

ゲアラニーインディオの伝承薬の調査と *Scoparia dulcis* 由来ジテルペン類に関する研究

林 利光

**Investigation on Traditional Medicines of Guarany Indio and
Studies on Diterpenes from *Scoparia dulcis***

Toshimitsu HAYASHI

Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama,
2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

(Received April 28, 2011)

In interviews on the traditional herbal medicines of Tupi-Guarany Indians at the herbal market of Asuncion and questionnaire from their users, it was clarified that various useful medicinal plants are available in Paraguay and most of them are generally used without drying. In the search for bioactive substances from those plants, a β -glucuronidase-inhibitory diterpene called scoparic acid A (SA) was isolated from *Scoparia dulcis* L. together with scoparic acid B, scoparic acid C, and the aphidicolin-like tetracyclic diterpenes scopadulcic acid A (SDA) and scopadulcic acid B (SDB). HPLC analysis of diterpenes in the individual plants of Paraguayan and Asian *S. dulcis* revealed the presence of three chemotypes based on major component, *i.e.*, SA type, SDB type, and SDX type containing mainly scopadiol and scopadulciol (SDC). SA and SDB were elucidated to be mainly biosynthesized in the leaves *via* 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, and a leaf organ culture system containing methyl jasmonate 10 μ M was found to enhance the production of diterpenes by activation of Ca-signal transduction systems such as calmodulin and protein kinase C. On the other hand, SDB and SDC were found to show multifaceted pharmacological effects such as inhibitory effects on gastric acid excretion, bone resorption, replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1), *etc.* In addition, SDC was suggested to be applicable to cancer gene therapy using ganciclovir or acyclovir and the HSV-1 thymidine kinase gene called the suicide gene.

Key words—*Scoparia dulcis* L.; bioactive diterpene; cancer gene therapy; leaf organ culture; traditional herbal medicines of Guarany Indio

1. はじめに

パラグアイは、南米のブラジル、アルゼンチン、及びボリビアに囲まれた内陸国で、人口は700万人(2009年)、面積は日本の1.1倍である。国の中心部にパラグアイ河が流れて国を二分しているが、河の東部地域は国の約40%を占めており、数千種類の植物が生育している。古来、この地域は、アマゾン河上流の文化圏として、ゲアラニーインディオの長い歴史、生活の中から産み出され、伝承されてきた各種の病気によいとされる薬草が多数見出されることから「薬草の宝庫」として、世界的にその名

が知られている。例えば、パラグアイは、近年、日本でも栽培されるようになった甘い草「ステビア *Stevia rebaudiana* L.」の原産地であり、清涼飲料として多くの人々に愛用されている「テレレ」の素材であるマテ茶を始め、各種の疾患に適応される薬草が豊富に自生している (Fig. 1)。

しかしながら、これらの民間伝承薬に関する書籍や植物学的な分類、観察、調査等の文献が乏しく、いわゆる生薬学的研究、さらには、薬草の有効成分に関する化学・薬学的研究も遅れていた。一方、パラグアイの有識者達は、先述のステビアを原料とする人工甘味料の開発がわが国など先進国で進捗しつつあったことに触発されて、国内の薬用資源の有効活用と保護の必要性を強く訴えるに至った。

そこで、昭和59年(1984年)、当時の国際協力事業団(JICA、現独立行政法人国際協力機構)は、

富山大学大学院医学薬学研究部 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

e-mail: hayashi9@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、平成22年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。



Fig. 1. Tereré

国際協力事業の一環として「パラグアイ薬草に関する協力研究プロジェクト」を立ち上げることを目的として、森田直賢教授（当時）を団長とする調査団を現地に派遣し、事前調査を行った。翌年、その調査結果を基に、アスンシオン大学と富山医科薬科大学（現富山大学）との協力研究プロジェクトが正式に調印され、スタートした。具体的には、アスンシオン大学化学・薬学部の研究棟の建設や薬用植物園の整備が行われるとともに、各研究部門における研究に必要な機材が供与された。また、パラグアイ薬草に関する聞き取り調査や研究指導を目的として日本側から技術専門家の派遣が行われる一方、アスンシオン大学から毎年2-3名の研修員を本学に受け入れて研修が実施されるなど、3年間にわたって研究の技術協力が推進された。なお、筆者は、昭和60年（1985年）9月10日から11月9日までの2ヵ月間と昭和61年（1986年）4月10日から10月14日までの6ヵ月間、現地に滞在し、アスンシオン市内の薬草市場での薬草販売者に対する聞き取り調査結果を基にして「住民を対象とした薬草の利用状況に関するアンケート調査」を実施した。また、研究材料となる薬用植物の自生地での観察と採取、及びそれらの抽出エキスの調製などを行った。本プロジェクトが終了してから既に25年余りが経過したが、本稿では、現地でのパラグアイ薬草に関する調査結果の概要と、その後、筆者が特に注目して取り組んできた *Typichá kuratû* (*Scoparia dulcis* L.) の研究成果の一端を紹介する。



Fig. 2. Herbal Market in Asunción

2. パラグアイ薬草の市場での聞き取り調査と利用状況に関するアンケート調査

アスンシオン市内の第4市場では、その日の早朝に採集人によって採取された薬草（野生品）が路上販売されている。当地に国際協力事業団専門家として派遣された吉崎らは、ここで販売されている薬草について、アスンシオン大学化学薬学部植物部門の Basualdo 教授らと共同で薬草販売者に対する聞き取り調査を行った (Fig. 2).¹⁾

調査項目は、薬草の名称、利用部位、薬効・適応症、及び利用法（調製法）である。10ヵ月間にわたる調査期間中に確認された薬草の種類は280種であった。また、それぞれの薬草の名称はグアラニー語であった。

