

天然オリゴグリコシドの機能探索研究
—ナス科及びマメ科起源の配糖体を中心に—

野原 稔弘

Search for Functions of Natural Oligoglycosides—Solanaceae and
Leguminosae Origin Glycosides

Toshihiro NOHARA

Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi,
Kumamoto 862-0973, Japan

(Received October 29, 2003)

Our extensive investigation of the isoprenoidal glycosides in Solanaceae and Leguminosae folk medicines to verify their effectiveness, antiherpes and anti-HSV-1 activities, and hepatoprotective action has resulted in the elucidation of their structure-activity relationships. We present the respective optimum models here.

Key words—isoprenoid glycoside; Solanaceae; Leguminosae; antiherpes activity; anticancer activity; hepatoprotective activity

1. はじめに

本研究の端緒は、大学の植物研究部が開催する民間薬調査に参加し、平家の里で抗腫瘍剤として、またヘルペスに適用されるナス科のヒヨドリジョウゴ (*Solanum lyratum*) やイヌホオズキ (*S. nigrum*)、並びに二日酔い、肝保護剤として用いられるマメ科の葛花 (*Puerariae Flos*) を知り、強い関心を持ちそれらの有効性を科学的に証明しようとの衝動に駆られたことにある。ナス科 (Solanaceae) 植物は地球上に 90 属 2000 種存在すると言われ、一方マメ科 (Leguminosae) 植物はネムノキ亜科 Mimosoideae (150 属 3000 種)、ジャケツイバラ亜科 Caesalpinioideae (60 属 3000 種)、マメ亜科 Faboideae (440 属 12000 種) に分けられ、キク科、ラン科について大きな family で、熱帯から寒帯にまで、世界中に広く分布し、650 属 18000 種ぐらいあるとされる。両者食物としても、また民間薬としても重要であることは言を待たない。われわれの研究ではナ

ス科起源では抗腫瘍、抗ヘルペス作用などの種々の生理活性が知られるナス属 (*Solanum*) に集中し、一方、マメ科起源では、肝保護作用を有するとみられるマメ亜科 (Faboideae) に焦点を絞って研究を進めた。

2. *Solanum* Glycoside の検索

Solanum glycoside の研究の歴史は古く、¹⁾ 発展途上国などでまた身近に民間薬的に抗腫瘍剤として、並びにヘルペスに適用されるヒヨドリジョウゴやイヌホオズキ、それらの西洋種とも言える *S. dulcamara* は、ギリシア時代から抗癌剤として用いとされる。²⁾ また本研究開始後、1980 年頃中国上海の群力草薬店を訪ねると、各種癌患者に上記両生薬を多用している事実を知った。さらに、中国南部、タイ、インドではナス属植物 (イヌホオズキや *S. torvum*) を癌予防に菜食している。これらの事実を知るに、民間薬の有効性の科学的証明を目的とする本研究はさらに加速された。また、両生薬は本邦の福島、宮城県地方では口唇ヘルペス (HSV-1) や帯状疱疹 (VZV) に用いられている事実を知った。研究当時、アシクロビル (ACV) がまだ輸入されていなかったため、皮膚科のドクターの協力のもと、ボランティアを募りイヌホオズキのエキスの

熊本大学大学院医学薬学研究部 (〒862-0973 熊本市大江本町 5-1)

e-mail: none@gpo.kumamoto-u.ac.

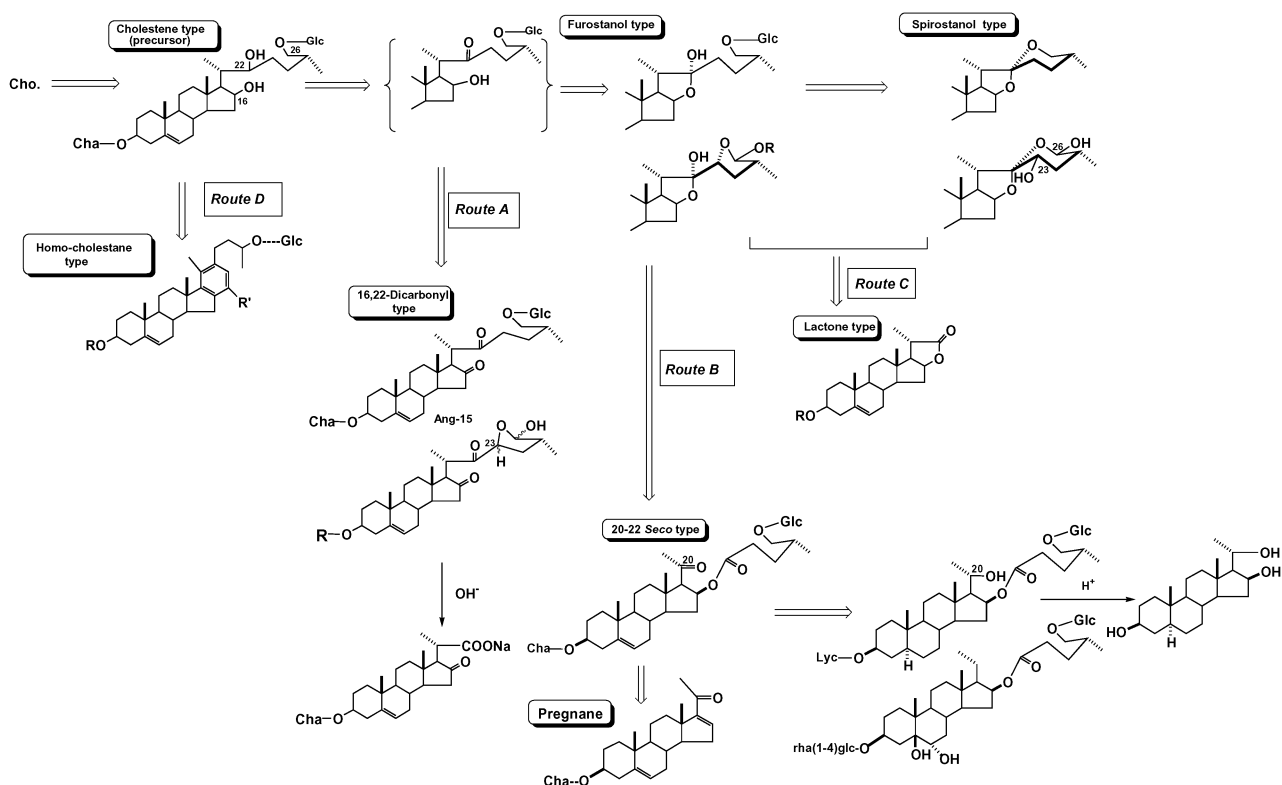
*本総説は、平成 14 年度宮田学術論文賞の受賞を記念して記述したものである。

クリームを調製し、帯状疱疹患者に適用したところ有効と判断された。³⁾ 本実験は、その後 ACV が輸入されたので、一時中断したが、ACV の耐性株の出現、また高価なことから実験を再開した。

原料ナス属植物は、採集、市販品購入、また農研機構野菜茶研より恵与戴いた種子を、熊大薬草園にて栽培したものを用いた。これまでに約 40 種のナス属植物について検索を行って (Table 1), 多くの cholestane, spirostane, furostane, spirosolane, solanidane 誘導体を得た。これらの内、代表的なものについて、hypothetical biogenesis のルート上に置いてみた (Scheme 1)。Cholesterol から furostane を経由、spirostane へ至るルートはこれまでに確立されたものであったが、われわれは新たに furostane の前駆体に相当する polyhydroxycholestane glycoside を得た。⁴⁾ また、16,22-dicarbonyl cholestane (Route A) や、Marker 分解が植物生体中で生じたような 20/22-*seco* furostane glycoside (Route B) を得た。⁴⁾ 後者はアルカリで容易に pregnane に変換され、また植物から pregnane glycoside も見い出されているので、⁵⁾ ヒトが漢方薬などで

Table 1. *Solanum* Spp. so far Investigated in Our Laboratory

<i>Solanum abutiloides</i>	<i>S. maximowiczii</i>
<i>S. achrolocucum</i>	<i>S. melongena</i>
<i>S. aculeatissimum</i>	<i>S. mummosum</i>
<i>S. aethiopicum</i>	<i>S. muricatum</i>
<i>S. anguivi</i>	<i>S. myriacantum</i>
<i>S. biflorum</i>	<i>S. nigrum</i>
<i>S. chacoense</i>	<i>S. nodiflorum</i>
<i>S. cilistum</i>	<i>S. paniculatum</i>
<i>S. cynathem</i>	<i>S. reflexum</i>
<i>S. demissum</i>	<i>S. sanitwongsei</i>
<i>S. depilatum</i>	<i>S. sisymbriifolium</i>
<i>S. dulcamara</i>	<i>S. spinosissimum</i>
<i>S. ferox</i>	<i>S. sodomaemum</i>
<i>S. gilo</i>	<i>S. stramonifolium</i>
<i>S. indicum</i>	<i>S. surattense</i>
<i>S. integrifolium</i>	<i>S. torvum</i>
<i>S. japonense</i>	<i>S. toxicarium</i>
<i>S. jurpeva</i>	<i>S. ruberosum</i>
<i>S. khasianum</i>	<i>S. vanhuerchii</i>
<i>S. lycocarpum</i>	<i>S. vervascifolium</i>
<i>S. lyratum</i>	<i>S. viarum</i>
<i>S. macrocarpon</i>	<i>S. xanthocarpum</i>

