

本研究は、日本農芸化学会2025年度大会（札幌）における「ジュニア農芸化学会」に応募された研究のうち、本誌編集委員会が優れた研究として選定した5題の発表のうちの一つです。

タイハーブでアニサキス症に立ち向かう パンダンリーフ *Pandanus amaryllifolius* の 抗アニサキス作用に関する研究

茗溪学園高等学校

深井なつこ（指導教諭：三枝 拓）

近年アニサキス症の患者数が増加傾向にある。ワサビや生姜に抗アニサキス効果があるという研究報告があるが、承認済み治療薬については未だ開発されていない。本研究ではタイハーブに焦点を当て、アニサキスを死滅または活動を著しく抑制させる有効成分を発見し、アニサキス症の対症薬の開発を目指した。各種タイハーブ抽出液のアニサキスへの効果検証を行ったところパンダンリーフに有意な死滅効果があることを発見した。アニサキスの生死判別はトリパンブルー染色法に従った。さらにクロマトグラフィーにより活性成分を精製し、有効なフラクションをNMRを用いて構造解析し、抗アニサキス作用を示す物質の構造に関する知見を得た。



目的

アニサキス症とは、人の胃や腸壁などにアニサキス亜科幼線虫が穿入することで激しい腹痛や嘔吐などを引き起こす食中毒である。青魚やイカといったアニサキス亜科幼線虫が寄生しやすい魚介類を生食する文化が根付いている日本では、近年診断技術の高度化や生鮮食料品を冷蔵で長時間輸送することが可能になったこともあり、アニサキス症例の多発と広域化が見られ、社会問題となっている。アニサキス症治療薬は未だ存在せず、外科手術や胃内視鏡による幼虫の摘出以外に適切な治療法が確立されていない。予防策としては、マイナス20°C以下で24時間以上の冷凍を行うことや、70°C以上で1分以上の加熱を行うものしか発表されておらず⁽¹⁾、いずれも魚介類の生食文化に即した現実的なものとは言えない。その一方で、アニサキス症用薬剤としては認可され

ていなもの、木クレオソートを主成分とする正露丸にアニサキス死滅効果が認められた^(2,3)という先行研究やワサビや生姜などの薬味にアニサキス死滅効果を確認したとする論文が発表されている⁽⁴⁾。本研究では、先行研究を踏まえてタイ留学をきっかけに、未だ研究対象とされていないタイハーブに焦点を当てたアニサキス死滅効果について研究を行うこととした。



実験方法と結果

【アニサキスの採取】

屋久島海域に生息するカツオにアニサキスが多く寄生していることから、屋久島海域で捕獲されたカツオ入手し、新鮮なうちに捌くことで内臓よりアニサキスの採取を行った。

【タイハーブより成分の抽出および調整】

タイ料理に多用され、日本国内で入手可能な以下の10種類のタイハーブを用意した。

- ①タマリンド *Tamarindus indica*
- ②パンダンリーフ *Pandanus amaryllifolius*
- ③ライム *Citrus aurantiifolia*
- ④青パパイヤ *Carica papaya L.*
- ⑤レモングラス *Cymbopogon citratus*
- ⑥コブミカン *Citrus hystrix*
- ⑦ナンキョウ *Alpinia galanga*
- ⑧赤分葱 *Allium ascalonicum*
- ⑨生胡椒 *Piper nigrum*
- ⑩パクチー *Coriandrum sativum*

不純物を取り除くために十分に水洗いを行ったのち、



図1 ■ カツオ内臓からアニサキスを採取する様子



図2 ■ 採取したアニサキス

各200gを細かく粉碎した。葉、茎、皮、果肉、種を有するものについては全ての部位を採取し均一になるように混合した。各粉碎物にメタノール250mLを加えて室温で24時間静置し、メタノール抽出液とした。