聞き取り調査により確認された薬草の薬効・適応症の内訳は、婦人病31種（11.1%）、気管支炎・咳30種（10.7%）、胃疾患30種（10.7%）、鎮静21種（7.5%）、肝臓病20種（7.1%）、血液20種（7.1%）、抗炎症16種（5.7%）、心臓病14種（5.0%）、腎臓病13種（4.6%）、清涼13種（4.6%）、糖尿病13種（4.6%）、外用10種（3.6%）、駆虫7種（2.5%）、高血圧5種（1.8%）、瀉下5種（1.8%）、止瀉5種（1.8%）、痛風5種（1.8%）、その他22種であった。本調査により、婦人病、呼吸器疾患、及び胃疾患に適応される薬草の種類が多いことがわかった。

一方、これらの薬草を利用部位別に分類してみると、地上部74種（26.4%）、全草46種（16.4%）、葉43種（15.4%）、花・花穂28種（10.0%）、根28種（10.0%）、皮22種（7.9%）、種子11種（3.9%）、果実11種（3.9%）、根茎4種（1.4%）、その他13

種であった。この聞き取り調査により明らかになったことは、地上部、全草、葉、花・花穂など採取が比較的容易な部位が多いことである。この点は、利用部位として、根や根茎が比較的多い漢方薬とかなり異なっているが、これは、利用法の違いによると思われる。すなわち、パラグアイでは、採取後間もない比較的新鮮な薬草が使用されるのに対し、漢方薬は採取後、乾燥や湯通しなどの加工処理を施したものが使用される。一方、前者は日常的に飲用されるテレレなどに使用されるなど、健康茶としての予防的利用法が一般的である。また、漢方薬は、医師の診断結果に基づいて処方され、品質評価法が定められているが、パラグアイ薬草にはそのような品質評価法の規定はない。

次に、筆者は JICA の派遣専門家として現地に滞在中、吉崎らにより薬草市場で確認された個々の薬草について、利用者に対するアンケート調査を行った。すなわち、アスンシオン市内の住人 1000 人にアンケート用紙を配布し、薬草別に、利用の有無、利用部位、利用目的・適応症、及び利用（服用・調製）方法について、記入又は聞き取りをして回答してもらった。²⁾ 回答者数は 701 名であった。本アンケート調査を通して、回答者の多くは薬草の知識が豊富で、自分達の健康維持や疾病予防のためにこれらの薬草を日常的に利用していることがわかった。

Table 1 に利用目的別の薬草の種類数を示したが、清涼、消化、胃疾患、及び利尿を目的としたものや、種々の感染症や炎症性疾患を適応対象とする薬草が多かった。

最近、わが国において患者数が多い肝臓病、糖尿病、高血圧、リウマチや肥満などを対象としたものが多くみられたことは注目すべき点である。また、墮胎を目的とした薬草が 28 種も認められたのは特記すべきことである。これは、パラグアイの人々の生活水準が低い上、子供の出生率が高いという状況が反映されているのかもしれない。さらに、多くの薬草は、適応症が 1 種類のみということではなく、いずれも複数の疾患に適応されることが判明した。この点は、天然医薬に共通した特徴である。一方、利用法としては、テレレが一般的であるが、茶剤や煎剤として服用されるものも多く認められた。

これらの調査結果は、パラグアイの薬草が人々の健康維持や疾患の改善に有用であることを示してお

Table 1. Summary of the Questionnaire on the Objective of Usage of Medicinal Plants in Paraguay

利用目的	薬草の種類数(%)	利用目的	薬草の種類数(%)
清涼	61 (22.8)	皮膚病	9 (3.4)
消化	51 (19.1)	鎮瘻	9 (3.4)
胃疾患	45 (16.9)	コレステロール	8 (3.0)
利尿	34 (12.7)	解熱	8 (3.0)
墮胎	28 (10.5)	便秘	8 (3.0)
心臓疾患	26 (9.7)	消毒	8 (3.0)
鎮静	26 (9.7)	炎症	7 (2.6)
鎮咳	23 (8.6)	気管支炎	6 (2.2)
下痢	23 (8.6)	盲腸炎	6 (2.2)
肝臓疾患	22 (8.2)	打撲	5 (1.9)
腹痛	22 (8.2)	殺菌	5 (1.9)
リウマチ	18 (6.7)	扁桃腺炎	5 (1.9)
駆虫	17 (6.4)	寒気・悪寒	5 (1.9)
喉疾患	17 (6.4)	肥満	5 (1.9)
カタル	16 (6.0)	頭痛・偏頭痛	5 (1.9)
糖尿病	14 (5.2)	赤痢	4 (1.5)
喘息	13 (4.9)	がん	3 (1.1)
高血圧	13 (4.9)	視力回復	3 (1.1)
浄血	13 (4.9)	歯痛	3 (1.1)
外傷	13 (4.9)	こしけ・白帯	3 (1.1)
出血	11 (4.1)	性病	3 (1.1)
月経異常	11 (4.1)	痔疾	3 (1.1)
腎臓疾患	10 (3.7)		

り、有効活用のための医薬学的研究の必要性が痛感された。

3. β -glucuronidase 阻害活性スクリーニングと *Scoparia dulcis* L. との出会い

パラグアイで採取した 60 種の薬草について、それぞれ 70% EtOH 抽出エキスを調製し、 β -glucuronidase 阻害活性スクリーニングを実施した。 β -glucuronidase は、肝臓の重要な機能の 1 つである薬物代謝に関与する酵素で、グルクロン酸抱合体の加水分解を触媒することから、その阻害物質は、グルクロン酸抱合体の体外排泄を促進することになる。したがって、そのような阻害活性が認められた薬草には肝機能改善物質が含まれていることが予想される。 β -glucuronidase は肝臓、脾臓、消化管、血液など体内に広く分布している^{3,4)}が、肝疾患患者の β -glucuronidase 値は血清黄疸指数と平行して消長するとの報告もある。⁵⁾ 肝性黄疸のような場合、外因性又は内因性の有害物質が肝臓でグルクロン酸抱合体となり、肝胆から腸管内に排泄されても



Fig. 3. *Scoparia dulcis* L.