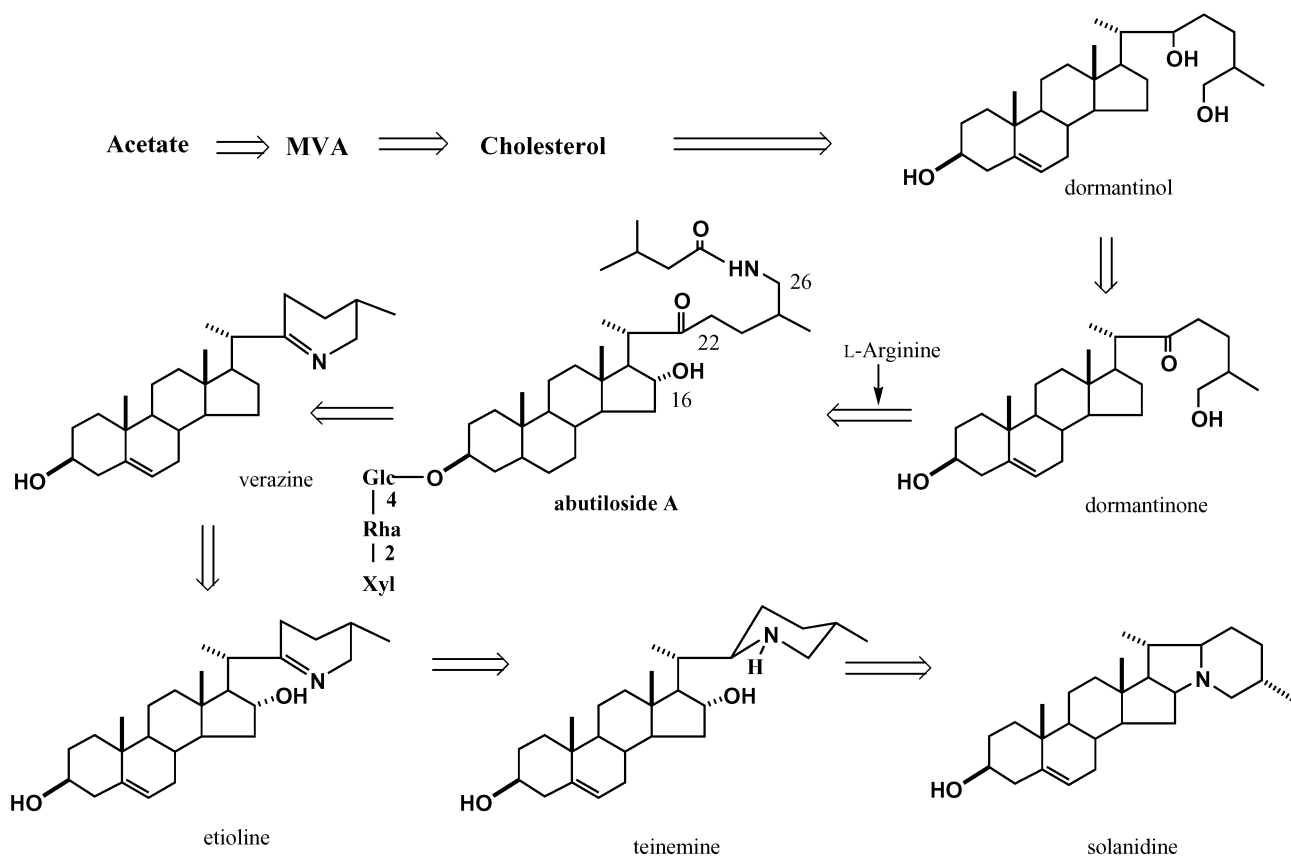


Scheme 1. Neutral Glycosides Obtained from Solanum Plants and Their Speculative Biogenesis

steroidal glycoside を多量に摂取した場合など（麦門冬湯や雲南白朮など）は、極微量は steroidal hormone に変わり得る可能性を示唆している。Steroidal glycoside の生理活性に antifertility activity もみられることなどを考察するに、その代謝を明らかにすべき、また抗腫瘍の活性メカニズムを明らかにする目的も相まって、目下それらの研究を急いでいる。また、C₂₂-lactone glycoside は spirostane, furostane に由来するものとみられた（Route C）と言うのも、22,26-hydroxyfurostane や 23,26-dihydroxyspirostane を酸処理すると容易に lactone 体を生成するからである。これまでに、この種の lactone 体は、種々の植物から得られているが、⁶⁾ それらの生合成的示唆はない。さらに polyhydroxy-cholestane に acetyl CoA や malonyl CoA が縮合し、E-環に相当する箇所が benzene 環になった glycoside (*homo*-cholestane type) も見出された。⁷⁾ また、*S. abutiloides* からは solanidane の precursor に相当する glycoside (Scheme 2) が、⁸⁾ さらに、*S. cilistum* からは多数の ergostane が見出された。⁹⁾

3. Cytotoxicity

かつて中国上海地区の薬草商で癌治療の主要な基本法として繁用された竜蛇羊泉湯¹⁰⁾の構成生薬、ヒヨドリジョウゴ、イヌホオズキの有効成分が、solanidane, spirostanol, spirosolane glycoside であることを明らかにした。¹¹⁾ ついで代表的な sapogenol (spirostane, furostane, spirosolane, solanidane) と糖部 (chacotriose, solatriose, それらの 2 糖, 1 糖体) の組み合わせを変えた 15 種のサンプルについて、ヒト肺癌細胞株 (PC-6), ヒト大腸癌細胞株 (SW620), マウス白血病細胞株 (P-388), ヒト乳癌細胞株 (MCF-7), ヒト胃癌細胞株 (NUGC-3) に対する作用をみた。意外なことにいずれの細胞株に対しても spirostanol が活性が強く、糖部は chacotriosyl 基が良いことが判った。¹²⁾ ついで、spirostane type (28 種), furostane type (16 種), spirosolane type (7 種), solanidane type (2 種), cholestane type (3 種), *homo*-cholestane type (1 種), 20/22 seco type (2 種), pregnane type (1 種), C₂₂-lactone type (1 種), ergostane type (15 種),



Scheme 2. Precursor, Abutiloides A, for Solasodane Glycoside

計 76 種について、ヒト肺癌細胞株 (PC-12, NCI-H460), 及びヒト大腸癌細胞株 (HCT 116) に対する増殖抑制活性を検討した. また, 一方, spirostane type (5 種), furostane type (4 種), spirosolane type (5 種), solanidane type (2 種), cholestane type (1 種), homo-cholestane type (1 種), pregnane type (1 種), ergostane type (7 種), 計 26 種について, ヒトメラノーマ細胞株 (HTB 68) 及びヒト膀胱癌細胞株 (T 24) に対する増殖阻害活性を検討した. その結果, PC-12 及び HCT 116 では SL-4 (それぞれ, GI_{50} 0.03, 0.22 μ M) に最も強い活性がみられた. 一方, HTB 68 及び T 24 に対しては, neoaspidistrin (それぞれ, CI_{50} 0.33, 0.21 μ M) 及び withametelin (それぞれ, CI_{50} 0.13, 0.26 μ M) に活性が認められた. この一連の試験において言えることは, 糖部は β -chacotriosyl 及び β -lycotetraosyl 基で, アグリコン部は spiroketal の場合が *in vitro* で最も強い活性が発現され, その強さは spirostane, solanidane, furostane, spirosolane の順になった. 結局, 各種 cell line に対して最も有効なのは, aglycone 部は典型的な spirostanol の diosgenin, yamo-

