounds Isolated from the Rhizomes of *Kaempferia galanga* Effective on *Anisakis simplex*

Jun SUZUKI^{*1}, Ichiro YASUDA^{*2}, Iwao MURATA^{*3}, Rie MURATA^{*1}
and Kiyoshi NISHITANI^{*4}

Anisakiasis is a parasitic disease of the digestive tract caused by ingesting the larvae of *Anisakis simplex*. Although it has been identified, there is no pharmaceutical treatment for anisakiasis. We studied the larvicidal effect of the constituents of *Kaempferia galanga* (Japanese name: Sanna) rhizomes used as spices and Chinese medicine on larvae of *Anisakis simplex*. Some phenylpropanoids such as ethyl *trans*-cinnamate (compound 1), ethyl *cis*-cinnamate (compound 2), and ethyl *p*-methoxy-*cis*-cinnamate (compound 4) had larvicidal activity against *Anisakis simplex*. The 100 % minimal lethal concentrations (MLC) of compounds 1, 2 and 4 were 0.71, 0.32 and 0.61 mM, respectively. Furthermore, the molecular electrostatic potential of compounds 1 and 2 and the derivatives of compound 1 were determined by semiempirical molecular orbital methods (MOPAC). These results suggest that the extent of larvicidal activity could be influenced by the nucleophilic regions of these compounds.

Keywords: サンナ *Kaempferia galanga*, アニサキス *Anisakis simplex*, 殺線虫物質 larvicidal compound, フェニルプロパノイド phenylpropanoids, 半経験的分子軌道法 semiempirical molecular orbital methods

緒 言

アニサキス症はヒトの胃や腸壁などにアニサキス亜科幼線虫が穿入して胃腸炎などの症状を引き起こす幼虫移行症である。それらの中で人体に感染するものとして *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum oscuratum*及び *Hysterothylacium aduncum*の4種が知られているが、アニサキス症の多くは *Anisakis simplex*の第3期幼虫(以下、アニサキスとする)が原因で、全症例の87.5%を占めている¹⁾。しかし、現在までのところ外科手術と胃内視鏡による幼虫の摘出以外に適切な治療法はなく、薬物によるアニサキス症に対する治療法は確立されていない。

これまで著者らは生薬及び香辛料に含まれるアニサキスに対する殺線虫物質を検索し、本症治療の可能性を検討してきた。その結果、ケイヒ(シナモン)由来の cinnamic aldehyde 及び cinnamyl alcohol に殺線虫効果が認められた²⁾。また、主にタイ、インドネシアなどの熱帯・亜熱帯地域で栽培され、古くから健胃及び利尿作用^{3,4)}などを有する生薬としてだけでなく、香辛料としても広く利用されているショウガ科植物のウコン(ターメリック)から比較的即効性

のある強い殺線虫作用を有する *ar*-turmerone を単離し、報告⁵⁾してきた。

今回は、ショウガ科植物で芳香性健胃薬や食品の香辛料として近年多用されている *Kaempferia* 属植物⁶⁾に着目し、その一つである *Kaempferia galanga* の根茎(以下、サンナとする)についてアニサキスに対する殺線虫効果を検討した。また、殺線虫効果の認められた化合物と数種の誘導体のスクリーニング結果から殺線虫物質における構造的特徴について検討したので合わせて報告する。

材料及び方法

1. アニサキスの採取

スケトウダラの肝臓表面に被覆しているアニサキスを採取し、0.4% NaCl 水中で活発なS字運動をするものを選び実験に用いた。

2. スクリーニング法

各種被検液20 ml をガラスシャーレに分注し、アニサキスを10虫体ずつ投入後、20 のフラン器に入れ、1時間、3時間及び24時間後に本虫体の運動性及び生存状態を観察し

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

*² 東京都立衛生研究所環境保健部

*³ 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科

*⁴ 東京理科大学薬学部

た．運動性の評価は既報⁷⁾に準じ，以下に示す基準により判定した．また，対照として0.4%NaCl水における本虫体の運動性及び生存状態について観察した．

(-) : 運動停止(死滅)，(+) : 虫体に直接刺激を与えるとわずかに運動する，(++) : シャーレに弱い刺激を与えると自発的固有運動(巻き込み運動)を示す，(+++) : 自発的に活発なS字状運動を示す