腸管や腸内細菌の β -glucuronidase によって再び加水分解され、有害物質が腸管から再吸収される傾向が強くなっていると思われる。スクリーニング試験の結果、グアラニー語で *Typychá kuratû* と呼ばれる薬草 (*Scoparia dulcis* L.) の 70% EtOH 抽出エキスが比較的強い阻害活性を示した (10 μ g/ml における阻害率: 79.5%) (Fig. 3).⁶⁾

本薬草はゴマノハグサ科の多年草で、熱帯及び亜熱帯地域に広く分布し、いずれの地域においても民間伝承薬として今でも利用されている。南米や東南アジア産の薬草の解説書には、本薬草は健胃、利尿、鎮咳、解熱、解毒などを目的として使用されるほか、適応症として、胃疾患、糖尿病、高血圧、肝臓機能障害、麻疹などが記載されている。^{7,8)}

本薬草の 70% EtOH 抽出エキスについて、 β -glucuronidase 阻害活性を指標にしながら活性成分の分離を試みたところ、 CHCl_3 可溶部からラプダン型の新規ジテルペン scoparic acid A (SA) と類縁の 2 種のジテルペン (scoparic acid B, scoparic acid C) とともに、2 種の四環性ジテルペン [scopadulcic acid A (SDA) 及び scopadulcic acid B (SDB)] が単離された。^{9,10)} SDA や SDB の化学構造は、各種スペクトル解析により、極めて特異な炭素骨格を有することが判明した (Fig. 4)。なお、これらのジテルペン類のうち SA のみが顕著な β -glucuronidase 阻害活性を示した。¹¹⁾

4. Scopadulcic acid B 及び関連物質の生物活性

S. dulcis は、「消化、健胃、胃疾患」が南米やアジア地域において共通の適応症として伝承されている。そこで、ラットを用いて SDB の胃酸分泌に及ぼす作用を評価したところ、顕著な阻害作用を示す

ことが確認された。また、その作用機序はプロトンポンプ (Na^+ , K^+ -ATPase) 阻害作用であることが判明した。¹²⁾ さらに、ラットを用いて SDB の体内動態を調べたところ、SDB は経口投与した場合、消化管から吸収されるが、代謝を受けることなく排泄され、その bioavailability は比較的高い値 (53%) を示すことがわかった。¹³⁾

一方、SDB の炭素骨格は、カビの代謝産物であって DNA polymerase α 阻害作用により単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) に対して増殖阻害作用を示す aphidicolin のそれと類似していた (Fig. 4)。そこで、SDB について、これらの作用の有無を調べた結果、SDB は *in vitro* でも *in vivo* でも抗 HSV-1 作用を示すことが確認された。¹⁴⁾ これらの実験結果は、本伝承薬の適応症として「麻疹」が記載されていることと関連があると思われるが、適応症とされている疾患の発症の原因が不明であっても、人々が長年にわたって経験的に検証してきたものであり、伝承薬の有用性を裏付ける科学的根拠となる好例である。

さらに、SDB は抗腫瘍作用、¹⁵⁾ 発がんプロモーター抑制作用、¹⁶⁾ 骨吸収抑制作用¹⁷⁾ などの多彩な生物活性を有することがわかった。骨吸収はプロトンポンプの作用亢進と関連があり、プロトンポンプ阻害剤である omeprazole に骨吸収抑制作用があることが報告されている。^{18,19)} それゆえ、SDB の骨吸収抑制作用はプロトンポンプ阻害作用によると推察された。なお、SDB 及びその化学修飾体について、*in vitro* での抗 HSV-1 作用、²⁰⁾ プロトンポンプ阻害作用、²¹⁾ 及び骨吸収抑制作用²²⁾ に関する構造活性相関を調べたところ、C-4 位のカルボキシル基、C-6 位のベンゾイル基と C-13 位のカルボニル基が作用発現に重要な役割を演じていることが推測された。

5. Scoparia dulcis におけるジテルペン類の蓄積部位の検討とケモタイプの発見

パラグアイ産 *S. dulcis* から単離された SA や SDB などの生物活性ジテルペン類は、いずれもベンゾイル基とカルボキシル基を結合しており、生合成的に相互に関連があると思われた。また、種子から発芽・生長させた個々の植物体について、ジテルペンの部位別含量を分析・比較したところ、先端部の若い葉ほど含量が多く、根は検出限界以下であった。一方、パラグアイで採取した個々の植物体の葉