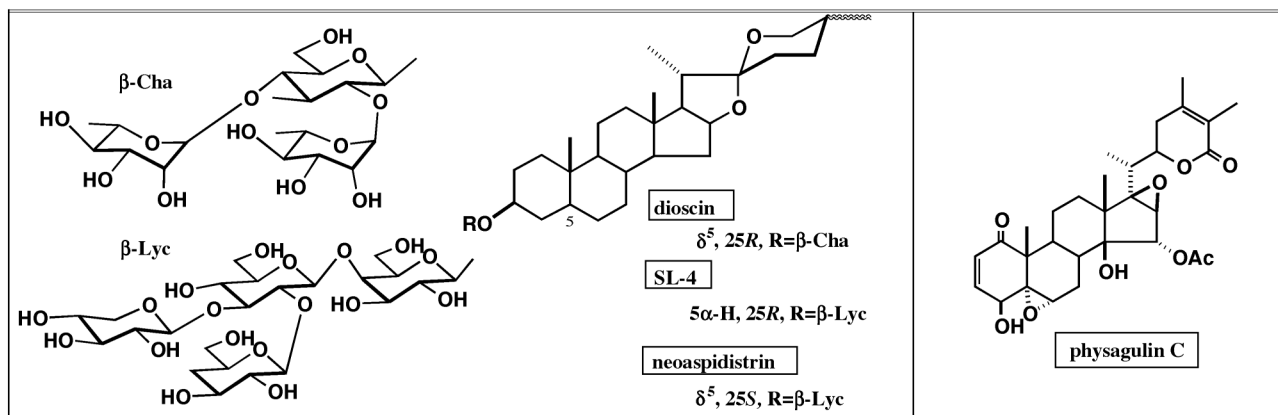
genin, tigogenin で, 一方糖部は β -chacotriosyl 及び β -lycotetraosyl 基と言う結果が得られた (Table 2). 糖部が細胞表面のレクチンを認識, 細胞内に入りその後アグリコン部が, リソゾームやミトコンドリアに影響を与え細胞の破壊につながるのではと推定される. 活性の中心はスピロケタールの部分とみられる. ナス属植物にはこれら spirostanol glycoside が普遍的に多く含まれているので, 民間薬的に抗腫瘍剤として古来より用いられる事実を証明する一資料となり得るものと考ええる.

4. Anti-HSV-1 Activity

ヒヨドリジョウゴやイヌホオズキは, 抗腫瘍生薬として用いられるほか, 本邦で古くから民間薬的に HSV-1 や VZV に用いられていることは上述した. ヘルペスウイルスは, 再発を起こすことがその大きな特徴であり, 特に抵抗力が低下した宿主では, 初感染や再発の際に症状の全身化・重傷化がみられる場合がある. また, 最近では若年性の帯状疱疹などもみられ問題視されている. これらヘルペス治療にはもっぱら ACV 系の薬剤が使用されているが, チミジンキナーゼ (TK) を産生しないサイトメガロ

Table 2. Cytotoxic Steroidal Glycosides

PC-6, SW620, P-388, MCF-7, NUGC-3	⇒ dioscin
PC-12, NCI-H460	⇒ SL-4
HCT 116	⇒ SL-4, physagulin C
HTB 68	⇒ withametelin, neoaspidistrin
T 24	⇒ neoaspidistrin, withametelin, α -tomatine



ウイルスには無効であり、また TK 欠損株、TK 変異種、そして DNA ポリメラーゼ変異株などの ACV の耐性株の出現が問題となっている。また、ACV は薬価が高く医療費の点からも問題がある。そこで抗ヘルペス作用を有するとされる民間薬の有効性を証明、その活性本体を明らかにするために本研究に着手した。宿主細胞には Vero cell (アフリカミドリザル腎由来の cell line) を、ウイルスは Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) を使用した。

Table 3 に示すように、spirostanol type glycoside の活性が最も強く、その中でも diosgenin を sapogenol とし、その 3 位の水酸基に β -chacotriosyl 基が結合した典型的な中性配糖体 dioscin が強いことが判明した。¹³⁾ これに tomatidine type, ergostane type, spirosolane type glycoside が続く。活性が弱いのは furostane type と 3,5-cycloergostane type であった。別途、*S. nigrum* の全草の MeOH エキスを Diaion HP-20 に付し、その MeOH 溶出分画、SNG-1, SNG-2 についても同様に試験を行ったところ、SNG-2 も強い活性を示した。SNG-2 も spirostanol type glycoside とみられた。また一方、

Vero 細胞に対する細胞毒性をみたが、spirosolane type 及び tomatidine type, すなわち steroidal alkaloid はやや毒性を示すことが判明した。抗ウイルス係数については、spirostane type glycoside の SNF-10 はかなり良い値を示した (Table 3)。

次にイヌホオズキの MeOH エキスを hexane で脱脂後、1-BuOH と水で分配、有機層の溶媒を留去して得られる残渣について、白色ワセリンにて 0.5% 軟膏を調整して帯状疱疹患者 (Volunteer) に外用した。10 症例の内 7 症例に著効を示し、1 症例に有効であった。鎮痛作用、上皮形成の両面において、著効しているものと判断された。

ナス属を離れて次に *Datura*, *Tubocapsicum*,¹⁴⁾ *Physalis*, *Nicandra*, *Petunia* 属などからは構造的には興味ある ergostane の誘導体が得られたが、抗腫瘍に関しては活性はあまりみられず、やはり、1 分子中に 2 個の α , β -不飽和カルボニル基を有する典型的な withanolide が活性が強いことが判明した (Fig. 1)。

また、ピーマンやトウガラシなどのトウガラシ属 (*Capsicum*) からは、acyclic diterpene 類を得た。¹⁵⁾

Table 3. Anti-HSV-1 Activity

				(EC ₅₀ : μ g/ml)			
Spirostan Type		Tomatidine Type		Ergostane Type		Solasodane Type	
R=S1 (dioscin)	R=S1 17 α ,26 β -diOH	R=S2 17 α ,26 β -diOH	R=S1 (β -solamarine)	R=S1	R=S1	R=S1 (solamargine)	
0.56	0.92	1.30	0.90	1.92	1.95		
Nuatigenin Type		3,5-Cyclo-ergostane Type		Furostane Type		Sugar Parts S1=glc- ² -rha 4 rha (chacotriosyl) S2=glc- ² -rha ara 6 4 rha (fur) S3=gal- ⁴ -glc- ² -glc 3 xyl (lycotetraosyl)	
R=S1	R=H	R=Me	R=S1	R=S3	R=S1 17 α -OH		
2.70	5.00	16.0	9.20	>20.0	7.80		

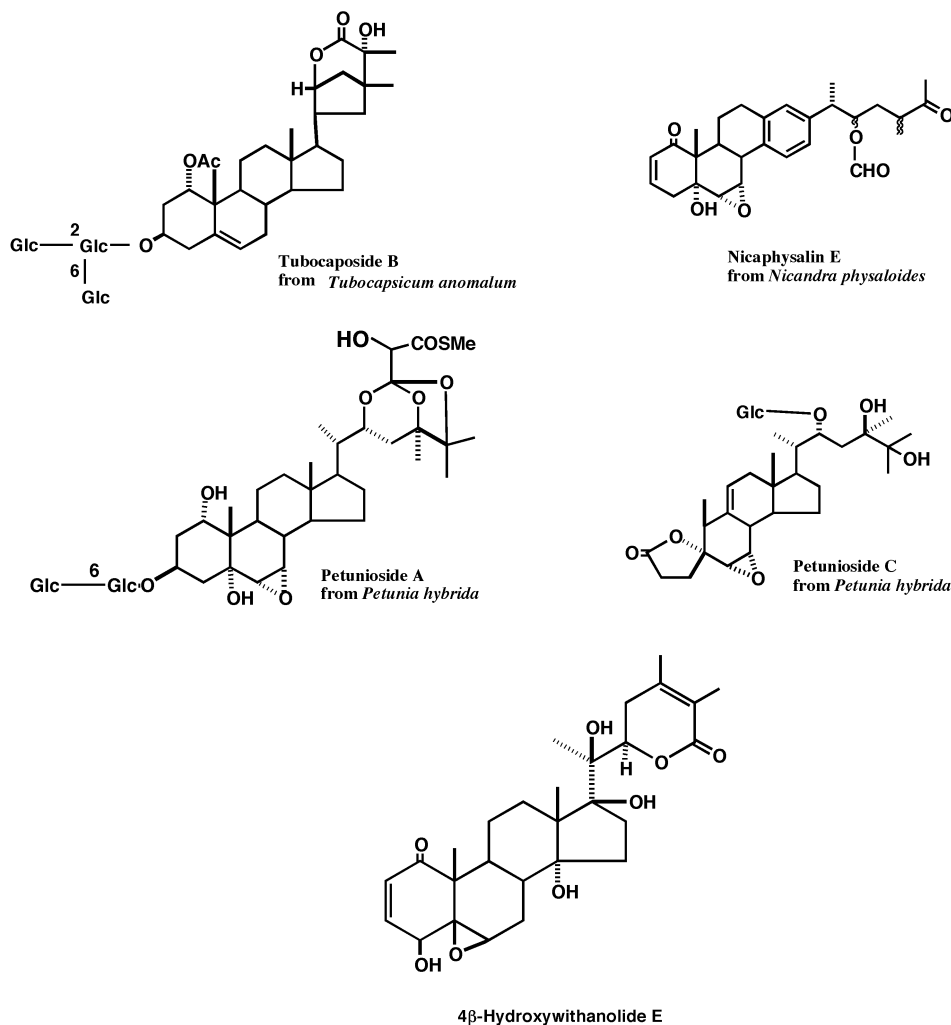


Fig. 1. Ergostane Derivatives from Some Solanaceous Plants

これらは脂質代謝促進作用や anti-renin, ACE 阻害活性を有していた (Fig. 2).

