

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3597479号

(P3597479)

(45) 発行日 平成16年12月8日(2004. 12. 8)

(24) 登録日 平成16年9月17日(2004. 9. 17)

(51) Int. Cl.⁷

F I

AO 1 N 65/00
 AO 1 N 47/46
 // AO 1 N 31/04
 AO 1 N 35/02
 AO 1 N 35/04

AO 1 N 65/00 A
 AO 1 N 47/46
 AO 1 N 31/04
 AO 1 N 35/02
 AO 1 N 35/04

請求項の数 4 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2001-68209 (P2001-68209)
 (22) 出願日 平成13年3月12日(2001. 3. 12)
 (65) 公開番号 特開2002-193723 (P2002-193723A)
 (43) 公開日 平成14年7月10日(2002. 7. 10)
 審査請求日 平成13年3月12日(2001. 3. 12)
 (31) 優先権主張番号 2000-81256
 (32) 優先日 平成12年12月23日(2000. 12. 23)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)

(73) 特許権者 501097020
 ナチュロバイオテック カンパニー リミ
 テッド
 大韓民国 ソウル 156-754 ドン
 チャク デバンドン 49-6 ヨハンヤ
 ムヘンビル 7F
 (74) 代理人 100083138
 弁理士 相田 伸二
 (74) 代理人 100082337
 弁理士 近島 一夫
 (72) 発明者 アン ヨン チュン
 大韓民国 ソウル 138-240 ソン
 パク シンチョンドン 7 チャンミアパ
 ート 15-1106

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物から抽出した殺だに性組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

牡丹皮のメタノール粗抽出物及びからし油でなる群から選択される1種以上の物質を含む殺だに剤。

【請求項 2】

前記からし油は、核酸及びエチルアセテートを含む溶媒により分画されることを特徴とする請求項 1 に記載の殺だに剤。

【請求項 3】

前記からし油は、核酸及びエチルアセテートの体積比が異なる複数の溶媒により、段階的に分画されることを特徴とする請求項 1 または 2 のいずれかに記載の殺だに剤。

【請求項 4】

前記殺だに剤は、縦紋ほこりだにまたは大きい脚ほこりだにに対して殺だに効果があることを特徴とする請求項 1 に記載の殺だに剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は植物から抽出した殺だに性組成物に関するものであり、さらに詳細には、殺だに力を有する植物粗抽出物及び化合物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

10

20

だには、人間住居地で最も核心的なアレルギー原として、特に喘息と鼻炎を誘発する因子である。(Maunsell等、1968)また、ピログリピダエ(Pyroglyphidae)科に属するだにはほこり内に棲息して(Voorhorst等、1964)、縦紋ほこりだに(Dermatophagoides pteronyssinus)、大きい脚ほこりだに(D. farinae)、マイクロセラスだに(D. microceras)、ヨーロッパ・マイネイ(Euroglyphus maynei)などがアトピー性(atopy)体質の人から鼻炎、喘息または湿疹のような症状を誘発する。(International Workshop Report, 1989と1992)

【0003】

最近には中央暖房式管理方式のアパート世代増加、補助暖房装置の使用増加、カーペット利用量の増加などの住居環境の変化が、だに生育に最適条件を与えるようになり、それによってだには速い増殖と4季節室内条件下で生存できるようになった。国内で主に発見されるだには4種程度で、優占種は全世界的に最もありふれるように発見される縦紋ほこりだに(Dermatophagoides pteronyssinus)と大きい脚ほこりだに(D. farinae)である。

【0004】

家ほこりだには、カーペット、衣類、家具、マットレス、寝具類等から発見されて、温帯性気候地域のみならずこのような居住地域全域に分布する特性を見せる。(Boer、1991)

【0005】

家ほこりだに種は、光を嫌って、個体群増殖のために適切な温度と湿度、餌原として人間の皮膚角質物とを必要とする。したがって家ほこりだにを殺虫するために常に家の中のほこりを取り除いて、家ほこりだにが棲息できる家具類、衣類及びカーペットなどを70℃以上で滅菌したり温湿度を調節する方法が研究された。しかしこのような方法は適用上多くの制約があって完全な駆除力を期待することは非常に難しい実情である。

【0006】

だに防除能を有する物質は、リンデン(lindane)、ピリミポスメチル(pirimiphos-methyl)、安息香酸ベンジル(benzyl benzoate)、フタル酸ジブチル(dibutyl phthalate)及びジエチルm-トルアミド(diethylm-toluamide)がある。(Helle-Haupt等、1974)リンデンは最も強力な殺だに力と持続力を有するが高い毒性によって家庭用殺だに剤としては使用が制限されている。前記物質中二番目に活性が強いピリミポスメチルは哺乳毒性が低く貯蔵穀物内に棲息するだにを抑制する手段として実用化された。そしてミッチェル等(1985)はピリミポスメチルがカーペットに棲息するだにの60%を、椅子に棲息するだにの50%を防除できると報告した。

【0007】

現在だに防除用に商品化されているものは、安息香酸ベンジル(benzyl benzoate)、パラゼルム(paragerm)などがある。(Penaud等、1977; Schober等、1987)

【0008】

だにを防除するために、殺虫剤による化学的防除を主に用いているが、化学合成殺虫剤の使用でむしろだにの薬剤抵抗性をもたらし、DDTとリンデンとに対して抵抗性を示すほこりだに科(Pyrglyphidae)のだに類が発見されている。(Bronsjk等、1971)したがって既存に用いてきた殺だにに剤を代えるための研究が全世界的に行なわれている。特に民間療法で薬物治療剤として用いられる植物体と香りが良い芳香性物質とを利用して天然殺だにに剤を開発しようとする多くの研究が行なわれている。(Miyazaki、1989; Watanabe1989; Yatagai、1991; Morita、1991)

