

植物からの活性成分の抽出と単離

技術センター 医学部等部門

総合薬学科技術班 末吉 恵津子

大学院医歯薬学総合研究科の生薬学研究室では、特に東南アジア及び琉球で採集した植物を抽出し、活性を持つ画分を分離・精製して、活性本体並びに活性部位の構造を検討する研究を行っています。その一連の実験操作について紹介します。

1. 植物の選択

日本本島は概ね温帯気候に属し、南北2000kmに及ぶ地理的条件の上に、降水量も多く四季を持つため、種々の植物が生育しやすい環境にあります。これに対し、沖縄を含む一部の地域では、いわゆる亜熱帯モンスーン気候(温帯夏雨気候)となるため、その植生は本土とは著しく異なります。特に海水と淡水が混ざり合う汽水域では、複数の植物がマングローブと呼ばれる林を形成し、非常に特殊な景観を作っています。植物学的に見ても、これらマングローブに生育する植物にはある種の共通した特徴を持つものがあり、その含有成分には活性を持つと期待される物も含まれていると考えています。

そこで、その中で興味深いと思われる植物を選択し、その成分を抽出して行きます。

(なお、当研究室の大塚英昭教授の意向により、現地の研究者の御協力のもと、乱獲による資源の枯渇を防ぐため、再生しやすい地上部(特に葉や小枝)を中心に採集し、研究材料として使用しています。)

2. 成分の抽出

植物材料はまず、メタノールでその含有成分を抽出した後、更に適当な溶媒を用いて抽出を

繰り返すことによって、おおまかに分けられます。具体的にはヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノール、水などの溶媒を用いて、各溶媒の抽出エキスとして分離します。この段階ではまだ化合物は断定できませんが、その構造や性質を溶解している溶媒からある程度推測し、薄層クロマトグラフィー (TLC; Thin Layer Chromatography) 上に展開してみることで、用いるエキスやターゲットとなる化合物のスポットを決定します。

3. 化合物の単離と精製

使用する抽出エキスが決定したら、クロマトグラフィー法により、適当な溶媒と担体を用いて、化合物を単離して行きます。良く用いる方法としては、溶媒の送流方法によりオープンカラムクロマトグラフィー、フラッシュカラムクロマトグラフィー、高速液体カラムクロマトグラフィー (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) などが挙げられます。

オープンカラムは人為的な圧力をかけずに溶媒の重みで送流する方法、フラッシュカラムは低圧のポンプで送流する方法、HPLCは高圧ポンプで送流する方法であり、一般的に混合成分の量とカラムのサイズ、化合物の溶出時間を考慮して、方法と溶媒を選択します。

これらのカラムは更に担体によって、順相カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、液滴向流クロマトグラフィー (DCCC; Droplet Counter-current Chromatography) などに分けられます。順相カラムには一般的にシリカゲルを用いることが多く、化合物は極性の低い物ほど早く、極性の

高い物ほど遅く溶出してきます。逆相カラムには ODS (Octadecylsilyl Silica Gel) を用い、シリカゲルとは逆に、化合物は極性の低い物ほど遅く、極性の高い物ほど早く溶出してきます。

DCCCはその名のとおりに、移動層である液滴が固定層を通過して行く間に、化合物が分配係数の差のみによって分離される方法で、原理的に化合物のロスが無いので、少量のサンプルの精製に適しています¹⁾。



Fig. 1 当研究室の DCCC

このようにして得られた各化合物は、いくつかの分析方法を用いることで、その構造を決定して行きます。

3. 構造の決定

純度の高い化合物が得られたら、核磁気共鳴法 (NMR; Nuclear Magnetic Resonance) を用いてその化合物の NMR スペクトルを測定することにより、構造を決定しています。これは一つの化合物につき、一次元と二次元 NMR を数種類測定し、それらスペクトルを総合的に解析することによって、立体構造を含めた構造決定を行っています。

更にもその構造決定が正しいことの裏づけとして、比旋光度 $[\alpha]_D$, 赤外吸収スペクトル IR, マススペクトル FAB-MS, 紫外吸収スペクトル UV, 円偏光二色性 CDなどの物性データを測

定することにより、構造決定を確実な物としています。



Fig. 2 医療分子探索施設の NMR 機器

4. 活性の測定

構造的に面白いと思われる化合物が単離されたら、それがどのような活性を持つのか調べるために、活性の測定を行っています。

当研究室では、一次スクリーニングとしてブラインシュリンプや各種培養細胞および細菌を用いたアッセイを行っていますが、著者は特にラット好塩基性白血病細胞 (RBL-2H3; Rat Basophilic Leukaemia)を用いたヒスタミン遊離抑制活性を測定しています。これはデータのばらつきも少なく簡易に出来るアッセイ法で、動物の犠牲も最小限に抑えられると言う利点があります。

本細胞をマスト細胞代わりに、アレルギー反応のモデルとして用います。これにIgE抗体を感作させ、試料溶液を加えた後、抗原を添加して抗原抗体反応を起こさせ、その際に放出されるヒスタミンがどれくらい抑えられているかを、

測定しています。実際にはヒスタミンと同時に等量的に放出される β -hexosaminidaseの活性を、吸光度計を用いて間接的に測定しています
2) 3) .

参考文献

- 1) 谷村 徳徳, 大塚英昭, 萩原幸夫
新しい分離法の紹介: 液滴向流クロマトグラフィ
化学の領域, 29 (12), 895-902, 1975 (南江堂)
- 2) Ozawa, K., Szallasi, Z., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Mischak, H., Mushinski, J. F. and Beaven, M. A.
"Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent Isozymes of Protein Kinase C Mediated Exocytosis in Antigen-stimulated Rat Basophilic RBL-2H3 Cells"
J. Biol. Chem., **268**, 1749-1756 (1993)
- 3) Yamamura, S., Simpol, L. R., Ozawa, K., Otsuka, H., Kasai, R., Yamasaki, K. and Padolina, W.
"Antiallergic Dimeric Prenylbenzoquinones from *Ehretia microphylla*"
Phytochemistry, **39**, 105-110 (1995)