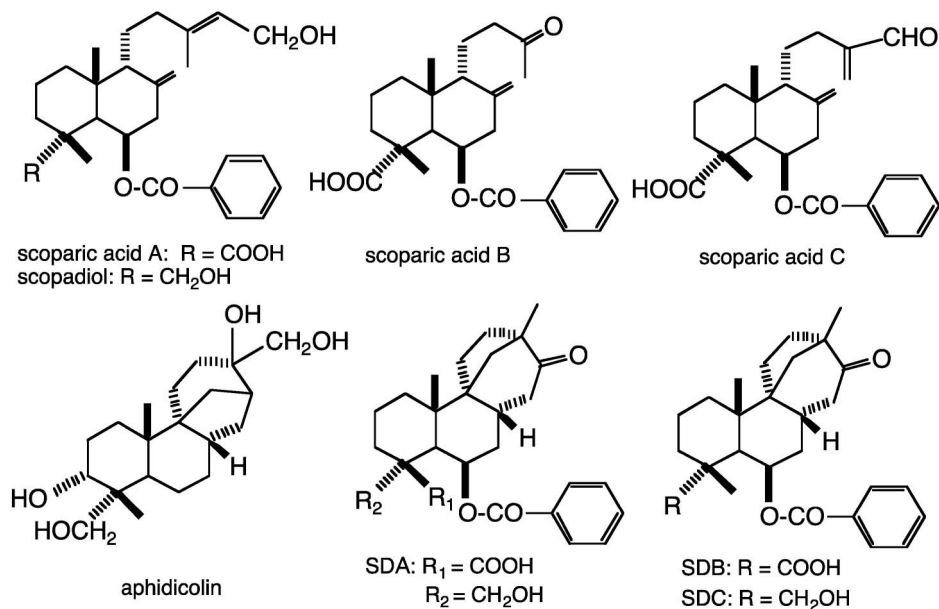


Fig. 4. Structures of Diterpenes from *S. dulcis* and Aphidicolin

について、含有ジテルペン類の HPLC による定量分析を行った結果、相対的に SA を高含量蓄積しているケモタイプ (SA タイプ) と SDB を高含量蓄積しているケモタイプ (SDB タイプ) が存在することが判明した。²³⁾ そこで、台湾、タイ、中国、インドネシアで採取された *S. dulcis* から種子をとり、それぞれ播種し、生長後の葉に含まれるジテルペン類を分析してみたところ、SA タイプや SDB タイプのほか、両成分が検出されず、代わりに、それぞれの還元体に相当する一対のジテルペンを含む第 3 のケモタイプ (SDX タイプ) が存在することが見出された。すなわち、SDX タイプの植物体の葉には、SA と SDB のカルボキシル基がそれぞれヒドロキシルメチル基に置換した構造をもつジテルペン [scopadiol 及び scopadulciol (SDC) と命名] が含まれていることがわかった (Fig. 4)。²⁴⁾ なお、SDC は、SDB に認められたプロトンポンプ阻害作用、²¹⁾ 骨吸収阻害作用²²⁾ や抗 HSV-1 作用²⁵⁾ などの多様な生物活性を示す多機能性分子であることが明らかになった。

6. *Scoparia dulcis* 由来新規四環性ジテルペン類の全合成

S. dulcis から単離された SDA, SDB, 及び SDC は、それらの構造上の新規性と多彩な生物活性から合成化学者の注目を集め、全合成の格好のターゲットとされた。すなわち、カリフォルニア大学の

Overman らは、Pd 触媒を用いる Heck reaction を応用した方法により SDA と SDB の全合成を達成した。^{26,27)} また、エール大学の Ziegler と Wallace は、SDA, SDB, 及び SDC の全合成に成功した。²⁸⁾ しかしながら、いずれの場合も、彼らが最終的に得たのはラセミ体であり、しかも、その全行程における収率は低いものであった。

7. *Scoparia dulcis* 由来ジテルペン類の組織培養による生産と生合成経路の解明

今日、どのような化学構造をもつ天然有機化合物であっても、高分子量の糖鎖化合物は別として、ほとんどのものは化学合成が可能である。一方、高等植物や微生物は、極めて複雑な化学構造を有する多様な化合物を非常に緩和な条件下で効率的に生合成している。

筆者らは、*S. dulcis* に含まれている有用ジテルペン類について、組織培養法による効率的生産方法の確立を目指して様々な実験を試みた。すなわち、カルス寒天培養及び液体培養、マルチプルシュート培養、毛状根培養などによるジテルペン類の生産方法を検討したところ、脱分化したカルスでは、ジテルペン類の生産は顕著に抑制され、毛状根では検出限界以下であった。一方、マルチプルシュートの培養系では親植物と同等のレベルの生産が認められた。^{29,30)} これらの実験結果から、*S. dulcis* のジテルペン類の生合成は、葉の分化と関連していることが

示唆された。そこで、葉の器官培養系を確立するため、植物の細胞分裂や分化に重要な役割を果たしているサイトカニン類 [2-isopentenyladenine, kinetin, ⁶N-benzyladenine, N-phenyl-N'-(4-pyridyl) urea (4PU)] をそれぞれ Murashige-Skoog 液体培地に添加して培養組織の増殖とジテルペン類の生産に及ぼす影響を調べた。その結果、*S. dulcis* の葉の器官培養においては 0.1 μM 4PU 添加培地が最も効率的であることがわかった。³¹⁾ なお、添加する 4PU の濃度を 0.5 μM 以上にすると培養組織の脱分化が誘導されるとともにジテルペンの生産能が著しく低下した。したがって、*S. dulcis* に含まれるジテルペン類の生合成には、葉緑体に存在している酵素類の関与が推察された。

近年、天然有機化合物の生合成研究は、方法論的にかなり進展し、多くの生合成関連遺伝子がクローニングされ、それらの改変による “unnatural natural products” の生産も可能になりつつある。他方、テルペノイドあるいはイソプレノイドと呼ばれる化合物の生合成は、長らくメバロン酸経路によるとされてきたが、約 10 年前にストラスブルグ大学の Rohmer らにより、高等植物のモノテルペンやジテルペンの多くは、メバロン酸を経由しない非メバロン酸経路 [2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) 経路] により生合成されることが発見・報告された。^{32,33)}

S. dulcis が産生するジテルペン類の生合成経路を確認する目的で、[1-¹³C]glucose を培養組織に添加し、一定期間培養した後、ジテルペン類を抽出・分離し、¹³C-NMR スペクトルを解析した。なお、*S. dulcis* の成分として、β-sitosterol と phytol が含まれているが、前者はメバロン酸経路 (MVA 経路) で生合成されるのに対し、後者は MEP 経路により生合成されるはずである。そこで、標識化合物のジテルペン類 (SA, SDB) への取り込みパターンを調べ、β-sitosterol と phytol への取り込みのパターンと比較した。Table 2 に示したように、SA と SDB は phytol と類似の取り込みパターンを示したことから、*S. dulcis* のジテルペン類は MEP 経路により生合成されることが確認された。³⁴⁾

この結論は MVA 経路の阻害剤 (pravastatin) と MEP 経路の阻害剤 (fosmidomycin) を用いて実施した実験においても裏付けられた。³⁵⁾

Table 2. Average ¹³C-isotopic Abundances Measured in Isoprenic Units of Isoprenoids Produced by *S. dulcis* after Feeding with [¹³C] Glucose

Terpenoid	¹³ C-abundances in C-atoms of C ₅ unit				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
SDB-Me	1.98	0.80	1.00	0.89	2.60
SA-Me	1.59	0.78	1.00	1.03	1.88
phytol-Ac	2.09	0.93	1.00	1.21	2.21
β-sitosterol-Ac	1.27	3.08	1.00	2.85	3.54