さらに、成熟トマト (*Lycopersicon esculentum*) から初めて steroidal alkaloid 配糖体を単離、esculeoside A, B-1, B-2 と命名した.¹⁶⁾ これらは強い抗酸化活性を有する lycopine とともに生理的にも健康野菜として意義ある成分とみられ、目下生理活性試験を急いでいるが、抗腫瘍活性並びに抗動脈効果がみられている (Fig. 3).

以上のごとく、solanaceous glycoside の有効性は *in vitro* では一応証明できたものの、実際には糖部は細胞を認識するのか？ Aglycone (若しくは glycoside) の細胞破壊のメカニズムはいかに？ と大きな問題が残っている。今、われわれはこれらのことを解明すべき実験に取りかかっている。これらの民間薬の効き目は、世に出ている抗癌剤には数値

的には劣るものであるが、タイのスープに *Solanum torvum* を多用するように、日常的に摂食すれば予防医学的に有効だと言えよう。上記のようにトマト (成熟果実) の新規主成分の spirosolane や solanocapsine-type glycosides, esculeoside 類も cytotoxicity を有し、食と薬の関連性においても興味は尽きない。

5. 葛花

マメ科植物は、食料、飼料、医薬品、染料、農薬、緑肥、木材、街路樹、観葉植物、防砂樹、土壤流出を防ぐカバープラント、衣料、装身具など、利用範囲は多岐にわたり、総合的な有用性ではマメ科に勝る植物はないであろう。

葛花はマメ科クズ (*Pueraria lobata*) の花部で、酒毒を解す目的で、二日酔いの嘔吐やその予防に民間薬的に用いられる。また、漢方薬・葛花解醒湯の

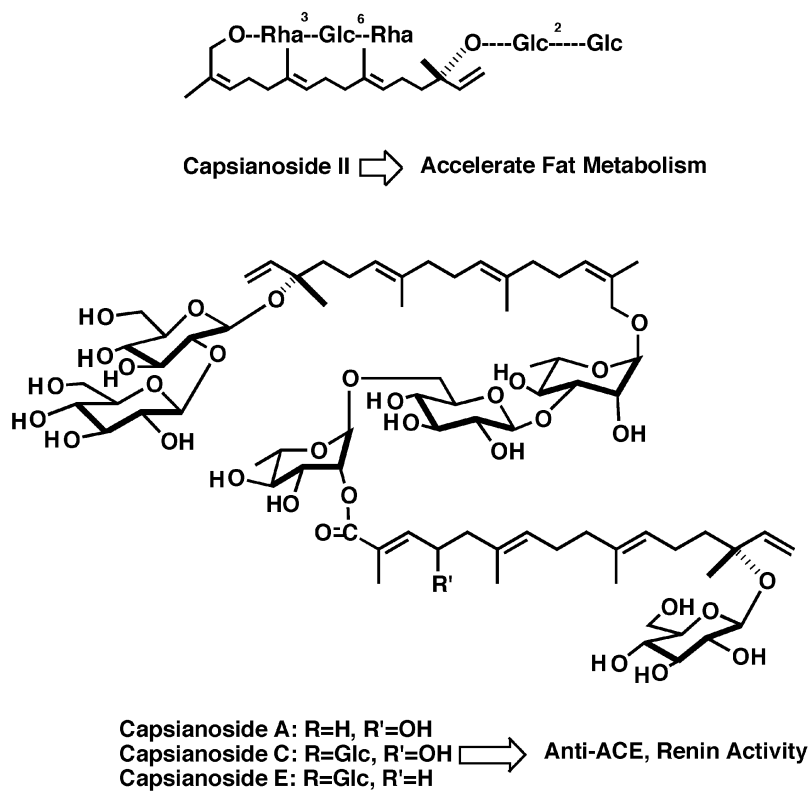
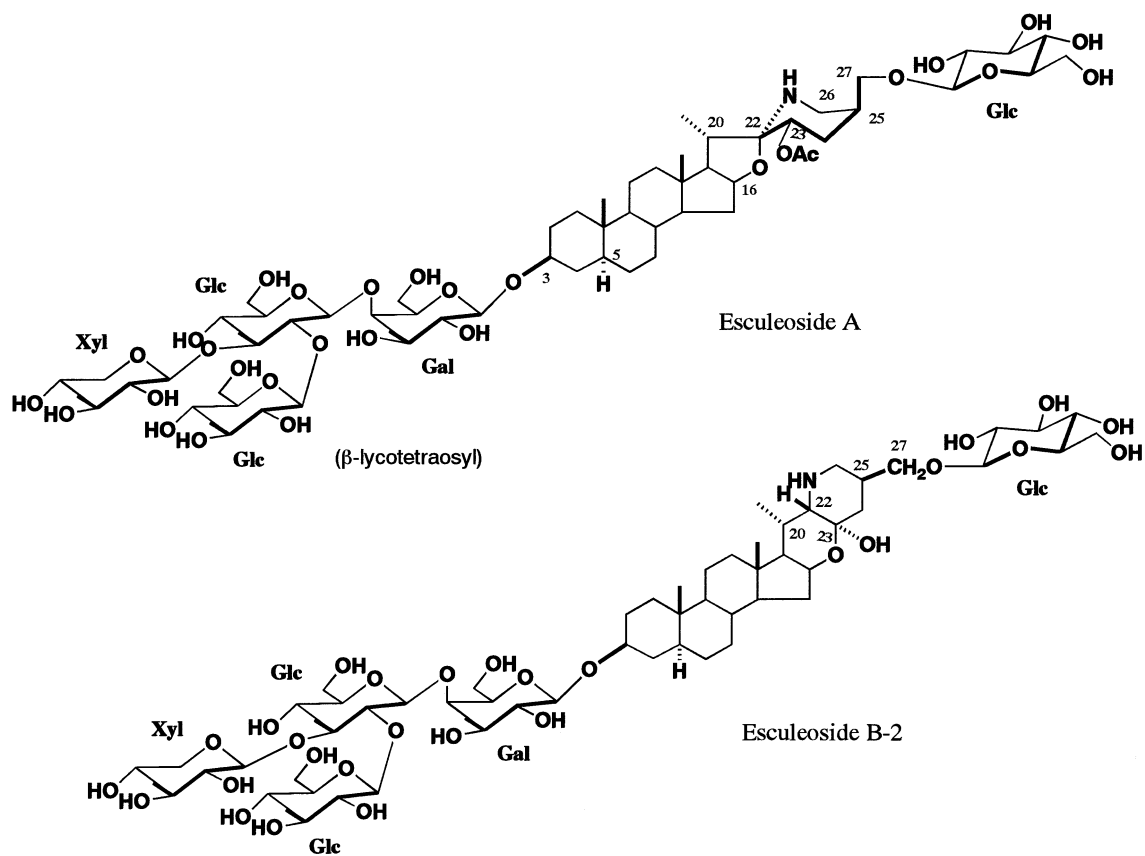
Fig. 2. Capsianosides from *Capsicum annuum*

Fig. 3. Tomato Steroidal Alkaloid Glycosides

主薬でもある。世界中に分布するが、主な品種は、*P. lobata* (日本, 中国, 韓国) のほかに、*P. thomsonii* (中国, 台湾), *P. mirifica* (タイ), *P. tuberosa* (インド) などがある。中国, 台湾の各市場の葛花を購入し、HPLC プロフィールを分析した結果、揚子江付近の北緯 30 度付近を境に、北部 (四川, 湖北) では *lobata* 基原の、南部には *thomsonii* 基原のクズが分布することが判った。*P. lobata* 基原の葛花の主要成分は、isoflavone (5.6%) と triterpene glycoside (2.4%) である。*P. lobata* 基原と *thomsonii* 基原のものを比較すると、前者の isoflavone 成分としては、kakkalide が圧倒的に多く、後者では kakkalide はみられず、多種の isoflavone からなる。一方、triterpene glycoside 成分においては、両者ほぼ同じパターンを示した。¹⁷⁾ Triterpene glycoside は、oleanene-type glucuronide で、soyasaponin I, kaikasaponin III 及び kakkasaponin I である (Fig. 4)。¹⁸⁾ マメ亜科にはこの種の oleanene-type glucuronide 配糖体を含有する点において特徴的であることが判明した。すなわち、28

位にメチル基、E 環に酸素官能基をとるものが多く、糖部は、rhamnose (1→2) galactose (1→2) glucuronic acid (Fabatriosyl 基と命名) が、triterpene の C-3 位の水酸基に結合した oligoglycoside が最も一般的で、glucuronic acid を含む場合が多い。