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

したがって、本発明はだにを撲滅できる植物由来殺だに性化合物を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

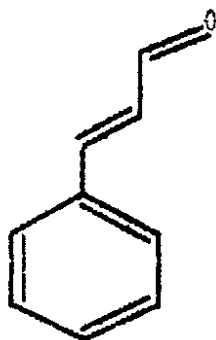
前記の目的を達成するために本発明は、牡丹皮(Paeonia suffruticosa)のメタノール粗抽出物及びからし油(mustard oil)でなる群から選択される1種以上の物質を含む殺だに剤を提供する。

【0011】

また、本発明はからし油から選択された化学式4のアリルイソチオシアナート(allyl isothiocyanate)、化学式5のブチルイソチオシアナート(butyl isothiocyanate)及びこの2種の化合物を含む殺だに剤を提供する。

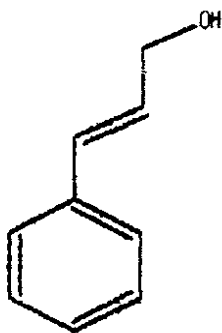
【0012】

【化1】



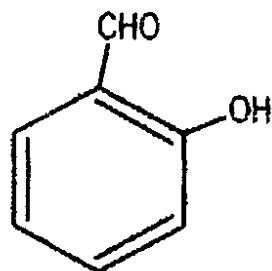
【0013】

【化2】



【0014】

【化3】



【0015】

【化4】



【0016】

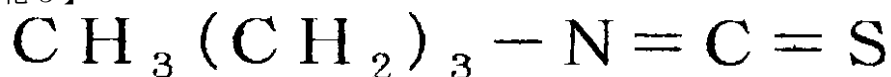
20

30

40

50

【化5】



【0017】

【発明の実施の形態】

以下本発明を詳細に説明する。

【0018】

本発明者は殺だに効果(acaricidal activity)を有する植物をスクリーニングして牡丹皮(Paeonia suffruticosa)、せんきゅう(Ligusticum chuanxiong)、肉桂(Cinnamomum cassia)、桂皮油(cinnamon oil)、からし油(mustard oil)及び洋ワサビ油(horseradish oil)が殺虫性を有し、特に殺だに効果があることを確認した。殺だに効果はだに殺虫力を有することであり、本発明では我が国で優占種である縦紋ほこりだに(Dermatophagoides pteronyssinus)と大きい脚ほこりだに(Dermatophagoides farinae)とに対する殺だに効果を測定した。また、肉桂と同一な桂皮からも殺虫または殺だに効果があることを確認した。

10

【0019】

前記植物の殺だに性物質を抽出するためにメタノール抽出方法を実施して牡丹皮、せんきゅう、肉桂から各々のメタノール粗抽出物を収得して、桂皮、からしと洋ワサビとは桂皮油、からし油、洋ワサビ油で収得した。前記6種の物質は家ほこりだに2種に対して殺だに効果を確認した。

20

【0020】

本発明は殺だに剤を提供する。前記殺だに剤は、牡丹皮メタノール粗抽出物及びからし油(mustard oil)でなった群から1種以上選択されることが良い。

【0021】

また、本発明は殺だに性植物または植物抽出物を含む殺だに剤を提供する。殺だに剤は前記植物または植物のメタノール粗抽出物を単独で含んだりまたは通常の殺虫剤に混合する物質をさらに含むことができ、植物のメタノール粗抽出物を0.01重量%ないし70重量%に含むことが望ましい。しかし植物のメタノール粗抽出物の含有量は殺だに剤の剤形、撒布方法によって別に適用されることがさらに望ましい。殺だに剤の剤形はスプレー状、液体塗布状、固体塗布状、及びジェル状の剤形が望ましい。

30

【0022】

また、前記肉桂メタノール抽出物は、ヘキサン、クロロホルム、エチルアセテート、ブタノールでさらに抽出し、ヘキサン層とクロロホルム層が殺だに活性を有することを確認した。したがって前記肉桂メタノール抽出物から収得したヘキサン層とクロロホルム層とは殺だに性組成物として利用でき殺だに剤としても活用できる。

【0023】

また、肉桂から分離したトランスシンナムアルデヒド(trans-cinnamaldehyde)、シンナミルアルコール(cinnamyl alcohol)、またはサリチルアルデヒド(salicylaldehyde)の化合物は殺だに性を示す化合物である。トランスシンナムアルデヒドは化学式1で表現され、シンナミルアルコールは化学式2で表現され、サリチルアルデヒドは化学式3で表現される。

40

【0024】

また、からし油と洋ワサビ油とから抽出したアリルイソチオシアナート(allyl isothiocyanate)とブチルイソチオシアナート(butyl isothiocyanate)は家ほこりだにに対する強力な殺だに性を示す化合物である。アリルイソチオシアナートは化学式4で表現され、ブチルイソチオシアナートは化学式5で表現される。

50

【0025】

また、殺だに剤はトランスシンナムアルデヒド(trans-cinnamaldehyde)、シンナミルアルコール(Cinnamyl alcohol)、またはサリチルアルデヒドを各々含むことができ、前記3種をすべて含むことができる。前記トランスシンナムアルデヒド、シンナミルアルコール、サリチルアルデヒドは各々単独で用いた時より混合した時殺だにに相乗効果を示すので混合して用いることが最も望ましい。

【0026】

殺だに剤は、通常の殺虫剤に混合する物質をさらに含むことができ、混合物形態の場合トランスシンナムアルデヒド、シンナミルアルコール、またはサリチルアルデヒドを単独または混合物を0.01重量%ないし70重量%に含むことが望ましい。しかし前記殺虫剤に含まれるトランスシンナムアルデヒド、シンナミルアルコール、またはサリチルアルデヒドの含有量は、殺虫剤を用いる方法や提示される剤形によって適切に調節することは当然なことである。