一方、有用植物の二次代謝産物の生産にジャスモン酸類、特に methyl jasmonate (MeJA) の添加が効率的であることが報告された。^{36,37)} そこで、種々の濃度の MeJA を培地に添加し、*S. dulcis* の葉を一定期間培養後の組織重量とジテルペンの生産量に及ぼす効果を調べた。また、比較のため、培養組織中の phytol, β-sitosterol 及び光合成色素類 (chlorophylls, carotenoids) の生産量も調べた。一般に MeJA は組織や細胞の増殖を抑制することが報告されており、本実験においても、MeJA の濃度に依存して組織重量が減少した。また、光合成色素や phytol 及び β-sitosterol の含量も MeJA の濃度依存的に減少したのに対し、ジテルペン類の含量は、10 μM MeJA 添加群のみが対照群に比し有意に多いという結果が得られた (Table 3 and Fig. 5).³⁸⁾

MeJA が *S. dulcis* の特殊成分である SDB の生合成に及ぼすこのような作用は、高等植物に普遍的に含まれている光合成色素や phytol の生合成に対する効果と異なるものであり、MeJA の二次代謝産物の生合成に及ぼす作用に関する新たな知見であるが、その作用機序は不明である。

次に MeJA の SDB 産生促進作用のメカニズムを明らかにするために、二次代謝産物の生合成に関与しているシグナル伝達系に及ぼす MeJA の効果を検討した。まず、*S. dulcis* の葉の器官培養系に Ca²⁺-channel 阻害剤 (verapamil) を添加したところ、MeJA の SDB 産生促進作用が抑制された (Table 4)。また、Ca²⁺-ionophore (A23187) の添加により SDB の産生が促進された。

さらに、calmodulin (CaM) のアンタゴニスト (trifluoperazine) 又は protein kinase C 阻害剤 [staurosporine, 2,6-diamino-N-([1-(1-oxotridecyl)-2-piperdiny] methyl) hexanamide (NPC-15437)], を添

加した場合には、MeJAの作用が阻害されたのに対し、proteine kinase Cの活性化剤である1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG)は、MeJA無添加の場合でもSDBの産生を促進した。³⁹⁾ これらの実験結果から、MeJAによるSDB産生促進作用にCa²⁺やCaMによるシグナル伝達系やproteine kinase Cによるタンパク質のリン酸化の関与が示唆された。

そこで、MeJAの作用発現へのCaMの関与を検証するために、*S. dulcis*におけるcalmodulin遺伝子(*sd-cam*)をクローニングして葉の器官培養系での発現を検討したところ、MeJA処理により本遺伝子の発現が顕著に増大することが確認された。⁴⁰⁾

以上のように、組織培養法による生物活性ジテルペン類の効率的生産方法を検討した結果、それらを大量に得るためには、*S. dulcis*の葉の器官培養系が比較的効率的であった。しかしながら、生産コストを考慮すれば、現時点では、それぞれのケモタイプの植物体からSDB又はSDC高生産株を選抜し、それらの種子繁殖又は挿し木による繁殖が現実的ではないかと思われた。なお、花卉や野菜類については、種々の形態や色調を有するものが植物工場で生産されるケースが多くなっているため、薬用植物の

生産に応用することは技術的に可能であると思われるが、医薬品としての効果・効能の検証がネックになっている。

一般に、植物がこのような複雑な化学構造をもつ生物活性物質を「なぜ」また「どのように」生産するのかという自然界における疑問について、学問的に追求することは決して無意味ではないと思うが、SDBやSDCの生物活性の発現機序を分子レベルで解明し、それらを生命現象の解明や医療における問題を解決するために応用することも極めて重要な視

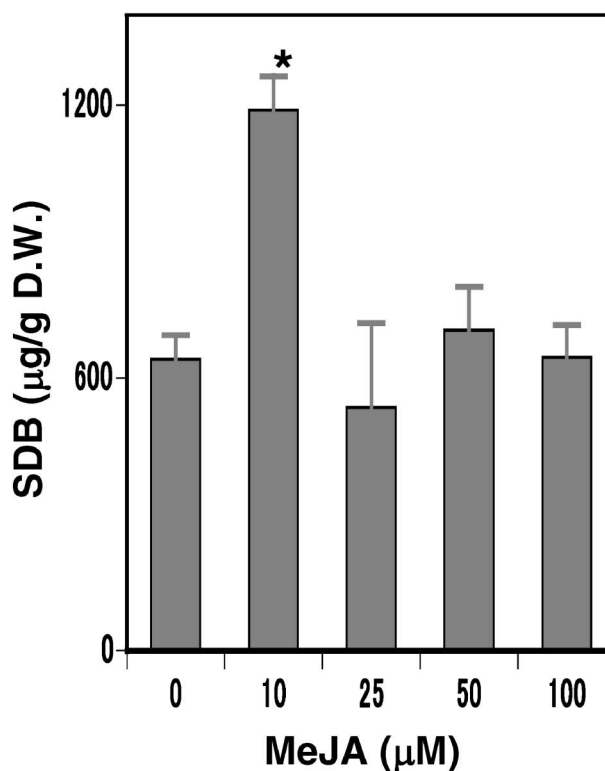


Fig. 5. Effect of MeJA on SDB Production

The tissues were treated for 4 d with different concentrations of MeJA 6 d after inoculation. After 4 d of MeJA addition, SDB was quantified. Data represent the mean ± S.D. *n*=4, **p*<0.001.