さて、薬理作用であるが、まず、マウスにエタノールを投与すると、血中アルコール、アセトアルデヒド、及び自発行動の数値が上昇する。この状態で葛花エキスを投与すると、アルコール、アセトアルデヒド濃度とも減少する効果がみられた。葛花エキスはアルコール代謝を促進することが判明した。¹⁹⁾ これを oleanene glucuronide と isoflavone に分画すると、isoflavone 画分には本作用がみられたが、一方 oleanene glucuronide 画分には認められなかった。アルコール誘発性の種々の代謝異常に関しては、エタノール投与に伴う血糖値 (BG) や中性脂質 (TG) 上昇を葛花エキスが抑制した。分画後は oleanene glucuronide のみが中性脂質を下げるということが判明した (Fig. 5)。次に飲酒と肝疾患の間には関連性があることから、実験的肝障害モデルに対

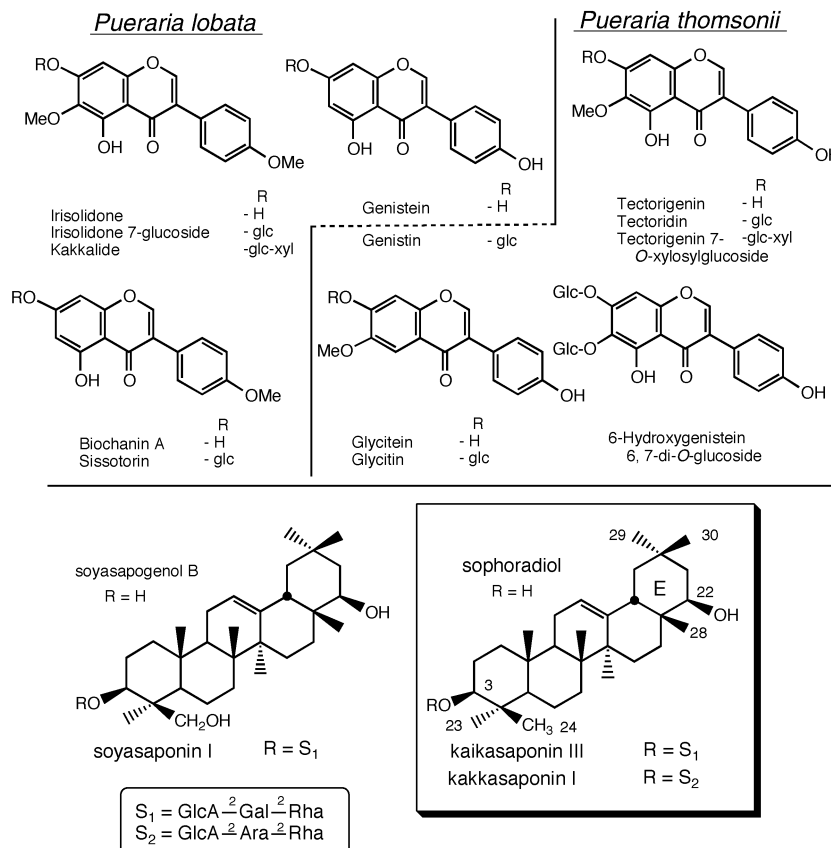


Fig. 4. Isoflavone and Oleanene Glucuronides Obtained from Puerariae Flos

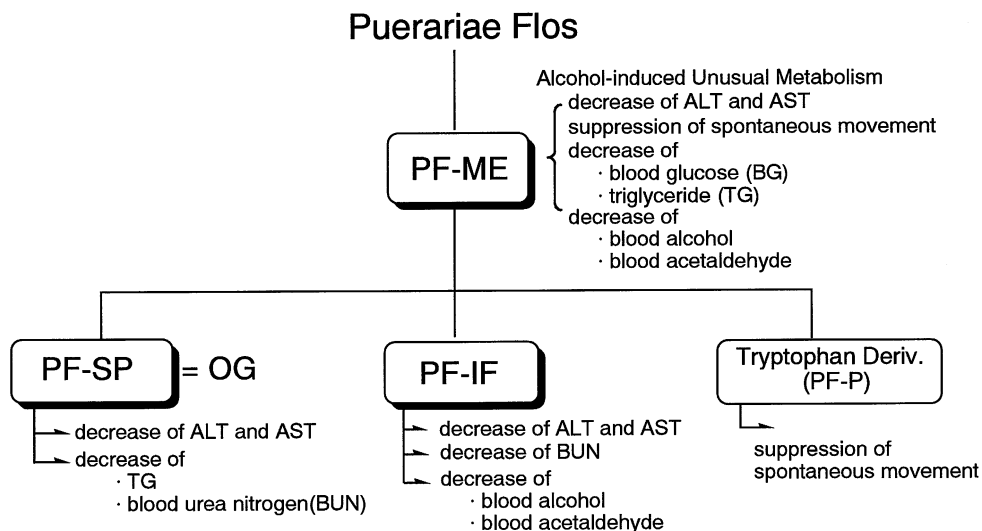


Fig. 5. Pharmacological Effects of Puerariae Flos on Alcohol-Induced Unusual Metabolism

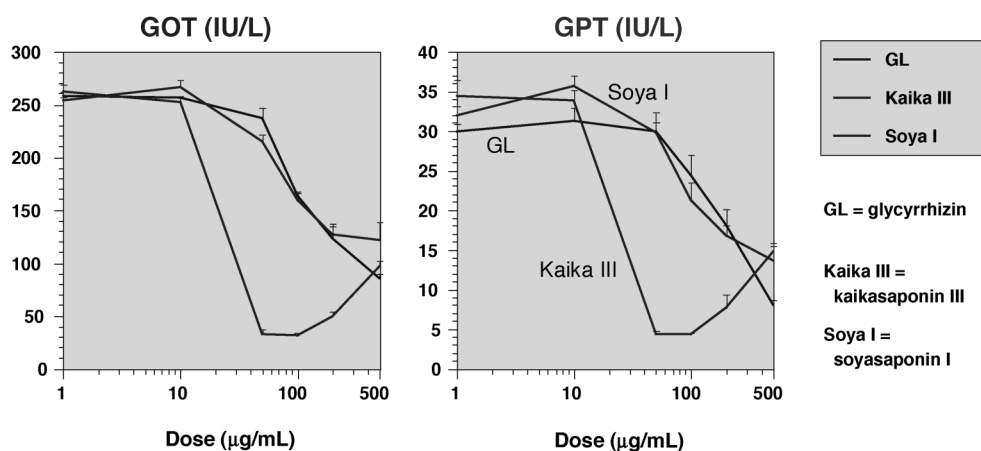


Fig. 6. *In vitro* Hepatoprotective Activity (CCl_4 Hepatitis Model)

する影響を検討した。²⁰⁾ まず高脂肪食誘発性肝障害モデルにおいては、エキス及び両フラクションにも、GPT (ALT) 値改善効果が認められた。四塩化炭素誘発性肝障害モデルでは、分画後のフラクションに GOT (AST), GPT (ALT) 値改善効果が認められた。また、単離した主 isoflavone, kakkalide は、アルコール性の致死率や肝障害を改善し、また血糖値上昇を抑制した。一方、*P. thomsonii* 中の tectoridin, tectoridin xyloside もアルコール誘発性の種々の代謝異常値を改善した。²¹⁾

次に、ラット初代培養肝細胞を用いて、主 oleanene glucuronide の肝保護作用を調べたところ、葛花の主成分でもある sophoradiol glucuronide の kaikasaponin III に非常に強い保護作用があること

が判った (Fig. 6).²²⁾ さらに、免疫学的機序に基づく *in vitro* モデル (Fig. 7) を用いて、葛花サポニンを評価した。Kaikasaponin III は soyasaponin I よりも強い保護作用を示した。²³⁾ 部分加水分解して得られる diglycoside, kaikasaponin I は非常に強い保護作用を示した。しかし、monoglycoside, sophoradiol monoglucuronide の活性は弱く、高濃度で毒性を示した (Table 4).²³⁾ そこで、これらサポニンの肝細胞に対する直接的な毒性を試験した。抗血清非添加のもと、sophoradiol 及び soyasapogenol B glucuronide を加え培養したところ、sophoradiol monoglucuronide のみ、中—高濃度で毒性を示し、本物質は肝細胞に対し直接的な毒性を示すことが明らかとなった。²³⁾ Oleanene glucuro-

