

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 26 年 5 月 29 日

採択番号	25-共同-3		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	ヒトデ由来サポニン類を標的とした抗原虫活性物質の探索		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	かわせ おさむ 川瀬 撰	獨協医科大学基本医学基盤教育部門・講師	
研究分担者			
	げん がくなん 玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ～ 平成 26 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>サポニンとはステロイドまたはトリテルペノイド配糖体の総称で、棘皮動物（特にヒトデやナマコ）は多様なサポニン類を含むため、機能性サポニンの探索源として有望である。研究代表者および研究分担者はヒトデ類（マヒトデ、イトマキヒトデ、フサトゲニチリンヒトデなど）から調製したサポニン粗精製物をマウスに注射すると、マウスがトキソプラズマ原虫に対して耐性（抗トキソプラズマ活性）を示すという暫定的な結果を得た。そこで、本研究では抗トキソプラズマ活性を示すサポニンの単離・精製を試みた。</p>		
研究経過の概要	<p>イトマキヒトデ (<i>Asterina pectinifera</i>) を卵巣、精巣、それ以外（体壁）の部分に分け、サポニン類を抽出し、液相分離法による脱脂、粗精製をおこなった（粗精製物）。</p> <p>サポニン類には一般的に溶血活性が見られるため、ヒトデの各部位由来の粗精製物の溶血活性を評価したところ、卵巣および体壁由来の粗精製物に活性が見られたため、それらをシリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いた逆相クロマトグラフィーにより分離したところ、卵巣および体壁から溶血活性を有する 15 画分が得られた。また、高分解能質量分析（HRMS）により、一部の画分には特定の構造のサポニンが含まれることが推測された。</p> <p>しかし、これら画分の精製は未だ不完全のため、現在 HPLC による精製を進めており、今後動物実験を実施する予定である。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>茨城県ひたちなか市沿岸において、約 6 kg のイトマキヒトデ (<i>Asterina pectinifera</i>) を採集し、体壁、卵巣、精巣にわけ、それぞれを細かく切断した。約 2 倍容量、次いで 2/3 倍容量のメタノールによりサポニン類を含む成分を各部位から 2 度抽出した。これらの抽出液をあわせて、サポニン類に特徴的な溶血活性を評価したところ、体壁抽出物および卵巣抽出物に活性がみられたため、これらを乾燥させたところ、それぞれ 163.2 g および 20.9 g であった。</p> <p>これらの抽出物をそれぞれ水に溶かし、n-ヘキサン、酢酸エチルとの液相分離をそれぞれ複数回、順におこない脂質を除去した。さらに水層から 1-ブタノールによりサポニン類を抽出し、乾燥させた。これにより体壁抽出物から 8.1 g、卵巣抽出物から 980 mg のサポニン粗精製物を得た。</p> <p>次に、粗精製物をクロロホルム：メタノール：水を展開溶液としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離したところ、両粗精製物のそれぞれから 2 つずつの溶血活性画分 (fraction 3、fraction 5) を得た。</p> <p>さらに体壁由来の fraction 3 を HPLC による逆相カラムクロマトグラフィー (カラム：Wakosil-II 5C18 HG Prep、展開溶媒：メタノール 60% から 100% へのグラジエント) で分離し、5 つの溶血活性画分 (3-5、3-8、3-9、3-10、3-13) を、fraction 5 から 8 つの溶血活性画分 (5-4、5-10、5-34、5-35、5-36、5-37、5-40、5-41) を得た。一方、卵巣由来の fraction 3 から 2 つの溶血活性画分 (ov3-7、ov3-10) を得た。</p> <p>以上の画分は精製度が高いが未だ不純物を含んでいるため、更なる精製が必要であった。しかし、高分解能質量分析 (HRMS) によって、各画分に含まれる主要なサポニン類の構造を解析したところ、3-8 には pectinoside E または G、3-9 および 3-10 には pectinoside A、5-10 には pectinoside B が含まれることが推測された。これらの化合物はヒトデサポニン類の抗トキソプラズマ活性を担う候補分子であり、原虫病に対する効果を試された例はないため、興味深い。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>抗トキソプラズマ活性物質の本体として、いくつかのサポニン類が候補として絞り込まれたが、完全な精製および動物実験までに到達しなかったため、発表するまでに至っていない。</p>