Table 3. Effects of MeJA on Tissue Growth and Content of Photosynthetic Pigments in Cultured Tissues of *S. dulcis*

MeJA (µM)	Growth (mg F.W.)	Chlorophylls (µg/g F.W.)	Carotenoids (µg/g F.W.)
0	845.0 ± 95.6	562.5 ± 49.4	97.9 ± 11.4
10	815.0 ± 108.5	394.5 ± 20.2*	73.0 ± 6.5*
25	802.5 ± 98.8	387.4 ± 20.2*	69.1 ± 2.7*
50	785.0 ± 131.8	299.2 ± 11.9**	50.8 ± 3.6**
100	677.5 ± 86.5*	252.5 ± 23.1**	49.6 ± 8.3**

The tissues were treated for 4 d with different concentrations of MeJA 6 d after inoculation. F.W. means fresh weight. Data represent the mean ± S.D., *n*=4, **p*<0.05, ***p*<0.01.

Table 4. Effect of Verapamil on Tissue Growth and Content of SDB in Cultured Tissues and Culture Media

Culture conditions		Growth (mg dry weight)	SDB content (µg)	
MeJA (10 µM)	verapamil (mM)		tissues	medium
—	—	200.0 ± 30.0	3138.4 ± 110.6	59.9 ± 8.6
+	—	146.7 ± 15.3	3926.4 ± 171.4	50.3 ± 2.5
+	50	146.7 ± 11.5	2980.2 ± 268.0*	54.4 ± 12.7
+	100	143.3 ± 15.3	2260.6 ± 61.5**	55.2 ± 11.3

Leaf organ cultures of *S. dulcis* were treated for 4 d with different concentrations of verapamil in the presence of 10 mM MeJA 6 d after inoculation. SDB content was calculated as total amount per fask and medium (50 ml). Data are expressed as mean ± S.D., *n*=3. Significant difference was calculated from MeJA-treated tissues. **p*<0.05, ***p*<0.001.

点であると思う。

8. SDC のがんの遺伝子治療への応用の試み

SDC の抗 HSV-1 作用を調べた際に、抗ヘルペス薬として臨床応用されている acyclovir (ACV) と SDC を併用すると、ACV の作用が増強されることが見いだされた (Table 5).²⁵⁾

そこで、このような SDC による ACV の抗 HSV-1 活性増強作用の発現機序を解明するため、HSV-1 感染細胞に SDC と ACV を併用投与した場合の細胞内における核酸の 3 リン酸化体の濃度を分析し、SDC 単独投与の場合と比較した。結果を Table 6 に示したが、SDC 単独投与の場合、dCTP、dATP 及び dGTP の濃度に変化はなかったが dTTP の濃度が有意に減少した。これに対し、併用投与に

より、dCTP の濃度が有意に上昇するとともに、dTTP、dATP 及び dGTP の濃度も有意に上昇した。さらに、ACV の活性本体である 3 リン酸化体 (ACV-TP) の濃度が ACV 単独投与の場合に比し 4 倍も増大することが判明した。

したがって、SDC は ACV のリン酸化に関与する HSV-1 由来 thymidine kinase (HSV-TK) を活性化し、結果的に細胞内の ACV-TP の濃度が増大し、ウイルスの増殖も顕著に抑制されたのではないかと推察された。なお、HSV-TK をコードする遺伝子 (HSV-*tk*) は、自殺遺伝子と呼ばれ、ganciclovir (GCV) によるがんの遺伝子治療に用いられたことがあるが、^{41,42)} GCV の細胞毒性が強すぎることでネックとなっていた。一方、ACV は比較的毒性が弱いことから GCV より安全であるとされていたが、遺伝子治療の効果が弱いという問題があった。筆者らは、SDC の作用特性に注目して、培養腫瘍細胞に HSV-*tk* を導入し、ACV 又は GCV と SDC を併用投与すれば、SDC の細胞毒性を軽減させ、ACV の効果を増強させることになるので、臨床応用上の問題点を解消できるのではないかと考えた。

種々の腫瘍細胞由来株化細胞に HSV-1-*tk* を導入後、抗ウイルス薬単独投与群と SDC との併用群の細胞毒性の程度を比較したところ、いずれの腫瘍細胞に対しても、併用群は単独投与群と比較して、細胞毒性を有意に増強することが判明した。⁴³⁾

そこで、この併用効果を *in vivo* で検証するため、HSV-1-*tk* を導入した子宮頸部がん由来細胞 (HeLa 細胞) をヌードマウスに移植した後、ACV と SDC 又は ganciclovir (GCV) と SDC を併用した群を

Table 5. Synergistic Interaction between SDC and ACV

SDC (μM)	ACV (μM)	Virus titre (PFU/ml)	Fold decrease	CI ^a	2×SE ^b	Combined effect
—	—	2.88×10^7	1.0	—	—	—
0.05	—	3.73×10^6	8.0	—	—	—
0.1	—	1.01×10^6	31	—	—	—
—	0.4	1.83×10^7	1.7	—	—	—
—	2	2.35×10^6	13	—	—	—
—	10	4.78×10^5	63	—	—	—
0.05	0.4	3.91×10^5	74	1.74	0.08	synergistic
0.05	2	3.93×10^4	767	2.04	0.41	synergistic
0.05	10	5.58×10^3	5824	2.43	0.60	synergistic
0.1	0.4	1.51×10^5	268	1.52	0.27	synergistic
0.1	2	9.12×10^3	3323	2.17	0.43	synergistic
0.1	10	1.30×10^3	24160	2.53	0.52	synergistic

^a CI: Combination Index [When S, A, SA and C are the mean virus yield in the presence of SDC, ACV, both SDC and ACV, and in the absence of drugs (control), respectively, the CI is defined as follows: $\text{CI} = \frac{\ln(S) + \ln(A) - \ln(SA) - \ln(C)}{\ln(S) + \ln(A) - \ln(C)}$]. ^b SE: Standard Error.