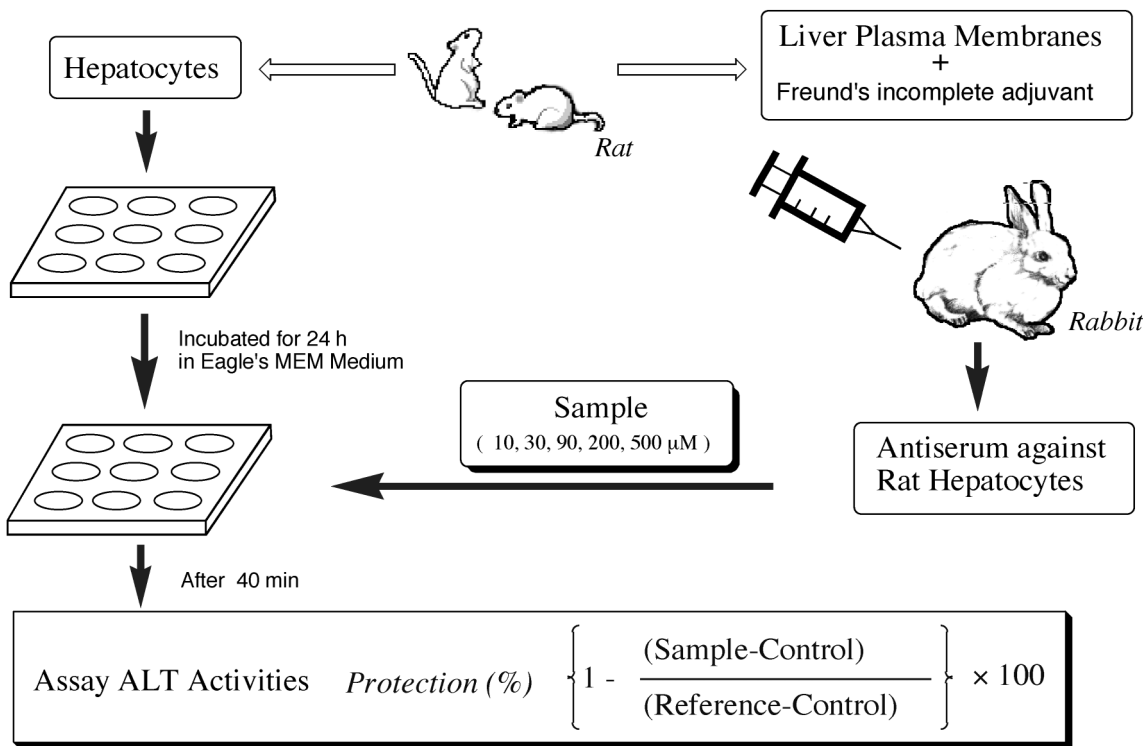


Fig. 7. *In vitro* Immunological Hepatitic Model

Table 4. *In Vitro* Hepatoprotective Activity (Sophoradiol Analogs)

Substance	Dose (μM)	ALT	
		IU / L	Protection (%)
Control	-	5.15 ± 1.2	-
Soyasaponin I	0 (Ref)	70.75 ± 1.7	-
(positive control)	10	71.25 ± 2.6	-1
	30	71.00 ± 3.8	0
	90	70.75 ± 5.2	0
	200	61.75 ± 5.3	14
	500	32.00 ± 2.2**	59
Kaikasaponin III	0 (Ref)	71.50 ± 1.7	-
	10	68.50 ± 3.7	5
	30	69.50 ± 2.6	3
	90	65.00 ± 4.5	10
	200	49.00 ± 2.4**	34
	500	18.00 ± 1.6**	81
Kaikasaponin I	0 (Ref)	72.25 ± 3.8	-
	10	70.25 ± 3.1	3
	30	60.75 ± 4.1*	17
	90	21.25 ± 2.9**	76
	200	9.75 ± 1.7**	93
	500	9.50 ± 2.1**	94
Sophoradiol monoglucuronide (SoMG)	0 (Ref)	72.50 ± 1.3	-
	10	69.50 ± 5.1	4
	30	68.50 ± 4.4	6
	90	72.25 ± 3.0	0
	200	60.50 ± 2.5*	18
	500	105.30 ± 2.2#	-49
Sophoradiol	0 (Ref)	69.50 ± 2.4	-
	10	69.50 ± 3.7	0
	30	67.25 ± 1.3	3
	90	68.25 ± 2.8	2
	200	69.25 ± 2.2	0
	500	61.00 ± 2.0*	13

The data mean ± S.D. for 4 independent cell preparations. Significantly different from Ref., **p*<0.01., ***p*<0.001, toxic, # *p*<0.001.

nide とは対照的に isoflavone の肝保護作用はこのモデルでは全く観測されなかった。

さて、現在まで試験してきたラットで得られたデータがヒトに適用できるか否かを検討するため、ヒト由来肝細胞である HepG2 細胞を用い肝保護作用を検討した。肝障害は t-BuOOH を用いた。まず肝炎治療薬でもある glycyrrhizin を対照薬物として試験したところ、用量依存的に保護作用が観察された。葛花成分の sophoradiol 誘導体を試験したところ、アグリコン部の sophoradiol には glycyrrhizin と同様、用量依存的に保護作用が認められた。しかし、その monoglucuronide の場合、ラッ

トモデルにおいても観察された毒性が高濃度で認められた (Fig. 8)。

次に、活性酸素種は炎症における重要なファクターであることから、isoflavone の抗酸化能を ESR を用いた DPPH ラジカル消去作用で評価した。²⁴⁾ その結果、tectorigenin に比較的強いラジカル消去作用が認められた。また irisolidone も若干の活性を示した。

最近、大豆 isoflavone に代表される植物性エストロゲンが、更年期障害、ホルモン依存性の癌、虚血性心疾患などの罹患リスクを下げる事が明らかとなり注目を集めている。最近では、肝臓など生殖器

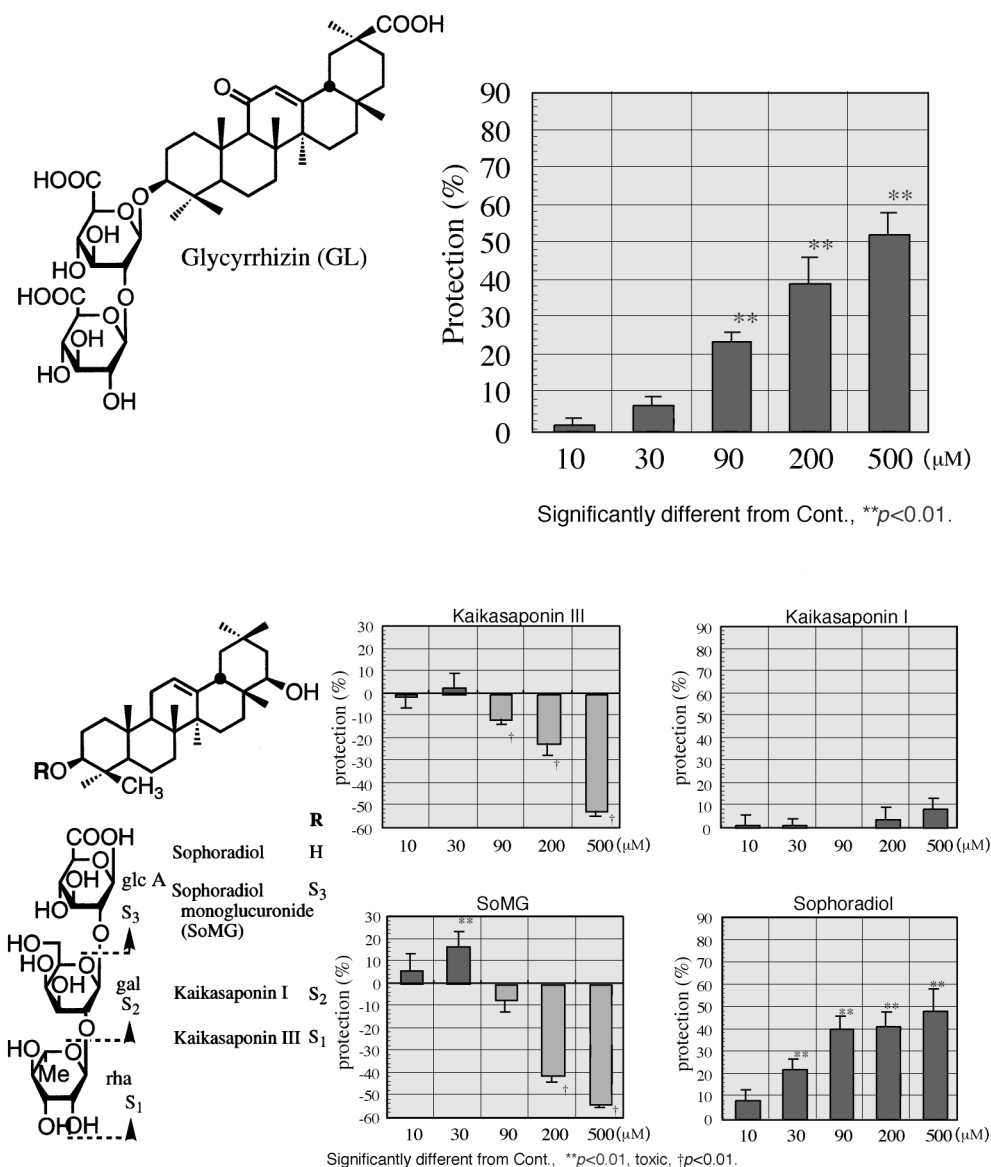


Fig. 8. Effect of Glycyrrhizin and Sophoradiol Derivatives on Human-Origin Hepatic Model