3. 被検液の調製

生薬山奈(ウチダ和漢薬製)として市販されている乾燥根茎を粉碎し，その粉末500 gにメタノール2 Lを加え，室温で24時間静置し抽出した．本操作を2回繰り返した後，溶媒を減圧留去してメタノール抽出エキスとした．メタノール抽出エキスをセライト700 gに添加して吸着させ，オープンカラムに充てんした後，ヘキサン，クロロホルム，アセトン及びメタノール各800 mLで順次溶出した(Fig.1)．

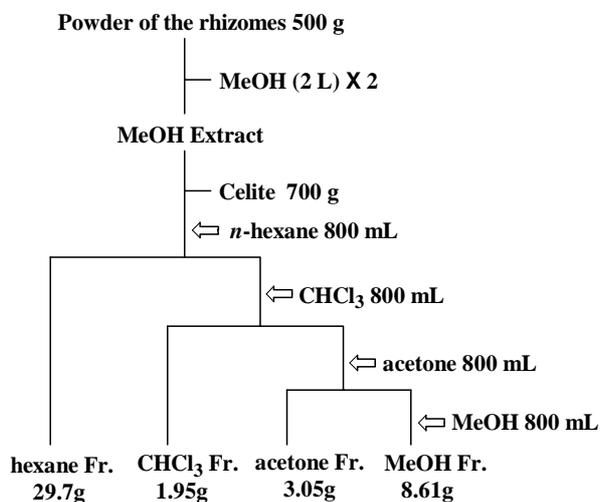


Fig. 1. Flow diagram of extraction and fractionation of rhizomes of *Kaempferia galanga*

各溶出液の溶媒を減圧留去し，ヘキサン可溶分画，クロロホルム可溶分画，アセトン可溶分画及びメタノール可溶分

画とし被検エキスとした．次に，各被検エキスをそれぞれ0.4%NaCl水で1,000 µg/mL及び500 µg/mLに調整し実験に用いた．また，これら被検エキスから単離及び精製した化合物は，先ず500 µg/mLの被検液とし，0.4%NaCl水を用いて順次2倍希釈液を調整して実験に用いた．

4. 殺線虫物質の検索

ヘキサン可溶分画エキス約50倍量のシリカゲルをカラムに充てんし，ヘキサン-酢酸エチル(20:1 2:1)の条件でさらに4つの分画に分け，それぞれHF-1~4とした．

各HF-1~4について，HPLC装置(日本分光社製:Gulliver 900series)を用いて，カラム:5SL-II(4.6 mm I.D. x 25 cm, 5 µm, ナカライテスク社製)，カラム温度:40℃，移動相:ヘキサン-酢酸エチル(20:1および10:1)，流速:1.0 ml/min，検出:UV270 nmの条件下で含有化合物の検索を行った．

5. 殺線虫物質の単離及び精製

ヘキサン可溶分画エキスHF-1~4の約100倍量のシリカゲルをカラムに充てんし，ヘキサン-酢酸エチル(10:1)の条件でシリカゲルオープンクロマトグラフィーを行った．さらに，分取用HPLC(日本分光社製:Gulliver 900series)を用いて，カラム:5SL-II(20 mm I.D. x 25 cm, 5 µm, ナカライテスク社製)，カラム温度:40℃，移動相:ヘキサン-酢酸エチル(10:1)，流速:10.0 ml/min，検出:UV270 nmの条件下で各化合物を単離及び精製した．

6. 静電ポテンシャルの計算

半経験的分子軌道法で有機化合物の電子状態，最適化構造などを計算するプログラムMOPAC[®]ver.97を使用し，ハミルトニアンにAM1[®]，溶媒効果を考慮するためCOSMO法(比誘電率:78.3)を用いて，水溶液中での分子の最適化構造における静電ポテンシャルを計算した．

実験結果及び考察

1. サンナに含有する殺線虫物質の検索

Table 1に示したように，サンナのヘキサン，クロロホルム，アセトン及びメタノール可溶分画の殺線虫効果を検討

Table 1. Effects of four fractions from *K. galanga* extract on *Anisakis simplex*