Table 6. Effect of SDC and ACV on Intracellular Deoxyribonucleoside Triphosphate Pools

SDC (μM)	ACV (μM)	pmol per 10^6 cells				
		dCTP	dTTP	dATP	dGTP	ACV-TP
0	0	10.0 ± 0.6	551 ± 46	9.6 ± 2.5	9.4 ± 1.1	—
0.1	0	10.1 ± 1.7	464 ± 44^b	8.7 ± 2.2	6.4 ± 2.0	—
0	100	19.7 ± 5.9^a	659 ± 123^a	50 ± 16^a	24.2 ± 2.7^d	(100 ± 16)
0.1	100	46.0 ± 19.2^a	1184 ± 266^c	92 ± 22^d	51.3 ± 4.8^d	$(443 \pm 81)^d$

Cells were infected with 10 PFU of HSV-1 per cell. After 1 h, the indicated concentrations of SDC and ACV were added. After an additional incubation of 8 h, the pool sizes were analyzed. Data were expressed as the mean \pm standard deviations of quadruplicate experiments. ^a Significant increase compared with untreated control on the basis of the Student *t* test ($p < 0.05$). ^b Significant decrease compared with untreated control on the basis of the Student *t* test ($p < 0.05$). ^c Significant increase compared with untreated control on the basis of the Student *t* test ($p < 0.01$). ^d Significant decrease compared with untreated control on the basis of the Student *t* test ($p < 0.005$).

ACV 又は GCV 単独投与群と比較した。その結果、併用群のがん組織に対する増殖抑制効果は、単独投与群のそれに比し有意に増強することがわかった。⁴³⁾ さらに、HSV-*tk* 発現 HeLa 細胞と通常の HSV-*tk* を発現していない HeLa 細胞とを一定の割合 (1:10) で混合した細胞集団をヌードマウスに移植した場合でも同様の増殖抑制効果が認められた。これらの結果は、脳腫瘍や肝臓がんなどの場合にがん組織内のすべての細胞に HSV-*tk* を導入しなくても一定の比率で HSV-TK 発現細胞の混じった腫瘍組織であれば、その増殖を抑制することが可能であることを示している。なお、一部の細胞に対する効果が周囲の細胞に影響が及ぶ現象は bystander effect⁴⁴⁾ として知られているが、本実験で確認された結果は、SDC を ACV 又は GCV と併用してがんの遺伝子治療に応用することが可能であることを示している。

9. まとめ

地球上には様々な民族が居住しているが、それぞれの地域には、例外なく今でも伝承されている多様な天然薬物が存在している。その中で、筆者が特に注目し、研究対象とした *S. dulcis* は、南米に限らず、東南アジアやアフリカなどの熱帯及び亜熱帯地域に広く自生し、しかも、いずれの地域においても、人々の健康維持や疾病症状の軽減・予防を目的として用いられていることがわかった。また、本植物の伝承されている薬効・適応症は多彩であるが、それらの有用性について、部分的ではあるが成分レベルで検証することができた。さらに、作用機序の解明のための研究により発見した成分の作用特性から、現在なお臨床上問題となっているがんの遺伝子治療への応用の可能性を示すことができた。しかしながら、そのような臨床応用が実際に可能となるためには、有用成分の安定供給法の確立や臨床試験が不可欠であるが、残念ながら実現に至らなかった。

これまでの天然物由来生物活性物質の作用の評価は、対症療法的視点からなされることがほとんどであったが、最近、ヒトの遺伝子が解明されてから「ゲノム創薬」が現実的課題となっている。実際、多くの製薬企業においては、ファーマコゲノミクスやトキシコゲノミクス等の手法で候補化合物が評価されるようになってきている。一方、近年、「食と健康」に対する人々の関心が高くなり、効果・効能を表記

することが禁止されている食物の保健機能が注目されるようになってきた。その結果、食品の機能性の評価にニュートリノゲノミクスと呼ばれる手法が取り入れられ、食品由来成分の生物活性を遺伝子レベルで網羅的に評価されるようになってきている。したがって、世界各地の伝承薬の薬効の評価においても、そのような視点が不可欠であることを痛感する。すなわち、天然物由来成分を生体に投与したときにどのような遺伝子群に変化が現れるかを検討し、標的タンパク質との相互作用についても考察する必要があると思われる。他方、東洋医学の基本概念であった「個の医療」が西洋医学においても取り入れられてきており、「オーダーメイド医療」や「テーラーメイド医療」が試みられてきている。そういう意味では、*S. dulcis* の研究は、なお多くの解決すべき課題が残されており、まだまだ先は長いと言える。

謝辞 パラグアイで *S. dulcis* という熱帯性薬用植物と出会ってから、すっかり魅せられてしまい、25年間も研究を継続させてきたが、予想外の新知見や成果を得ることができた。これは、何よりも国際的な協力研究プロジェクトを立ち上げ、その推進に尽力された森田直賢富山医科薬科大学名誉教授や生薬学研究室と薬用植物園のスタッフの方々の御蔭であり、心からお礼申し上げる。また、労を惜しまず、種々の実験に取り組んで頂いた川崎 勝博士やコンゴ民主共和国からの留学生 Marguerite Kasidimoko Nkembo 博士を始めとする多くの大学院生や卒業研究生、並びに学内外の共同研究者の協力の賜物であり、深く感謝している。

REFERENCES

- 1) Japan International Cooperation Agency, "Final report of cooperative studies on medicinal plants in Paraguay," August, 1991, pp. 7-25.
- 2) Japan International Cooperation Agency, "Final report of cooperative studies on medicinal plants in Paraguay," August, 1991, pp. 26-29.
- 3) Nobunaga T., *Fukuoka Acta Med.*, **51**, 205-221 (1960).
- 4) Pineda E. P., Goldbarg J. A., Banks B. M., Rutenburg A. M., *Gastroenterol.*, **36**, 202-213