以外にもエストロゲン受容体の存在が明らかとなっており、これらと葛花 isoflavone の関連を検討するため、葛花 isoflavone のエストロゲン作用を検討した。²⁵⁾ まず、エストロゲン受容体に対する結合能は、tectorigenin に daidzein と同程度の結合能が認められた。しかし、その 4'-メチル体である irisolidone には全く活性が認められなかった (Fig. 9)。

次に、エストロゲン受容体に対する遺伝子発現能に関しては、結合能と同様、tectorigenin に daidzein と同程度の発現能が認められ、irisolidone にはほとんど活性が認められなかった。腸管並びに肝臓における代謝を考えた場合、脱メチル体が主代謝物となる可能性が高く、葛花イソフラボン は tectorigenin に代謝され、daidzein と同程度のエストロゲン作用を発揮するものと考えられる (Fig. 10)。

さらに、葛花 oleanene-type glucuronide、及び関連化合物には、強い抗補体作用を有することも判明した (Table 5)。²⁶⁾ また、金銭草 (Desmodii Herba) より得られた soyasaponin I は、尿管結石阻害活性作用を有しているが、²⁷⁾ 尿量増加作用も観察されたことより、腎臓に対する作用もあることが推察された。そこで、腎臓細胞に対する直接の作用を検討す

べく、*in vitro* 腎保護モデルを構築した。まず、腎臓細胞としてアフリカミドリザル腎細胞であるベロ細胞を用い、それに対する抗体を作製し、腎細胞に対する保護作用を検討することにした。Oleanene glucuronide の腎保護作用を検討したところ、soyasapogenol B 関連化合物に保護作用が認められた。また、sophoradiol triglycoside である kaikasaponin III にも若干の活性が認められたことより、葛花 oleanene glucuronide は腎臓に対する保護作用を有していることが明らかとなった (Fig. 11)。

最近、大内教授 (東北大) らは、韓国産生薬・射干から炎症性シクロオキシナーゼである COX-2 タンパク合成誘導阻害作用物質として、isoflavone の tectorigenin 及び tectoridin を見出している。これを契機に、韓国産の葛花の薬理作用が活発に検討されている。さらに、tectorigenin の抗菌作用、tectorigenin, irisolidone, genistein の抗ヘリコバクター・ピロリ作用、tectorigenin, genistein の前骨髄性白血病 (HL-60) 細胞分化作用なども報告されている。

葛花の薬用資源としての特徴は、豊富に isoflavone と oleanene glucuronide を含むことであり、

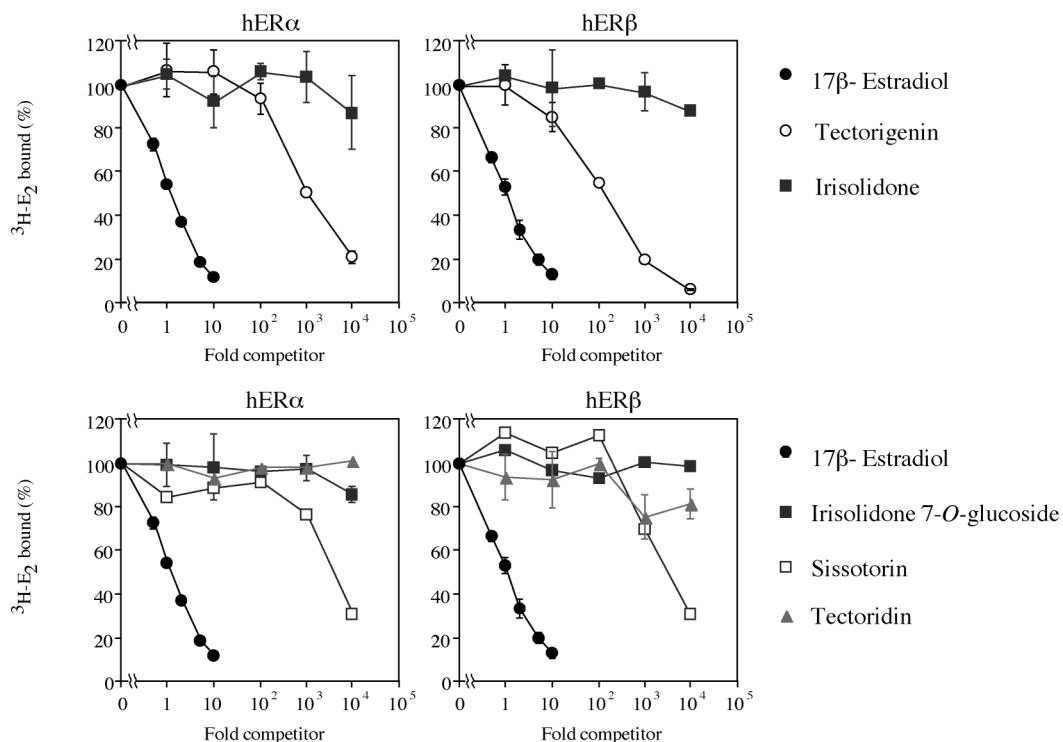


Fig. 9. Combination Ability of Puerariae Isoflavones

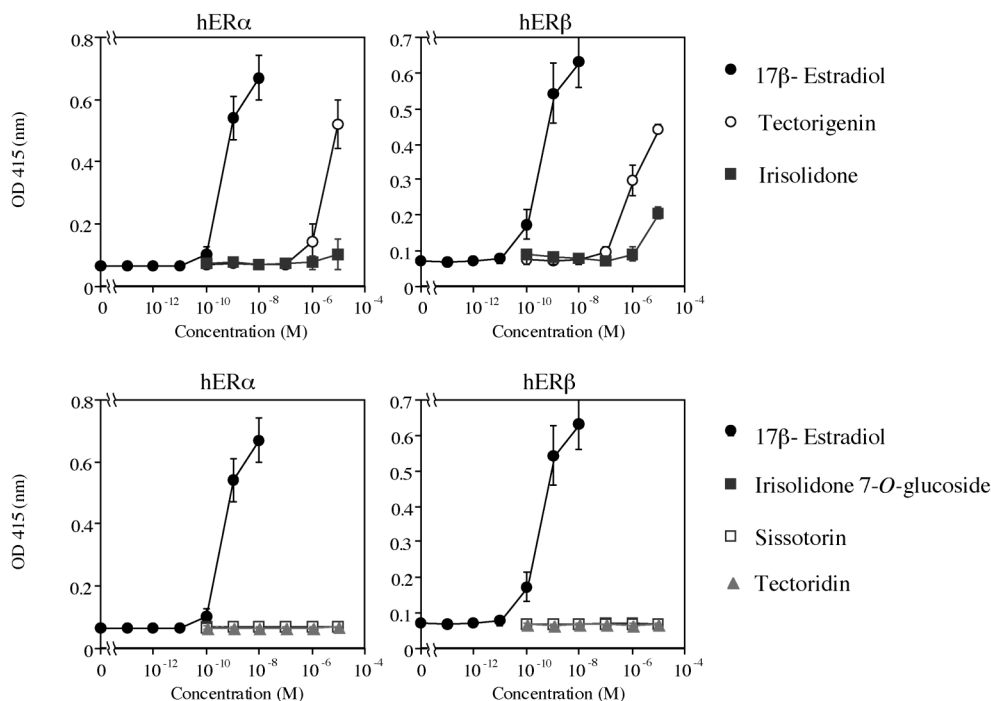


Fig. 10. Gene Appearance Ability of Puerariae Isoflavones

Table 5. Anti-Complemental Activity

Substance	IC ₅₀			% inhibition
	Free acid (-COOH)	Sodium salt (-COO ⁻ Na ⁺)	Methyl ester (-COOCH ₃)	Reduction product (-CH ₂ OH)
Soyasaponin I	10 μ M	-11% (35 μ M)*	30 μ M	-5% (100 μ M)*
Soyasaponin III	6.8 μ M	42 μ M	40 μ M	-2% (100 μ M)*
SBMG	7.9 μ M	15 μ M	35 μ M	4% (100 μ M)
Kaikasaponin III	44 μ M	50 μ M	180 μ M	29% (100 μ M)
Kaikasaponin I	2.6 μ M	14 μ M	210 μ M	12% (100 μ M)
SoMG	9.9 μ M	30 μ M	660 μ M	-20% (100 μ M)*

SBMG: Soyasapogenol B monoglucuronide, SoMG: Sophoradiol monoglucuronide. symbol *: hemolytic.