【殺アニサキス物質を有するハーブの特定】

アニサキス5個体と各メタノール抽出液5.0mLを6穴マルチディッシュに分注した。15°Cで24時間保温した後、各アニサキスの固体を0.4%トリパンブルー染色液に5分間浸透させた。さらに、生理食塩水で軽く洗浄したのち、顕微鏡を用いて各細胞の染色の様子を観察しアニサキスの生死判定を行った。また、対照として生理食塩水およびメタノールのみにおけるアニサキスの生存状態について同様に観察し、これら溶媒の影響はないことを確認した。生死判定においてはトリパンブルー染色液が死細胞を青く染める特性を用い、全体が青く染まったものを死滅(=効果あり)とし、染色が確認されなかつたものについては生存(=効果なし)とした^⑤。本実験を5反復行い、アニサキスの生存の評価を行った($n=25$)。

その結果、パンダンリーフ *Pandanus amaryllifolius* の抽出液においてのみ、アニサキス25個体に対する死滅効果が確認された。パンダンリーフは主に熱帯アジア地域やアフリカで栽培されている緑色の薬用植物であり、一般的には緑色の着色料に利用されるほか、芳香剤や蚊やゴキブリの忌避剤など多用途で用いられている^⑥。

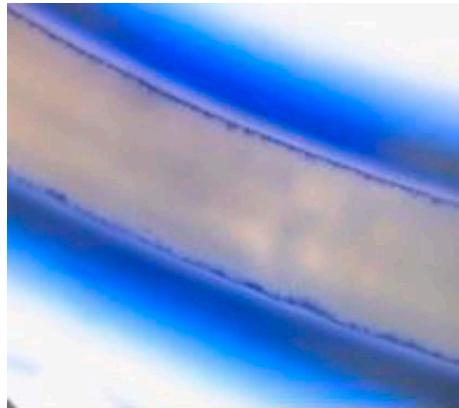


図3 ■ 染色が確認されなかつたアニサキス(生存)

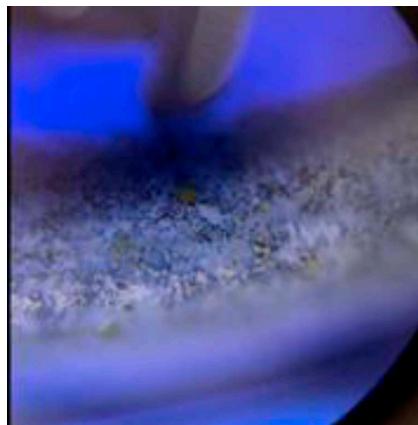
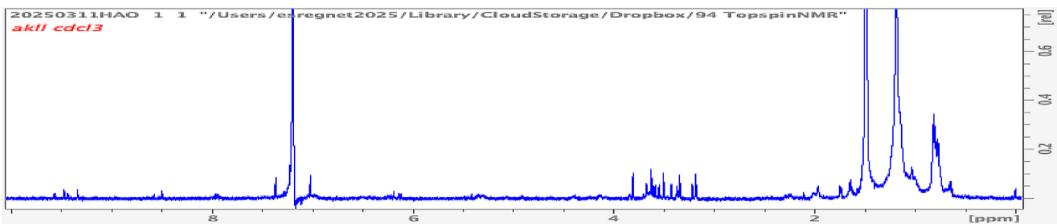
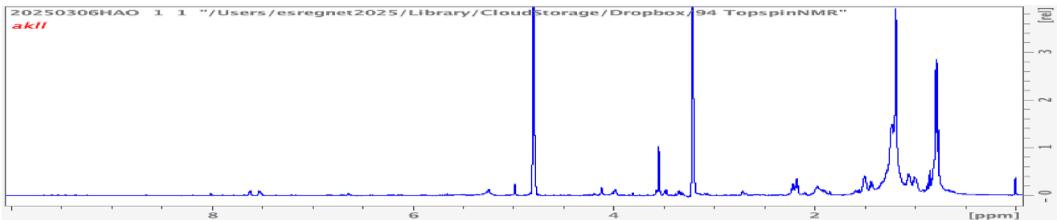


図4 ■ 染色が確認されたアニサキス(死滅)