Samples	Concentration (µg/mL)	n**	Degree of larvae movement* after											
			1 hr.				3 hr.				24 hr.			
			+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
hexane Fr.	1,000	10	3	7			10					6	4	
	500	10	4	6			2	8			3	7		
CHCl ₃ Fr.	1,000	10	4	5	1		3	6	1		5	4	1	
	500	10	5	5			3	7			7	3		
acetone Fr.	1,000	10	5	5			2	8		1	9			
	500	10	4	6			3	7			10			
MeOH Fr.	1,000	10	6	4			3	7			10			
	500	10	5	5			3	7		2	8			
Control	0.4%NaCl aq.	10	2	8			2	8		2	8			

*: +++ ; Movement as S-shape strongly, ++; Movement as coil moderately, +; A little movement by stimulus

-; Death

** : No. of Samples tested

した結果、ヘキサン可溶分画及びクロロホルム可溶分画にその活性が認められた。

ヘキサン可溶分画をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーにより、HF-1~4に分離し、さらにHPLCを用いてUV:270 nmで精製及び分析したところ化合物1~6が認められた (Fig.2)。そこで、主に化合物1及び2はHF-1から、

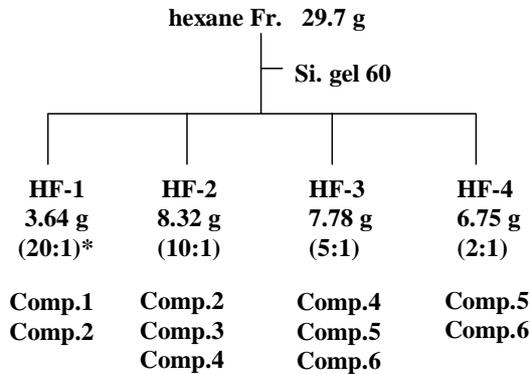


Fig. 2. Isolation of larvicidal compounds from the hexane fraction

*: Eluted solvent, made of *n*-hexane/ethyl acetate mixture

化合物3及び4はHF-2から、さらに化合物5及び6はHF-3より分取用HPLCを用いて計6種の化合物を単離精製した (Table 2)。化合物1, 3, 5及び6の構造は、NMR及びMassのスペクトルデータを解析し、文献値^{10,11)}と比較検討することにより決定した。また、化合物2及び4の構造は、¹H-NMRによる化合物1及び3のメチレンプロトンのケミカルシフト値及びスピン結合定数を比較することにより明らかとなった (Fig.3)。

2. ヘキサン可溶分画に含有する殺線虫物質

ヘキサン可溶分画から単離した化合物1~6について、アニサキスに対する殺線虫効果について検討した。

Table 2に示したように、ethyl *trans*-cinnamate (1), ethyl *cis*-cinnamate (2)及びethyl *p*-methoxy-*cis*-cinnamate (4)の100%最小致死濃度 (MLC) が、それぞれ0.71, 0.32及び0.61 mMと比較的強い殺線虫効果が認められた。HPLCによる分析結果からサンナに含有する殺線虫物質は化合物1, 2及び4といったフェニルプロパノイドであると考えられた。また、化合物3及び4のスクリーニング結果から、アリール基にメトキシのような電子供与基が存在する化合物では殺線虫効果が低下することが示唆された。さらに、これまで著者らにより殺線虫効果の認められたフェニルプロ