【0027】

また、トランスシンナムアルデヒド、シンナミルアルコール、またはサリチルアルデヒドは、殺だにに活性を有し多様な虫に効果を有する新規化合物のための母核化合物の基質として利用できる。母核化合物は、既存に活性が知られた物質の構造を基盤に、化学合成を通して水酸化基または他の化学構造を付け加えたり取り除くことによって、既存に問題になった性質を取り除いたり効果を増進させた新しい物質を称する。

【0028】

アリルイソチオシアナート(allyl isothiocyanate)とブチルイソチオシアナート(butyl isothiocyanate)とはイソチオシアナートを変化させたり(R-N=C=S)、それを強化(backbone)して倉庫虫をはじめとする多様な害虫に対する殺だにに性または防除性を増大させる母核化合物を作るための物質として使用できる。しかし、イソチオシアナート母核化合物は-NSC機能群を維持すべきであるが、これはイソチオシアナートがバイオ活性化(bioactivity)を見せることに主要な役割をするためである。結局、この母核化合物に対する実施例はR-C_nH_{2n}-NCS(R is 1 to 4 C alkyl, alkene, benzyl or phenyl; n is 3 to 10)で示すことができる。

【0029】

母核化合物の代表的な例であるピレスロイド系殺虫剤の場合、元来植物精油成分を母核化合物で新しく合成した殺虫剤として、元来の成分より光分解が不十分で魚毒性が低い類似物質を製造して現在用いられている。

【0030】

したがって、前記トランスシンナムアルデヒド母核化合物、シンナミルアルコール母核化合物、またはサリチルアルデヒド母核化合物を含む殺だに剤を提供できる。

【0031】

殺だに剤は、揮発性毒または接触毒として用いて、だにを殺だににさせることが望ましく、前記植物由来抽出物、肉桂から分離した3種の化合物及び前記3種の化合物の母核化合物は、だにに以外の害虫に対して防除の目的に使用できる。

【0032】

以下、本発明の理解を助けるために望ましい実施例を提示する。しかし下記の実施例は本発明をより容易に理解するために提供されるだけであって本発明が下記の実施例に限定されることではない。

【0033】

[実施例]試料調剤と殺だにに活性植物体及び精油

メタノール粗抽出物

牡丹皮(Paeonia suffruticosa)、せんきゅう(Ligusticum chuankiang)、肉桂(Cinnamomum cassia)は各300gをミクサ機できれいに磨碎して、500ml三角フラスコに入れた次に、メタノール50

10

20

30

40

50

0 ml を混合して室温暗室で3日間放置した。3日後ろ過した次に、ろ過液を回転真空濃縮機(EYELA autojack NAJ-160、Japan)で濃縮した。濃縮物を再びメタノールに混合する過程を2回繰り返して、メタノール粗抽出物を製造した。桂皮油(C. cassia(Cinnamon oil))、からし油(B. juncea(Mustard oil))と洋ワサビ油(C. aroracia(Horseradish oil))とは購入して用いた。

【0034】

[実験例1]

殺だに活性検定に用いられただに

殺だに活性は、2種のほこりだにに対して実施した。大きい脚ほこりだに(American house dust mite、Dermatophagoides farinae)と縦紋ほこりだに(European house dust mite、Dermatophagoides pteronyssinus)は相対湿度 $75 \pm 5\%$ 、温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ を維持した飼育室で飼育し、 $12.5 \times 10.5 \times 5\text{ cm}$ 容器に稚魚飼料と複合ビタミン剤(Ebiose [登録商標])とを1:1で混合した飼料及び、 $17.5 \times 17.5 \times 17.5\text{ cm}$ 体積の容器底に食塩水を適量そそいで、飼育室に入れて与えた。前記だには、殺だに剤に露出しないで飼育した。

【0035】

殺だに活性検定

植物体抽出物及び精油を利用した生物活性物質探索のための1次スクリーニングで最も重要な点が、初期出発濃度の設定である。本発明では、だにの形態的な特徴が顕微鏡学的構造を持っているために、数回の予備実験を通して2ミリリットルマイクロチューブ当たり、試料1 mgを設定した。メタノール粗抽出物または精油物1 mgを40 μ リットルのメタノールに溶かして、無色のマイクロチューブ(2ミリリットル)に処理して、チューブの壁面とふたに物質が均等に分散して付くように、数回上下に揺さぶった後、凍結乾燥器で1時間溶媒を揮発させた。各々のチューブに25個体のだにを入れた後、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下で検定をした。だには顕微鏡で観察して活動力が優秀な個体のみを微細な筆を利用して選別した。検定結果は処理24時間、48時間後に光学顕微鏡20倍下で調査したが、微細な筆を利用し附属肢及び胴を刺激して全く動かない個体は死亡したことに見なした。あらゆる検定は4回以上繰り返し、殺だに率に対する平均間の比較はシェフエー(Scheffé's test、SAS Institute、1996)を利用した。メタノール粗抽出物を無処理した対照区も同一に処理して調査した。殺だに率は、アークサイン自乗根に変形させて示した。

【0036】

下記表1は、メタノール粗抽出物と精油とに対する、殺だに率を測定したものである。

【0037】

【表1】

植物体名	殺だに率(平均 $\pm$ 標準偏差、%)			
	大きい脚ほこりだに		縦紋ほこりだに	
	24時間	48時間	24時間	48時間
牡丹皮	98.3 ± 1.7	100	100	—
肉桂	100	—	100	—
せんきゅう	88.3 ± 6.0	95.0 ± 5.0	91.7 ± 4.4	98.3 ± 1.7
桂皮油	100	—	100	—
からし油	97.0 ± 1.3	100	99.0 ± 1.3	100
洋ワサビ油	99.0 ± 1.3	100	100	—

