

オオヒキガエル中の強心性ステロイドに関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16250

氏 名	松 川 元 美
生 年 月 日	
本 籍	大阪府
学 位 の 種 類	博士 (薬学)
学 位 記 番 号	博乙第185号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	論文博士 (学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	オオヒキガエル中の強心性ステロイドに関する研究
論文審査委員	(主 査) 島田 和武 (副 査) 太田 富久, 大熊 勝治, 木津 良一, 秋澤 俊史

学 位 論 文 要 旨

Summary Sixteen novel and fifteen previously described bufadienolides and bufadienolide derivatives were identified in the organs and tissues of *Bufo marinus* (L) SCHNEIDER. The purification was performed by reversed-phased HPLCs, and the structures were determined by NMR and mass spectrometry. A novel form of bufadienolide conjugate, fatty acid esters, were found in toad ovary. Novel glucuronyl bufadienolides which are first naturally occurring were isolated from the bile. Bufadienolide-3-sulfate and bufotoxin were identified in the plasma. In addition, two novel compounds named marinosin and marinoic acid were identified in the skin. Marinosin and marinoic acid differed from typical bufadienolides in having its B ring in a boat, rather than chair, form, and in that its C and D rings, respectively. A novel bufotoxin and a bufotoxin homolog were obtained from parotid gland.

The inhibition of Na^+, K^+ -ATPase enzymatic activity, and of [^3H]ouabain binding activity were tested. Bufadienolides fatty acid esters were potent same as bufogenin; marinosin and marinoic acid were less potent; and glucuronyl bufadienolides were very weak inhibitors. When the abilities of bufadienolides and of ouabain to induce apoptosis were studied, there appeared to be a correlation between the ability to induce apoptosis and Na^+, K^+ -ATPase inhibitory activity.

These finding may be useful for the identification of a physiological role of bufadienolides in the toad, *Bufo marinus*, as well as to develop the new drug.

ヒキガエル (ガマ) は両生類無尾目ヒキガエル (*Bufo*) 科に属し、地球上に広く生息している。その耳下腺及び皮脂腺からの分泌物は、漢薬センソとして古くから強心利尿薬として用いられている。それに伴いガマ毒の成分研究も活発に行われ、現在までに数々の強心性ステロイドであるブファジエノリドが単離・構造決定された。しかし、これらの研究はいずれも耳下腺や皮脂腺 (皮膚) からの抽出物を対象としたものであり、他の臓器等におけるブファジエノリドの存否に関しては、胆汁について若干の検討が加えられている程度であった。また、ブファジエノリドのヒキガエル体内における生理的役割は、一般の動物毒と同様に防御物質と考えられているものの、

詳細は明らかにされていない。同様に、その生合成経路に関しても未知のままである。

プファジエノリドの多岐にわたる薬理作用の中でも、重要なのはジギタリスのそれと同質の強心作用である。ジギタリスはジゴキシンに代表される多くの強心配糖体（カルデノリド）を含有しており、心不全の治療薬として汎用されている。プファジエノリド、カルデノリド、いずれの強心作用も Na^+ , K^+ -ATPase を介し作用すると考えられ、その指標として Na^+ , K^+ -ATPase 阻害活性又は本酵素への [^3H]ouabain binding 阻害活性が用いられている。しかし、このような強心作用も作用域の狭さや体内蓄積毒性などの問題点を有し、新しい強心薬の開発が切望されている。

最近、代表的プファジエノリドである bufalin が、ヒト白血病細胞を特異的に分化、アポトーシス誘導するもののヒト正常細胞には影響を与えないとの報告がなされ、新しい癌化学療法薬として多大の注目を集めている。しかし、類似の化学構造を有する他のプロゲニンや抱合体及びカルデノリドのそれに関する研究は十分ではなく、これらの点を明らかにすることは、よりポテンシャルの高い医薬の開発につながるものとして期待される。

以上の知見を基に、著者はプファジエノリドのヒキガエルにおける生理的役割、生合成機構の解明、さらに新しい強心薬及び癌化学療法薬の開発を究極の目的として以下の研究を行った。研究対象として古くより用いられているオオヒキガエル [*Bufo marinus* (L.) SCHNEIDER] を取り上げ、従来から検索されている耳下腺、皮膚腺のみでなく、卵巣、胆汁及び血液におけるプファジエノリドあるいはその前駆物質などの存否を精査した。常法通り各組織などを抽出後、 α -ピロン環由来の 300 nm の吸収を指標に逆相系 HPLC を駆使して単離し、各種 NMR, MS のデータを基にそれらの構造解析を行った。その結果、卵巣及び血液におけるプファジエノリドの存在を初めて明らかにすると共に、16 種の新規化合物を含む計 31 種のプファジエノリドの単離、構造決定に成功した (Fig. 1)。また、それらの Na^+ , K^+ -ATPase 阻害活性、[^3H]ouabain binding 阻害活性の測定を行い、構造活性相関に検討を加えた。さらに、アポトーシス誘導作用についても検討し興味ある知見を得た。