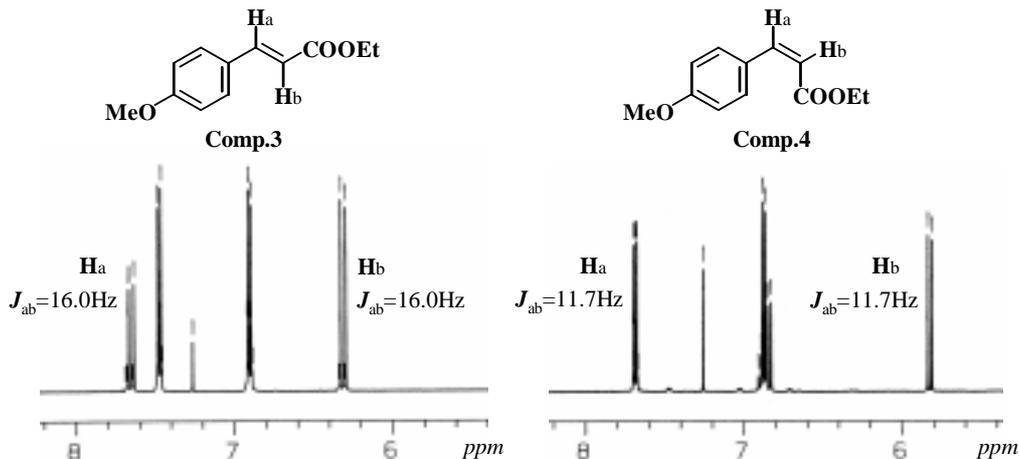
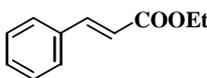
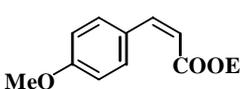
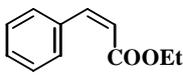
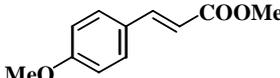
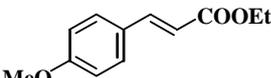
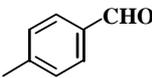


Fig. 3. ¹H-NMR chemical shifts and coupling constants of compound 3 and 4 (in CDCl₃, 500MHz)

Table 2. Effects of the phenylpropanoids isolated from *K. galanga* on *Anisakis simplex*

Compounds	MLC*	Compounds	MLC*
1. 	0.71 mM	4. 	0.61 mM
2. 	0.32 mM	5. 	> 1.30 mM
3. 	1.21 mM	6. 	> 2.0 mM

*: Minimum Lethal Concentration (MLC) judged after 24 hours

ロパノイドとして報告²⁾している cinnamic aldehyde 及び cinnamyl alcohol と今回単離した化合物1~5の構造から、側鎖の酸素官能基が活性の発現に必要なと思われる。また、化合物1と2及び3と4を比較すると、シス体はトランス体より高い殺線虫効果があることが明らかとなった。そこで、半経験的分子軌道法MOPACを用いて化合物1及び2の水溶液中の最適化構造における静電ポテンシャルの計算を行い、その計算結果が負の数値で求められた求核性攻撃を受けやすい領域を青色で、正の数値で求められた求電子性攻撃を受けやすい領域を赤色で示し視覚化した。その結果、Fig.4に示したようにシス体はトランス体と比較して青色の求核性攻撃を受けやすい領域がアリール基に対して垂直に大きく分布していた。したがって、シス体はトランス体よりアニサキス内での細胞組織や受容体などの結合性が高いことにより、強い殺線虫効果を発現するものと推察した。そこで、化合物1~4の幾何異性体に見られた殺線虫効果の変化は、その分子の求核性に依存するという仮説を組み立て以下の実験を行った。

3. 殺線虫物質の分子論的検討

殺線虫効果はその分子の求核性領域に依存するという仮説を検証するために、以下の条件の化合物7~10 (Table 3) のアニサキスに対する殺線虫効果について検討した。化合物7, 8及び10は試薬として市販されているものを用い、化

合物9のβ-ケトエステル体はアセト酢酸エチルと2当量のLDA存在下、ベンジルクロライドと反応させ合成した。化合物7は側鎖にエチレン鎖を導入し、化合物1と比較して求核性領域を拡大した化合物。

化合物8は化合物7のエステルとエチレン鎖の間に1炭素導入した化合物。

化合物9は側鎖のβ位に求核性の高い酸素官能基を導入した化合物。

化合物10はアリール基をさらに追加し、側鎖の酸素官能基付近に立体障害をもうけ、求核性領域を縮小させた化合物である。

Table 3に示したように、化合物1と比較して側鎖にエチレン鎖を導入した化合物7及び8、側鎖のβ位にカルボニル基を導入した化合物9のように求核性領域を拡大した場合、いずれも化合物1と比較して殺線虫効果が増加することが判明した。その一方で、化合物10のようなアリール基を導入して立体障害による求核性を低下させた場合、大幅に殺線虫効果が低下することが明らかとなった。したがって、アニサキスに対する殺線虫効果の発現には、化合物の求核性領域の分布が重要な要因の一つであることが示唆された。今後はアリール基における置換基効果と側鎖間での電子密度の分布状態や側鎖の酸素官能基とアリール基との距離についてのさらなる検討が必要であると思われる。