【パンダンリーフの有効成分の分離精製と特定】

クロマト管($\phi 25\text{ mm}$, $l=350\text{ mm}$)にシリカゲルを25cm充填し、減圧濃縮したパンダンリーフ抽出液を、ヘキサン:酢酸エチル=1:1混合溶媒を溶出溶媒に用い、11mLずつ計50本のフラクションに分画した。3と同様に、各フラクションにアニサキス6個体を入れ、15°Cで96時間保温し、トリパンブルー染色液にて生死判定を行った。コントロール群として溶出溶媒(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)のみでも同様に実施した。その結果、フラクションNo.10, 11, 17において6個体すべての死滅が確認された。従って、アニサキス死滅効果のある成分本体はこれらのフラクションに含まれていると判断した。

続いて、上記3フラクションの溶液を減圧濃縮し、展開溶媒(ヘキサン:酢酸エチル=2:1)を用いて、薄層クロマトグラフィーにて成分を分離した。フラクションNo.10から2つのスポット(Rf値0.48, 0.40), No.11から2つのスポット(Rf値0.35, 0.28), No.17から4つのスポット(Rf値0.43, 0.37, 0.26, 0.17)が得られた。同様の操作を複数回繰り返し、各スポットを回収したのちに、

図5 画分Aの¹H NMRスペクトル (CDCl₃)図6 画分Bの¹H NMRスペクトル (MeOD)

10mgを生理食塩水に溶解した。そこにアニサキス6個体を入れ、15°Cで96時間保温し、トリパンブルー染色液にて生死判定を行った。その結果、フラクションNo.10のR_f値0.48のスポットにおいて6個体すべての死滅が確認された。残りのスポットは、いずれも1~3個体の死滅しか確認できなかった。

【有効成分の構造解析】

TLCにて分離精製したスポットについて、フラクションNo.11のR_f値0.48のスポットに有効成分が含まれていることが示唆されたため、分取用TLCを用いて該当スポットをかきとり、1.0mgを東京海洋大学食品栄養化学研究室にて、NMR (Bruker社 Avance 600MHz)による構造解析を行った。分析試料については、凍結乾燥後、重クロロホルムを加えて震盪後に、上清を得て画分Aとした。さらに残渣に重メタノールを加えて震盪後に上清を得て画分Bとした。

画分Bについては、クロロフィルaのスペクトルと特徴が一致したことからクロロフィル類の混合物であると推定された。画分Aについて芳香環由来化合物、酸素官能基由来化合物、炭化水素由来化合物の数種類の化合物の存在が示唆された。サンプル量が少ないため、混合物の状態で二次元NMR解析を行った。

二次元NMRから推定される部分構造をもとに活性本体の構造を推定した。図5の画分Aの¹H NMRのスペクトルをみると、0.5~1.5ppmの炭化水素鎖由来の、3.0~4.1ppmに酸素等の電子吸引性が高い元素に隣接すると考えられる水素の存在が示唆された。スペクトルが複雑であるため数種類の化合物が含まれると推定された。図7のHMQC分析、図8のHMBC分析により、代表シ