1. 卵巣中のプファジエノリド

卵巣からは 合計 12 種のプファジエノリド (1, 3-9, 15, 16, 22, 24) を単離したが、それらの中でプロゲニン 3 種 [11 α ,19-dihydroxytelocinobufagin (1), 11 α ,19-dihydroxymarinobufagin (15), 11 α -hydroxymarinobufagin (16)], 脂肪酸抱合型プファジエノリド 3 種 [11 α ,19-dihydroxytelocinobufagin-3-(12-hydroxydodecanoic acid) ester (7), 11 α ,19-dihydroxytelocinobufagin-3-(14-hydroxy-7(Z)-tetradecenoic acid) ester (8), 11 α ,19-dihydroxytelocinobufagin-3-(14-hydroxytetradecanoic acid) ester (9)] の計 6 種は新規化合物であった。耳下腺よりプファジエノリドとジカルボン酸のハーフエステルが単離された報告はあるが、これは卵巣中には存在せず、代わりに本臓器に特徴的なものとして多量の脂肪酸エステル抱合体が見い出された。卵巣より多種多様のプファジエノリドが単離、同定されたこと及び脂肪酸抱合体の存在が明らかとなったことは注目される。

2. 胆汁中のプファジエノリド

胆汁からは新規グルクロン酸抱合型プファジエノリド 2 種 [3-O-(β -glucuronopyranosyl)-12 β -

hydroxy-3-epimarinobufagin (**30**), 3-O-(β -glucuronopyranosyl)-3-epimarinobufagin (**31**)] を単離，構造決定した。ブファジエノリドの硫酸抱合体については，胆汁中における存在を含めて多くの報告がなされているものの，グルクロン酸のそれについては初めてであり，ブファジエノリドがこの種の抱合も受けるものとして注目される。