- (1959).
- 5) Masuya T., Nobunaga T., Kato S., *Saishin Igaku*, **16**, 70–79 (1961).
 - 6) Japan International Cooperation Agency, “Final report of cooperative studies on medicinal plants in Paraguay,” August, 1991, p. 61.
 - 7) Gonzales T., “Catalogo de plantas medicinales (y Alimenticias y Utiles) Usada en Paraguay,” Asuncion, 1986, p. 394.
 - 8) Chiang Su New Medical College, “Dictionary of Chinese Materia Medica,” ed. by Jiangsu New Medical College, Shanghai Scientific and Technological Publisher, Shanghai, 1977, p. 2132.
 - 9) Kawasaki M., Hayashi T., Arisawa M., Shimizu M., Horie S., Ueno H., Syogawa H., Suzuki S., Yoshizaki M., Morita N., Tezuka Y., Kikuchi T., Berganza L. H., Ferro E., Basualdo I., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3936–3966 (1987).
 - 10) Hayashi T., Kishi M., Kawasaki M., Arisawa M., Shimizu M., Suzuki S., Yoshizaki M., Morita N., Tezuka Y., Kikuchi T., Berganza L. H., Ferro E., Basualdo I., *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3693–3696 (1987).
 - 11) Hayashi T., Kawasaki M., Okamura K., Tamada Y., Morita N., Tezuka Y., Kikuchi T., *J. Nat. Prod.*, **55**, 1748–1755 (1992).
 - 12) Asano S., Mizutani M., Hayashi T., Morita N., Takeguchi N., *J. Biol. Chem.*, **265**, 22167–22173 (1990).
 - 13) Hayashi T., Okamura K., Kakemi M., Asano S., Mizutani M., Takeguchi N., Kawasaki M., Tezuka Y., Kikuchi T., Morita N., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 239–242 (1990).
 - 14) Hayashi K., Niwayama S., Hayashi T., Nago R., Ochiai H., Morita N., *Antiviral Res.*, **9**, 345–354 (1988).
 - 15) Hayashi T., Hayashi K., Morita N., *Phytotherapy Res.*, **6**, 6–9 (1992).
 - 16) Nishino H., Hayashi T., Arisawa M., Satomi Y., Iwashima A., *Oncology*, **50**, 100–103 (1993).
 - 17) Miyahara T., Komiyama H., Miyanishi A., Takata M., Nagai M., Kozuka H., Hayashi T., Yamamoto M., Ito Y., Odake H., Koizumi F., *Toxicology*, **97**, 191–197 (1995).
 - 18) Tuukanen J., Väänänen H. K., *Calcif. Tissue Int.*, **38**, 123–125 (1986).
 - 19) Sarges R., Gallagher A., Chambers T. J., Yeh L. A., *J. Med. Chem.*, **36**, 2828–2830 (1993).
 - 20) Hayashi T., Hayashi K., Uchida K., Niwayama S., Morita N., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 239–242 (1990).
 - 21) Hayashi T., Asano S., Mizutani M., Takeguchi N., Kojima T., Okamura K., Morita N., *J. Nat. Prod.*, **54**, 802–809 (1991).
 - 22) Miyahara T., Hayashi T., Matsuda S., Yamada R., Ikeda K., Tonoyama H., Komiyama H., Matsumoto M., Nemoto N., Sankawa U., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 1037–1042 (1996).
 - 23) Hayashi T., Okamura K., Kawasaki M., Morita N., *Phytochemistry*, **30**, 3617–3620 (1991).
 - 24) Hayashi T., Okamura K., Tamada Y., Iida A., Fujita T., Morita N., *Phytochemistry*, **32**, 349–352 (1993).
 - 25) Hayashi K., Hayashi T., *Antiviral Chem. Chemother.*, **7**, 79–85 (1996).
 - 26) Overman L. E., Rica D. J., Tran V. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2042–2044 (1993).
 - 27) Kusera D. J., O’Connor S. J., Overman L. E., *J. Org. Chem.*, **58**, 5304–5306 (1993).
 - 28) Ziegler F. E., Wallace O. B., *J. Org. Chem.*, **60**, 3626–3636 (1995).
 - 29) Hayashi T., Okamura K., Kawasaki M., Morita N., *Phytochemistry*, **33**, 353–356 (1993).
 - 30) Hayashi T., Gotoh K., Kasahara K., *Phytochemistry*, **41**, 193–196 (1996).
 - 31) Hayashi T., Kasahara K., Sankawa U., *Phytochemistry*, **46**, 517–520 (1997).
 - 32) Lichtenthaler H. K., Rohmer M., Schwender J., *Physiol. Plant*, **101**, 643–652 (1997).
 - 33) Rohmer M., “Comprehensive Natural Products Chemistry,” Vol. 2, ed. by Cane D. E., Elsevier, Amsterdam, 1999, pp. 45–67.
 - 34) Hayashi T., Asai T., Sankawa U., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 8239–8243 (1999).
 - 35) Nkembo M. K., Lee J.-B., Nakagiri T., Hayashi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 758–760 (2006).
 - 36) Sharan M., Taguchi G., Gonda K., Jouke T., Shimosaka M., Hayashida N., Okazaki M., *Plant Sci.*, **132**, 13–19 (1998).
 - 37) Ketchum R. E. B., Gibson D. M., Croteau R. B., Shuler M. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 97–105 (1999).

- 38) Nkembo M. K., Lee J.-B., Hayashi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 780–782 (2005).
- 39) Nkembo M. K., Kurosaki F., Lee J.-B., Hayashi T., *Plant Biotechnol.*, **22**, 333–337 (2005).
- 40) Saito D., Asakura Y., Nkembo M. K., Shite M., Sugiyama R., Lee J.-B., Hayashi T., Kurosaki F., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1161–1163 (2007).
- 41) Oldfield E. H., Ram Z., Culver K. W., Blaese R. M., DeVroom H. L., Anderson W. F., *Hum. Gene Ther.*, **4**, 39–69 (1993).
- 42) Chen S. H., Shine H. D., Goodman J. C., Grossman R. G., Woo S. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3054–3057 (1994).
- 43) Hayashi K., Lee J.-B., Maitani Y., Toyooka N., Nemoto H., Hayashi T., *J. Gene Med.*, **8**, 1056–1067 (2006).
- 44) Freeman S. M., Abboud C. N., Whartenby K. A., Abraham G. N., *Cancer Res.*, **53**, 5274–5283 (1993).