【0038】

前記表1の列で同一な文字は、平均が統計上($P=0.05$ 、Sheffé検定)特別な差が無いことを示し、殺だに率はアークサイン自乗根に変形させて示した。

【0039】

10

20

30

40

50

前記表 1 の殺だに率は、メタノール粗抽出物と精油各々 1 m g を 2 m l マイクロチューブに処理した時の値であり、時間はメタノール粗抽出物と精油とを処理した後経過した時間を意味する。前記表 1 の結果は、チューブ当たり各だに種 2 5 個体ずつを放飼して、5 回繰り返した値である。

【0040】

せんきゅうを除いた牡丹皮、肉桂(桂皮)、桂皮油、からし油及び洋ワサビ油は、処理 4 8 時間以後に二種の家ほこりだにに対して 1 0 0 % の強い殺だに活性を見せており、特に肉桂と桂皮油とは処理 2 4 時間以後にも二種のだにすべてに対して、1 0 0 % の高い殺だに活性を示した。

【0041】

10

[実施例 2]

前記実施例 1 で製造した肉桂メタノール粗抽出物の殺だに活性成分を分離、精製した。メタノール粗抽出物 2 0 g を蒸留水 8 0 0 m l とヘキサン(n-Hexane) 8 0 0 m l に溶かし、2 L 分液漏斗に入れた後、栓を閉じてよく混合した次に、水層とヘキサン層とに分離した。3 0 分後に他の分液漏斗を利用して、1 次ヘキサン層を分離させて、水層に新しいヘキサン 8 0 0 m l をそそいで、同一な方法で 2 次のヘキサン層を分離させた。残っている水層に、クロロホルム 8 0 0 m l を混合して栓を閉じた後、十分に揺さぶって水層とクロロホルム層とに分離させて、3 0 分後に 1 次クロロホルム層を分離した。再び水層に新しいクロロホルム 8 0 0 m l を混合して、同一な方法で 2 次のクロロホルム層を分離した。残っている水層にエチルアセテート 8 0 0 m l をそそいで、ヘキサン分配時と同一な方法でエチルアセテート層を 2 回にかかって分離して、残った水層にブタノール 8 0 0 m l をそそいで、同一な方法でブタノール層を分離した。前記のような溶媒分画法でヘキサン層、クロロホルム層、エチルアセテート層、ブタノール層及び水層の 5 画分を収得し、水層は凍結乾燥器(Vertis、USA)で濃縮させて、ヘキサン層、クロロホルム層、エチルアセテート層、及びブタノール層は各々回転真空濃縮機(EYELA auto jack NAJ-160、Japan)で濃縮させた。

20

【0042】

濃縮された分画物に対して、前記実験例 1 の殺だに活性実験を同一に 4 回反復実施して殺だに活性層を決定し、結果は下記表 2 に示した。

【0043】

30

【表 2】

分画層	処理した だに数	殺だに率(平均±標準偏差、%)			
		細い家ほこりだに		大きい家ほこりだに	
		24時間	48時間	24時間	48時間
ヘキサン層	100	100a	100a	100a	100a
クロロホルム層	100	100a	100a	100a	100a
エチルアセテート層	100	2.7±2.7b	2.7±2.7b	4.0±2.3b	5.3±1.3b
ブタノール層	100	5.3±1.3b	6.7±1.3b	6.7±1.3b	6.7±1.3b
水層	100	2.7±1.3b	4.0±0b	2.7±2.7b	4.0±2.3b
対照区	100	0b	0b	0b	0b

40

【0044】

前記表 2 の同一な文字 a、b は、平均が統計上(P=0.05、Sheffé 検定)特別な差が無いことを示し、殺だに率はアークサイン自乗根で変形させて示した。

【0045】

前記表 2 に示されたように、肉桂(桂皮)分画分のヘキサン層とクロロホルム層とが二種の実験だにに対して 1 0 0 % 殺だに活性を示した。

【0046】

[実施例 3] 殺だに活性物質分離

前記実施例 2 で殺だに活性を示すヘキサンとクロロホルム層中ヘキサン層に対して、殺だに活性物質を分離した。図 1 にヘキサン層の活性成分を分離する過程を図示した。

50

【0047】

1次シリカゲルクロマトグラフィー

ヘキサン分画10gを、シリカゲルコラム(b e r c k 70-230mesh、600g、5.5×70cm)に吸着させた後、ヘキサンとエチルアセテートとの段階的勾配(s t e p w i s e g r a d i e n t)で1次色層分析した。使用した段階的勾配は、ヘキサン：エチルアセテート比率を100：1、99：1、95：5、90：10、80：20、70：30、60：40、50：50、0：100エチルアセテート、メタノール順に進めて、各比率による分画をH1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8で溶離した。前記の8個分画は実施例1の殺だに活性検定法でだに防除性を確認して、その結果、活性を有する3個の分画H2 40.1%、H3 4.2%、H6 8.8%を分離できた。各分画を薄層クロマトグラフィーして、一つの点(s p o t)として確認される、すなわち、一つの化合物でなった分画を確認した。

10

【0048】

2次クロマトグラフィー

1次で分離した活性分画に対するシリカゲルクロマトグラフィーをさらに実施した。

【0049】

H2、H3、H6分画は、高速液体クロマトグラフィー(S p e c t r a S y s t e m P2000、Thermo Separation Products、USA)を利用してさらに精製した。

【0050】

20

H2は、流速4.0ml/min、ヘキサン-エチルアセテート(9：1)、μポラシルシリカ(μ P o r a s i l s i l i c a)(19×300mm、W a t e r s)コラム、吸光度260nmで実施して、H21、H22、H23分画を収得して、活性分画H23を化合物Iとして収得した。