3. 血液中のブファジエノリド

血中より新規硫酸抱合体である telocinobufagin-3-sulfate (**12**) と既知のブファジエノリド 2 種類

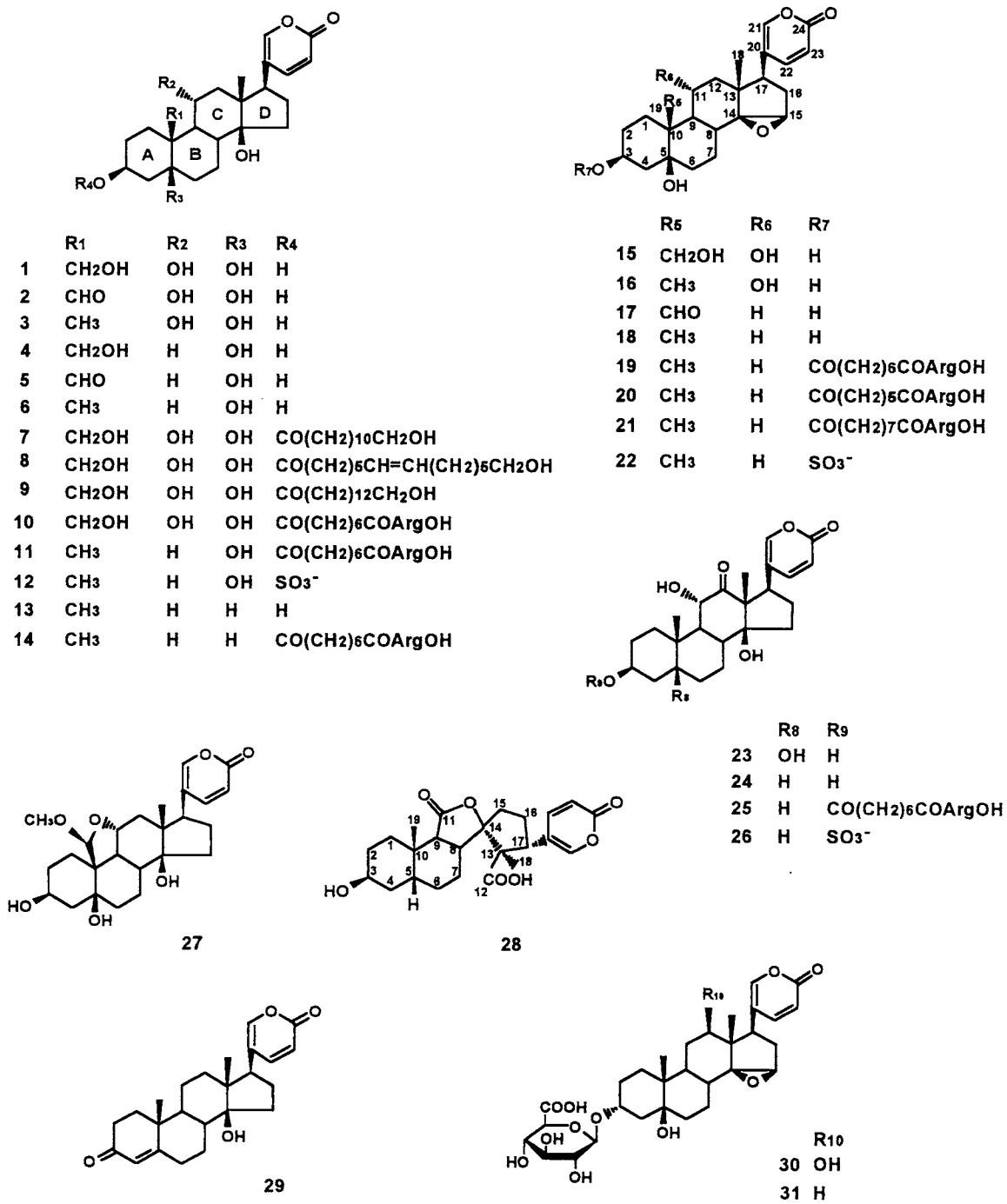


Fig. 1. Structures of Compounds 1- 31

(22, 25)を単離, 同定した. これら以外に既知物質である 26 の存在も推測されたが, 単離するまでには至らなかった. このように, 今回初めてヒキガエルの血液中にブファジエノリドが存在することを明らかにした.

4. 皮膚及び耳下腺中のブファジエノリド

耳下腺, 皮膚についても改めて検索し, 既知のブファジエノリド 12 種 (3-6, 11, 13, 14, 18-20, 24, 25)の他, 卵巣中にも存在した 2 種 (1, 16) 以外に 3 種の新規ブホゲニン 11 α -hydroxyhellebrigenin (2), 19-oxomarinobufagin (17), 4-dehydrobufalone (29) 及び新規ブホトキシシン 11 α ,19-dihydroxytelocinobufotoxin (10) 並びに新規ブホトキシシンホモログ marinobufagin-3-azelaoylarginine ester (21) を単離, 構造決定した. 従来, ブホトキシシンの構成ジカルボン酸は C₄~C₈ とされていたが, 今回 C₉ のものが発見されたことは, 卵巣よりの 7~9 の発見と考え合わせ, 多様な脂肪酸がヒキガエル体内に存在することを示している. さらに, 独特の構造を有する marinosin (27) 及び marinoic acid (28) の同定にも成功した. 27 は一般のブファジエノリドと同様に A/B *cis*, C/D *cis* ではあるが, A 環が反転し, B 環がボート型の立体構造を有していた. 28 は C/D 環部分においてスピロ環を形成しており, ブファジエノリドの範疇には属さない化合物であった. このよう
に
従来から深く検討されていた研究材料より, 新規分離分析手段及び高分解能 NMR を駆使することで, 新たに数多くの微量新規化合物を単離, 同定することに成功した.

5. ブファジエノリドの生理活性

以上のようにして単離, 構造決定した新規ブファジエノリドの主なものについて, その強心作用を Na⁺, K⁺-ATPase, [³H]ouabain binding 阻害作用を指標として吟味した. その結果, 脂肪酸エステル抱合体は対応するゲニンと同程度の活性を有し, 従来のブファジエノリドと化学構造を大きく異にする 27 及び 28 も微弱ながら作用を有することが判明した. しかし, 従来から知られているブファジエノリドに比べ, 著しく活性の強いものは見られず, また構造活性相関も従来の知見とほぼ符合するものであった. 今後, 全個体を用いて持続性などの検討を加えるならば, 新しい知見が得られるものと期待される. また, bufalin (13) が示すアポトーシス誘導作用にも検討を加え, 他のブファジエノリドやカルデノリドである ouabain も本作用を示すことを明らかにした. さらにそのアポトーシス誘導作用は, Na⁺, K⁺-ATPase 阻害作用とほぼ相関することを見出した.

以上のようにヒキガエルの体内に広くブファジエノリドが分布していることが明らかとなり, 防御物質としてのみではなく, 生態環境に適応するための生理活性物質としてブファジエノリドが作用していることが考えられる. 今回得られた知見は, ブファジエノリドの生理的意義の解明あるいは新しい医薬品開発のためのヒントと成り得るものと期待される.

学位論文審査結果の要旨

提出論文を基に2回の審査委員会及び最終試験を行い、以下の結論を得た。

本論文は、新しい強心薬及び抗腫瘍性化学療法薬の開発を目的として、オオヒキガエルの血液、胆汁、卵巣、皮膚及び耳下腺中の強心成分を検索し、16種の新規化合物を含む31種のプファジエノリドを単離、同定したものである。なお、単離は分取HPLC、構造決定はNMRやMSを駆使して行われた。

従来、ヒキガエルの強心成分研究はその分泌部位である皮膚や耳下腺を対象となされていたが、本研究では新たに血液、卵巣中における本成分の存在も明らかとし、ヒキガエル体内で何らかの生理作用を有することを示唆した点が注目される。また、新規抱合形式を有する抱合型プファジエノリドやユニークな構造を有する関連化合物を明らかとしたことも特筆される。さらに、これらの強心作用や最近注目されているアポトーシス誘導能にも検討を加えた。得られた知見は医薬の開発に直接結びつくまでには至らないが、その研究方針は優れたものといえる。

また、申請者の研究に対する意欲、その将来性や基礎力についても口頭試問の結果より十分と判断された。以上を鑑み、本論文を博士(薬学)に相当するものと認める。