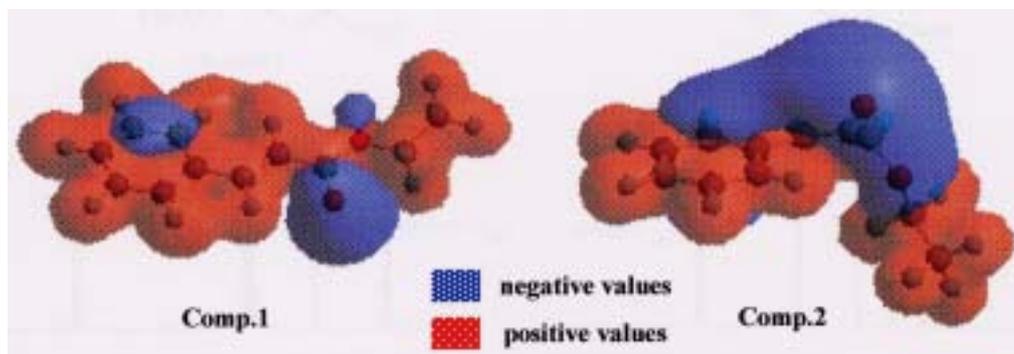
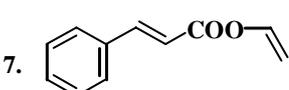
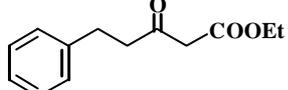
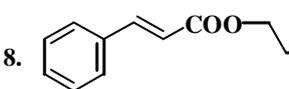
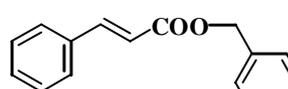


Fig. 4. Molecular electrostatic potential* of Compound 1 and 2

*:Hamiltonian approximation : AM1 (MOPAC Ver.97) EPS: 78.3

Table 3. Chemical structures of compound 7 -10 and effects of these compounds on *Anisakis simplex*

Compounds	MLC*	Compounds	MLC*
7. 	0.36 mM	9. 	0.57 mM
8. 	0.33 mM	10. 	> 2.0 mM

*: Minimum Lethal Concentration (MLC) judged after 24 hours

ま と め

芳香性健胃薬や食品の香辛料として近年多用されている *Kaempferia* 属植物に着目し, その一つサンナに含有されるアニサキスに対する殺線虫物質の検索を行った。その結果, そのヘキサシクロペンタジエン可溶分画に含有する ethyl *trans*-cinnamate (1) 及び ethyl *cis*-cinnamate (2) といったフェニルプロパノイドに活性が認められた。また, 半経験的分子軌道法により静電ポテンシャルを算出した結果, 幾何異性体 (1, 2) に認められた殺線虫効果の変化は, その分子の求核性領域の違いによるものであると考察された。

参 考 文 献

- 1) 石倉肇, 高橋秀史, 八木欣平, 他: *Clinical Parasitology*, 9, 41-46, 1998.
- 2) 鈴木 淳, 村田以和夫, 安田一郎: 東京衛研年報, 47, 35-42, 1996.
- 3) E. Schraufstatter, H. Brent: *Nature*, 164, 456, 1949.
- 4) 浅川直樹, 津野昌紀, 服部禎一, 他: 薬学雑誌, 101, 374-377, 1981.
- 5) 鈴木 淳, 村田以和夫, 安田一郎: 東京衛研年報, 50, 41-48, 1999.
- 6) 奥田拓男 編: 天然薬物事典, 179, 1986, 廣川書店, 東京.
- 7) 村田以和夫, 宮沢貞夫, 安田一郎, 他: 東京衛研年報, 39, 15-18, 1988.
- 8) J. J. P. Stewart: *J. Comput. Chem.*, 10, 221, 1989.
- 9) M. J. S. Dewar: *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902, 1985.
- 10) Noro T., Miyase T., Kuroyanagi M., *et al.*: *Chem. Pharm. Bull.*, 31(8), 2708-2711, 1983.
- 11) Kiuchi F., Nakamura N., Tsuda Y., *et al.*: *Chem. Pharm. Bull.*, 36(1), 412-415, 1988.