【0051】

H3分画は、ヘキサン-エチルアセテート(8：2)で高速液体クロマトグラフィーを実施して、H31、H32、H33、H34分画を収得して、殺だに活性を有する分画H32を収得した。

【0052】

H6分画は、ヘキサン-エチルアセテート(7：3)で高速液体クロマトグラフィーを実施して、H61、H62、H63分画を収得して、活性分画H62を化合物IIとして収得した。

30

【0053】

3次クロマトグラフィー

2次で活性を有する分画H32をさらに精製した。

【0054】

H32分画は、シリカゲルクロマトグラフィーでヘキサン：エチルアセテート比率を10：1で溶離して活性を有する分画H322と、非活性分画H321、H323、H324とを分離した。

【0055】

40

4次クロマトグラフィー

3次で活性を有する分画H322をさらに精製した。

【0056】

H322分画は、シリカゲルクロマトグラフィーでヘキサン：エチルアセテート比率を25：1で溶離して、活性を有する分画H3223と、非活性分画H3221、H3222とを分離した。

【0057】

5次クロマトグラフィー

4次で活性を有する分画H3223をさらに精製した。

【0058】

50

H 3 2 2 3 分画は、シリカゲルクロマトグラフィーでクロロホルム：メタノール比率を 5：1 で溶離して、活性を有する分画 H 3 2 2 3 2 を分離した。

【0059】

6 次クロマトグラフィー

5 次で活性を有する分画 H 3 2 2 3 2 をさらに精製した。

【0060】

H 3 2 2 3 2 分画は、シリカゲルクロマトグラフィーでクロロホルム：メタノール比率を 30：1 で溶離して、活性を有する分画 H 3 2 2 3 2 2 を分離した。

【0061】

分離した H 3 2 2 3 2 2 分画は、流速 4. 0 ml/min、ヘキサノーエチルアセテート(10
100：1)、μポラシルシリカ(μ Porasil silica)(19×300mm、
Waters)コラム、吸光度 260nm で実施して、H 3 2 2 3 2 2 1、H 3 2 2 3 2
2 2、H 3 2 2 3 2 2 3 分画を取得して、活性分画 H 3 2 2 3 2 2 3 を化合物 I I I とし
て取得した。

【0062】

(b)前記実施例 1 で、からし油に対して生化学的活性要素を分離した。図 2 にからし油の
活性成分を分離する過程を図示した。

【0063】

1 次クロマトグラフィー

からしオイル 12 g をシリカゲルコラム(Merck 70-230 mesh、600 g 20
、5. 5 i. d. x 70 cm)に吸着させた後、核酸とエチルアセテートとの段階的勾配
で 1 次色層分析した。段階的勾配に用いた核酸とエチルアセテート比率を 100：0、9
5：5、90：10、80：20、70：30、50：50、30：70、0：100 で、各比
率による分画を MO 1、MO 2、MO 3、MO 4、MO 5 で溶離した。前記 5 分画は実施
例 1 の殺だに活性検定法で、だに防除性を確認したし、MO 2 2. 23 g 分画は強い殺
だに活性を見せた。コラム分画は薄層クロマトグラフィーして一つの点で確認される、す
なわち、一つの化合物でなった分画を確認した。

【0064】

2 次クロマトグラフィー

1 次シリカゲルクロマトグラフィーで分離した活性分画を、1 次クロマトグラフィーと同 30
じ方法を用いてクロマトグラフィーをさらに実施した。四つの分画を取得して、MO 2 1
分画 23. 2 mg は家ほこりだにに対して強力な活性物質を生成した。

【0065】

3 次クロマトグラフィー

活性分画 MO 2 1 は、生化学的活性要素を分離しようと、高速液体クロマトグラフィーを
利用してさらに分画した。MO 2 1 分画は核酸：エチルアセテート比率を 95：5 で溶離し
た。コラムは μポラシルシリカ(μ Porasil silica)(19×300mm、
Waters)吸光度 260nm で実施した。MO 2 1 1、MO 2 1 2 の二分画を取得し
て、結果的に二つの活性要素である化合物 1 と化合物 2 とで取得した。

【0066】

(b)前記実施例 1 で洋ワサビ油に対して生化学的活性要素を分離した。図 3 に洋ワサビ油
の活性成分を分離する過程を図示した。

【0067】

1 次クロマトグラフィー

洋ワサビ油 12 g をシリカゲルコラム(Merck 70-230 mesh、600 g、
5. 5 i. d. x 70 cm)に吸着させた後、核酸とエチルアセテートとの段階的勾配
で 1 次色層分析した。段階的勾配に用いた核酸とエチルアセテート比率を 100：0、9
5：5、90：10、80：20、70：30、0：100 で、各比率による分画を HO 1、
HO 2、HO 3 で溶離した。前記 3 分画は実施例 1 の殺だに活性検定法でだに防除性を試
験したし、HO 1、4. 52 g 分画は強い殺だに活性を見せた。コラム分画は薄層クロマ 50

トグラフィーして一つの点で確認される、すなわち、一つの化合物でなった分画を確認した。

【0068】

2次クロマトグラフィー

1次シリカゲルクロマトグラフィーで分離した活性分画HO1をヘキサン:エチルアセテート95:5、V/V比率でシリカゲルコラムで連続的にクロマトグラフィーを実施した。二つの分画を取得したし、HO11分画3.7gは家ほこりだにに対して強力な活性物質を生成した。