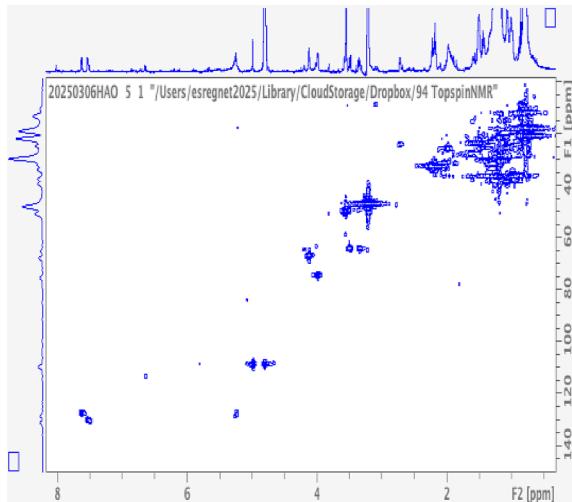


図7 二次元NMR HMQC分析

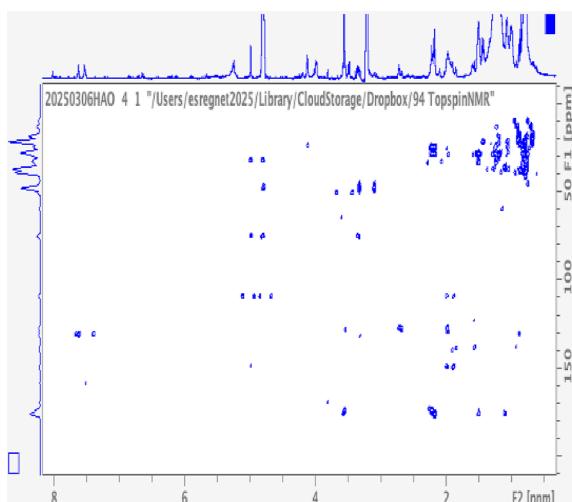


図8 二次元NMR HMBC分析

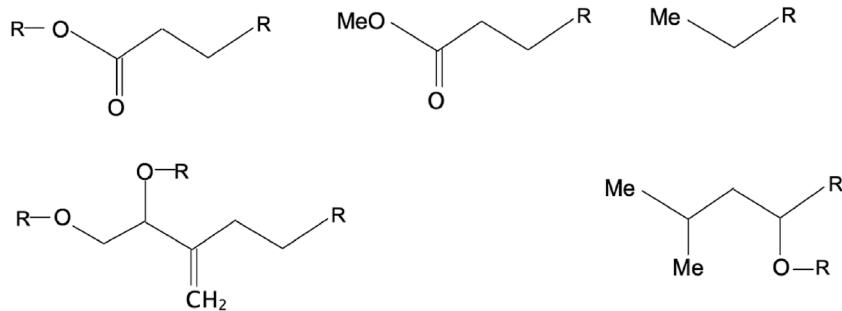


図9 ■ 活性本体化合物が有すると考えられる部分構造

ゲナルの積分値よりある程度の存在比を示した以下の5種類の部分構造が存在すると推測した。従って、活性画分には少なくとも二種類の脂肪酸エステルが含まれている可能性が高いことが推定される。



本研究の意義と展望

いまだ効果的な治療薬が開発されていないアニサキス症に焦点を当てて、身近な食品から薬効成分を見つける天然物化学研究の一端を高校の化学実験室で行った。オープンカラムクロマトグラフィー法や薄層クロマトグラフィー法などの単純な原理の手法を用いて、生理活性物質の単離と精製を行い、複数のタイハーブからパンダンリーフ中に含まれる有効成分の部分精製に成功した。全体構造を解明するためには、試料の量や純度が不足しているため、さらにサンプル量を増やして、NMR解析および質量分析を進める必要があり、現在構造解明に向けて取り組んでいる。

同時に、活性本体の生体内における安定性なども評価しなければならず、胃酸と同等のpH溶液中で活性が失われないことや、細胞毒性についても並行して確認する

ことで、将来的にはアニサキス症の対処薬としての実用化につながる研究をしていきたい。アニサキス症に対する服薬による治療が実現されれば、アニサキス症を恐れることなく日本のみならず世界に向けてより一層の生食文化の普及につながることを期待している。

謝辞：本実験ではNMR構造解析において、東京海洋大学 小山智之先生・嶋倉邦嘉先生にご協力をいただきました。お忙しい中ご指導いただきまして、心から感謝申し上げます。

文献

- 1) FAO & WHO: "Code of Practice for Fish and Fishery Products," 2020, p. 345.
- 2) M. Sekimoto, H. Nagano, Y. Fujiwara, T. Watanabe, K. Katsu, Y. Doki & M. Mori: *Hepatogastroenterology*, **58**, 1252 (2011).
- 3) N. Ogata, H. Tagishi & M. Tsuji: *Chem. Pharm. Bull.*, **68**, 1193 (2020).
- 4) 鈴木 淳, 安田一郎, 村田以和夫, 村田理恵, 西谷 潔: *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **53**, 35 (2002).
- 5) 三重正和, 小畠英理: *Electrochemistry*, **76**, 924 (2008).
- 6) K. V. Wakte, A. B. Nadaf, R. J. Thengane & N. Jawali: *Genet. Resour. Crop Evol.*, **56**, 735 (2009).

Copyright © 2025 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.63.510