【0069】

3次クロマトグラフィー

活性分画HO11は、生化学的活性要素を分離しようと高速液体クロマトグラフィーを利用してさらに分画した。HO11分画は核酸:エチルアセテート比率を95:5で溶離した。コラムはμポラシルシリカ(μPorasil silica)(19×300mm、Waters)吸光度260nmで実施した。取得された三分画HO111、HO112、HO113中、HO111とHO112とが強い殺だに活性を見せた。結果的に二つの殺だに活性を有する要素1(化合物1)と要素2(化合物2)とが各々分離された。

【0070】

活性物質分析

前記で分離した最終活性分画(化合物I、化合物II、化合物III)の活性溶離物質の構造決定は分光分析に基づいた。EI質量分析機(JEOLGSX 400 spectrometer)、¹H-NMRと¹³C-NMR(標準物としてはTMSを利用)で同定しており、高速液体クロマトグラフィーで不明瞭なピーク(peak)に対しては¹H-¹H COSYとDEPT-NMRとで物質同定を実施した。前記で分離した活性物質はトランスシンナムアルデヒド(trans-cinnamaldehyde)、シンナミルアルコール(Cinnamyl alcohol)、サリチルアルデヒド(Salicylaldehyde)である。実施例3(b)と(c)で分離した二つの活性化合物は、ブチルイソチオシアナートとアリルイソチオシアナートとの特性を帯びる。これによりからし油と洋ワサビ油との活性化合物は同じものである。

【0071】

[実験例2]

前記実施例3の活性物質に対する殺だに活性を測定した。

【0072】

殺だに活性検定

前記実験例1で実施した殺だに活性検定法でトランスシンナムアルデヒド(trans-cinnamaldehyde)、シンナミルアルコール(Cinnamyl alcohol)、サリチルアルデヒド(Salicylaldehyde)のだに殺だに効果を測定して下記表3と表4に示した。

【0073】

【表3】

処理濃度 (mg/チューブ)	殺だに率(平均±標準偏差, %)					
	トランスシンナムアルデヒド		シンナミルアルコール		サリチルアルデヒド	
	24時間	48時間	24時間	48時間	24時間	48時間
1	100a	100a	99.0±1.0a	100a	100a	100a
0.5	84.0±5.2a	94.0±2.6a	90.0±2.6a	97.0±1.9a	89.0±5.2a	92.0±1.6a
0.4	33.0±2.5b	42.0±4.2b	56.0±2.8b	62.0±2.6b	44.0±2.8b	46.0±2.6b
0.3	25.0±2.5bc	32.0±2.8b	35.0±2.5c	40.0±3.7b	22.0±2.6c	27.0±2.5c
0.25	9.0±1.9cd	10.0±2.6bc	15.0±1.9d	14.0±2.6c	7.0±3.0d	8.0±2.8d
0.2	7.0±1.0cd	9.0±1.0c	6.0±1.2d	10.0±1.2c	6.0±1.1d	9.0±1.0d
0.125	6.0±3.5d	9.0±2.5c	1.0±1.0e	3.0±1.9d	0e	0e
対照区	0e	0d	0e	0d	0e	0e

10

20

30

40

50

【0074】

前記表3の同一な文字a、bは平均が統計上($P=0.05$ 、Sheff e検定)特別な差が無いことを示して、殺だに率はアークサイン自乗根に変形させて示した。

【0075】

前記表3は、縦紋家ほこりだにに対する殺だに活性結果として、処理48時間後に肉桂由来3種化合物すべて1mg処理水準で、100%の殺だに活性を示して、0.5mg処理水準では処理24時間後にトランスシンナムアルデヒド84.0%、シンナミルアルコール90.0%、サリチルアルデヒド89.0%の殺だに力を見せたが、0.4mg以下水準処理では有意すべき殺だに活性が観察できなかった。

【0076】

【表4】

処理濃度 (mg/チューブ)	殺だに率(平均±標準偏差、%) ^a					
	トランスシンナムアルデヒド		シンナミルアルコール		サリチルアルデヒド	
	24時間 ^b	48時間	24時間	48時間	24時間	48時間
1	99.0a ^c	100a	99.0±1.0a	100a	100a	100a
0.5	94.0±2.6a	96.0±2.3a	90.0±2.6a	97.0±1.9a	99.0±1.0a	100a
0.4	41.0±2.5b	45.0±2.5b	58.0±2.6b	65.0±1.9ab	44.0±2.8b	48.0±2.8b
0.3	32.0±1.6bc	39.0±2.5bc	39.0±2.6b	45.0±1.9b	27.0±1.9c	37.0±1.9bc
0.25	21.0±2.5cd	30.0±8.7bc	10.0±3.8c	10.0±4.1c	26.0±2.0c	34.0±2.6bc
0.2	19.0±2.5cd	29.0±1.9bc	7.0±1.0c	7.0±1.0c	22.0±1.2c	28.0±1.6c
0.125	18.0±2.6d	23.0±3.4c	1.0±1.0d	2.0±1.2c	20.0±1.6c	27.0±3.8c
対照区	0e	0d	0d	0d	0d	0d

【0077】

前記表4の同一な文字a、bは、平均が統計上($P=0.05$ 、Sheff e検定)特別な差が無いことを示し、殺だに率はアークサイン自乗根に変形させて示した。

【0078】

前記表4は、大きい脚ほこりだにに対する殺だに活性を示したことである。処理48時間後、1mg処理水準で3種化合物すべて、100%の殺だに活性を示して、0.5mg水準では処理24時間後に、トランスシンナムアルデヒド94.0%、シンナミルアルコール90.0%、サリチルアルデヒド99.0%の高い殺だに力を見せたが、0.3mg以下水準処理では有意すべき殺だに活性が観察できなかった。

【0079】

(b)前記実験例1で実施した殺だに活性検定法で、からし油と洋ワサビ油とに含まれたアリルイソチオシアナート(allyl isothiocyanate)と、ブチルイソチオシアナート(butyl isothiocyanate)とのだに殺だに効果を測定して、下記表5と表6に示した。

【0080】

【表5】

処理濃度 (mg/チューブ)	殺だに率(平均±標準偏差、%)			
	縦紋ほこりだに		大きい脚ほこりだに	
	24hr	48hr	24hr	48hr
1	100a	100a	100a	100a
0.5	92.0±2.6a	94.0±2.6a	90.0±2.6a	97.0±1.9a
0.4	33.0±2.5b	42.0±4.2b	44.0±2.8b	46.0±2.6b
0.3	25.0±2.5bc	32.0±2.8b	22.0±2.6c	27.0±2.5c
0.25	9.0±1.9cd	10.0±2.6c	7.0±3.0d	8.0±2.8d
0.2	7.0±1.0cd	9.0±1.0c	6.0±1.2d	9.0±1.2d
0.125	6.0±3.5d	9.0±2.5c	1.0±1.0e	0e
Control	0e	0d	0e	0e

【0081】

前記表5の同一な文字a、bは、平均が統計上($P=0.05$ 、Sheff e検定)特別な

差が無いことを示し、殺だに率はアークサイン自乗根に変形させて示した。

【0082】

前記表5は、濃度によって縦紋家ほこりだに(*D. pteronyssinus*)と大きい脚ほこりだに(*D. farinae*)とに対するからし油と洋ワサビ油抽出のアリルイソチオシアナートの殺だに活性結果で、処理48時間後にアリルイソチオシアナートは1mg処理水準で二だにに対して100%の殺だに率を示して、0.5mg処理水準では、処理48時間後に縦紋ほこりだにと大きい脚ほこりだにとに対して各々94%、97%の殺だに率を見せたが、0.4mg以下水準処理では有意すべき殺だに活性が観察できなかった。

【0083】

10

【表6】

処理濃度 (mg/チューブ)	殺だに率(平均±標準偏差、%)			
	縦紋ほこりだに		大きい脚ほこりだに	
	24hr	48hr	24hr	48hr
1	99.0a	100a	99.0±1.0a	100a
0.5	92.0±2.6a	96.0±2.3a	84.0±5.2a	94.0±2.6a
0.4	39.0±2.5b	45.0±2.5b	44.0±2.8b	48.0±2.8b
0.3	32.0±1.6bc	39.0±2.5bc	26.0±2.0c	34.0±2.6bc
0.25	21.0±2.5cd	30.0±8.7bc	20.0±1.6c	27.0±3.8c
0.2	7.0±1.0cd	7.0±1.0cd	1.0±1.0e	3.0±1.2c
0.125	1.0±1.0e	2.0±1.2d	1.0±1.0d	2.0±1.2c
Control	0d	0d	0d	0d

20

【0084】

前記表6の同一な文字a、bは、平均が統計上(P=0.05、Sheff e検定)特別な差が無いことを示し、殺だに率はアークサイン自乗根に変形させて示した。

【0085】

前記表6は、縦紋ほこりだにと大きい脚ほこりだにとに対するブチルイソチオシアナート(*butyl isothiocyanate*)の効果を示したことである。処理48時間後、1mg/チューブ処理水準で二だにに対してすべて100%の殺だに性を示して、0.5mg水準では処理48時間後に縦紋家ほこりだにと大きい脚ほこりだにとに対して各々96%と94%の殺だに力を見せたが0.4mg以下水準処理では有意すべき殺だに活性が観察できなかった。

30

【0086】

前記のように、5種活性化合物の殺だに活性は化合物の使用分量及び露出時間に依存する。

【0087】

[実施例4]

前記実施例3で確認された3種の殺だに活性物質の相乗効果を調べてみるために、各化合物単独処理時全く活性を見せない濃度を選定した。0.25mg単独処理時2種だにに対して活性を見せなかったために本濃度を相乗効果を確認する濃度として設定した。

40

【0088】

活性成分を各々0.25mgずつ1:1の比率で混ぜて混合物を準備した。

【0089】

- (1)トランスシンナムアルデヒド+シンナミルアルコール混合物、
- (2)トランスシンナムアルデヒド+サリチルアルデヒド混合物、
- (3)サリチルアルデヒド+シンナミルアルコール混合物、
- (4)トランスシンナムアルデヒド+シンナミルアルコール+サリチルアルデヒド混合物。

【0090】

殺だに活性物質の相乗効果は、大きい脚ほこりだにと縦紋ほこりだにとに対して実施した

50

。下記表 7 は殺だに活性物質の相乗効果を示したことである。

【0091】

【表 7】

化合混合物	処理濃度 (mg/チューブ)	殺だに率(平均±標準偏差、%)			
		大きい脚ほこりだに		縦紋ほこりだに	
		24時間	48時間	24時間	48時間
トランスシナマルアルデヒド+シ ンナミルアルコール混合物	0.25+0.25	91.0±3.4 a	98.0±0 a	83.0±1.0 b	100 a
トランスシナマルアルデヒド+サ リチルアルデヒド	0.25+0.25	95.0±1.9 a	99.0±0 a	93.0±2.5 a	100 a
サリチルアルデヒド+シナミル アルコール	0.25+0.25	99.0±1.0 a	100 a	95.0±1.9 a	100 a
トランスシナマルアルデヒド+シ ンナミルアルコール+サリチルア ルデヒド	0.25+0.25+ 0.25	100 a	—	99.2±0.8 a	100 a
安息香酸ベンジル	0.25	100 a	観察しない	88.8±3.9 b	観察しない
フタル酸ジブチル	0.25	92.0±3.8 a	観察しない	95.2±1.5 a	観察しない
DEET	0.25	96.8±3.2 a	観察しない	16.8±3.4 c	観察しない
対照区	0 b	0 b	0 d	0 b	0 b

10

【0092】

前記表 7 の同一な文字 a、b は、平均が統計上(P=0.05、Sheff e 検定)特別な
差が無いことを示し、殺だに率はアークサイン自乗根に変形させて示した。

20

【0093】

活性物質処理 24 時間後、各混合物は強い殺だに活性を示した。だに 2 種に対する混合物
の相乗作用は、処理 24 時間後までは 3 種の活性化合物をすべて混合した混合物(t r a
n s - c i n n a m a l d e h y d e · c i n a m y l a l c o h o l · s a l i c y l a
l d e h y d e)で最も強く示されたが、48 時間後には比較的差を見せなかった。各化合
物の混合処理を通した相乗効果(s y n e r g i c e f f e c t)があることを確認し
て、本発明者は合成殺だに剤として活性が卓越したことが報告された 3 種(b e n z y l
b e n z o a t e、d i b u t y l p h t a l a t e、D E E T)有機合成化合物とそ
の活性比較を実施した。有機合成化合物 0.25mg 単独処理時、大きい脚ほこりだにと
縦紋ほこりだに各々に対して処理 24 時間後に安息香酸ベンジルは 100%と 88.8%
、フタル酸ジブチルは 92.0%と 95.2%そして D E E T は 96.8%と 16.8%
の活性を示した。したがって肉桂由来化合物はこれら合成化合物の殺だに力より優れたり
大同小異であった。

30

【0094】

【発明の効果】

前記に言及したように、牡丹皮(P a e o n i a s u f f r u t i c o s a)及びからし
油(m u s t a r d o i l)は殺だに能を有する。

【図面の簡単な説明】

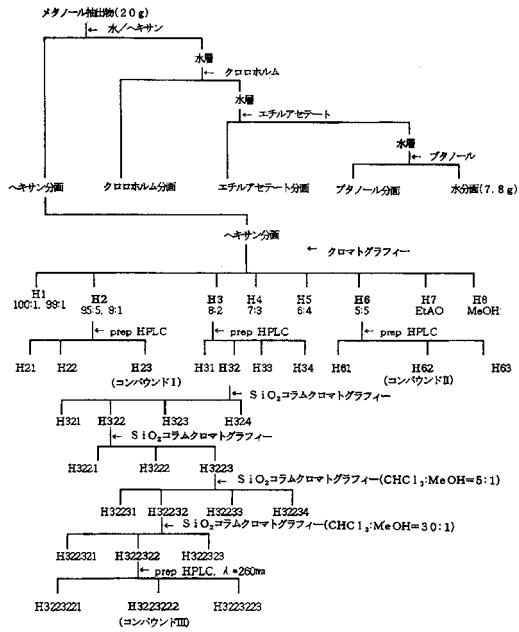
【図 1】肉桂メタノール粗抽出物のヘキサン分画を、クロマトグラフィーを実施して殺だ
に活性成分を分離する過程を図示したものである。

40

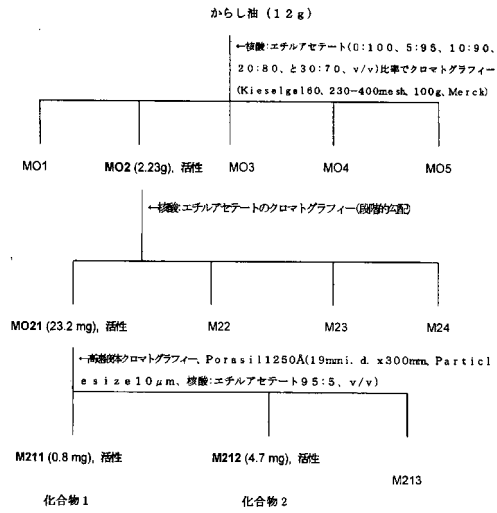
【図 2】からし油から殺だに活性成分を分離する過程を図示したものである。

【図 3】洋ワサビから殺だに活性成分を分離する過程を図示したものである。

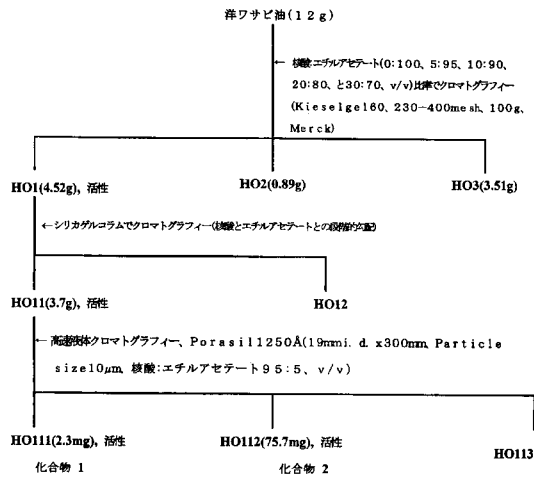
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 キム ヨン スー
大韓民国 ソウル 156-754 ドンチャク デバンドン 49-6 ヨハンヤムヘンビル
7F
- (72)発明者 キム スン イル
大韓民国 キョンギドウ 441-340 スウォンシ カンソンク グンドン 500-9 3
F
- (72)発明者 キム ヒュン ユン
大韓民国 テジョン 302-795 ソウク チュンリムドン ウーサンアパート 112-7
02

審査官 穴吹 智子

- (56)参考文献 特開平03-081202 (JP, A)
特開2000-154103 (JP, A)
特開平10-033082 (JP, A)
特開昭62-129209 (JP, A)
特開平08-027017 (JP, A)
特開昭64-019004 (JP, A)
特開平04-218595 (JP, A)
特開2002-145713 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A01N 65/00
A01N 31/04
A01N 35/02
A01N 35/04
A01N 47/46