この点において、マメ科の代表的植物性エストロゲン、大豆の特徴と重複する。生体内恒常性（ホメオスターシス）の維持機能は、神経-内分泌-免疫系の情報伝達系が司っているが、葛花には oleanene glucuronide（免疫系）、isoflavone（内分泌系）と2つの調節因子が含まれており、葛花の摂取は情報伝達系の協調的な制御メカニズムにおいて、Fig. 12に示すようなマルチファンクショナルな働きでもって、アルコールという毒物による代謝異常（酒毒）を解す作用につながるものと推測している。

以上のような実験を礎として、葛花は栄養補助食品として、「お酒の好きな人の健康維持に」という

キャッチフレーズで共同実験者の製薬会社より発売された。

6. 鶏骨草

中国広東省、東南アジアで古くから民間薬として用いられ、中国南部ではウイルス性肝炎の治療に、さらに近年では香港の大病院にて各種肝炎の特効薬として用いられる。中国では本生薬を主薬とする「鶏骨草丸」が市販されている。

本生薬鶏骨草（Abri Herba）の基原は *Abrus cantoniensis* の全草であり、メタノールエキスを比較的極性の弱い oleanene glucuronide (OG-I) とやや強い oleanene glucuronide (OG-II) 群に粗く2

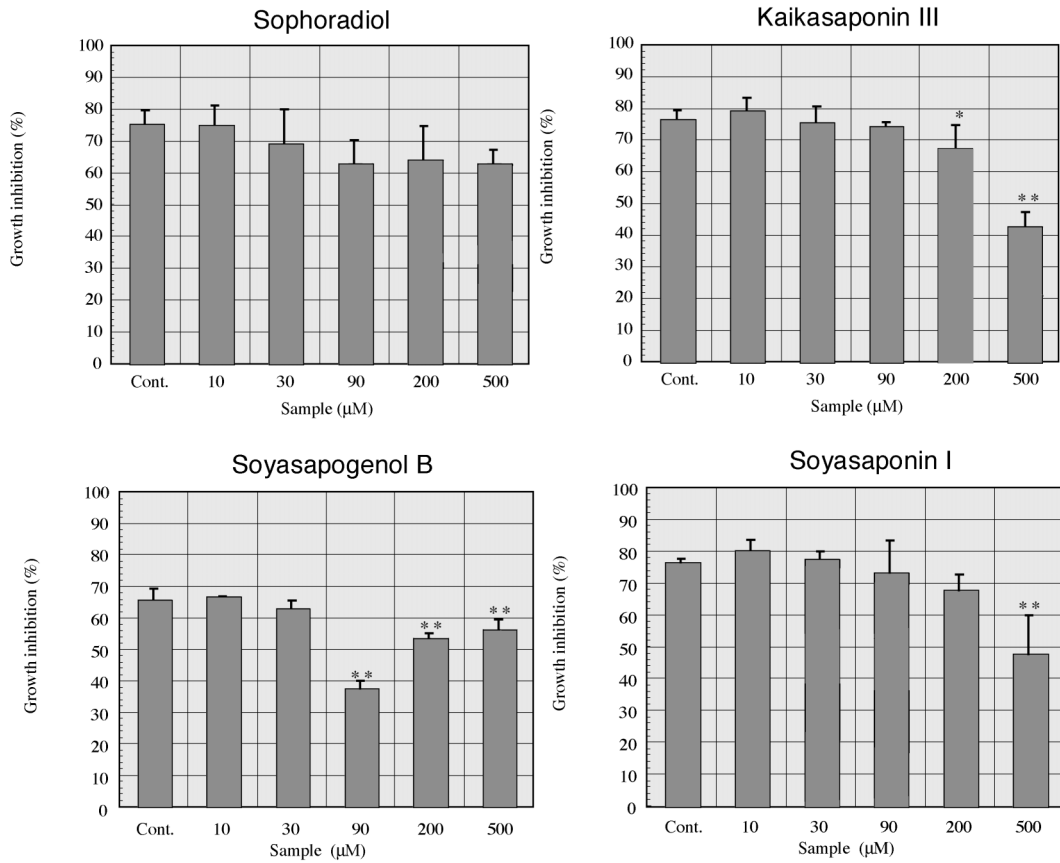


Fig. 11. Kidney-Protecting Activity

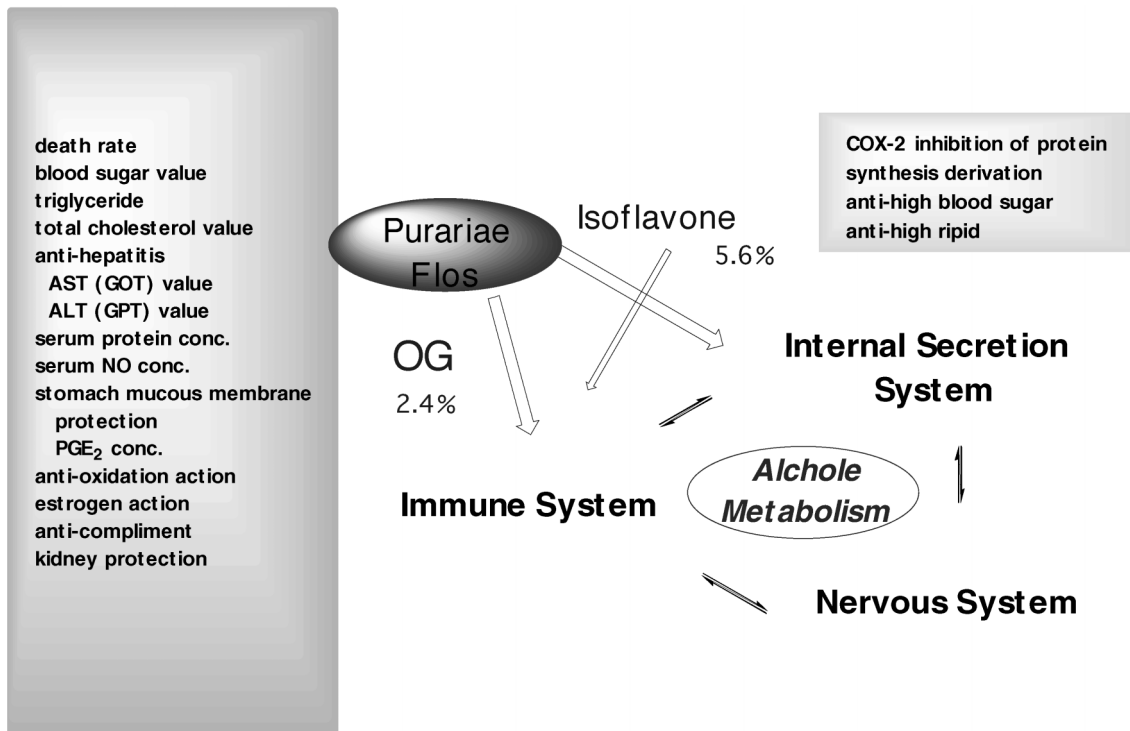


Fig. 12. Multifunctions of Puerariae Flos

分し、マウス四塩化炭素肝障害に対する作用を検討したところ、OG-I、OG-IIともにGOT、GPTの上昇を顕著に抑制した (Fig. 13).²⁸⁾特に極性の低い方の oleanene glucuronide 群 (OG-I) がより有効であった。本生薬は flavone 類は含有せず、oleanene glucuronide のみの構成である。新規 oleanene glucuronide 10 種を含む 23 種の oleanene glucuronide を分離した。^{29,30)}一方酸加水分解では新規 sapogenol 9 種を含む 15 種の sapogenol を得た。^{31,32)}

ところで、現在でも肝炎患者は 200 万人を数え、また 4 万人の方が亡くなっている重大な疾患である。そのほとんどはウイルス性肝炎であり、中でも B、C 型肝炎が問題になっているが、B 型についてはワクチンが開発されたため、新たな患者の発生はほとんどなくなりつつある。また C 型肝炎の治療薬としては、抗ウイルス剤であるインターフェロン (IFN) が開発され、1992 年より臨床の場で用いられている。しかし、IFN 療法は日本人に多い遺伝子型に有効ではなく、また種々の副作用もあり問題となっている。さらに、C 型肝炎において重篤な問題は、20—30 年かけて肝硬変から肝臓に高率で移行するということである。したがって、現在でも抗トランスアミナーゼ作用のある肝保護剤が、一定の成果を上げている。その主なものが glycyrrhizin 製剤や漢方処方・小柴胡湯である。両者とも主成分は oleanene-type glycoside であるが、残念なことに、これらにも偽アルドステロン症とか間質性肺炎など

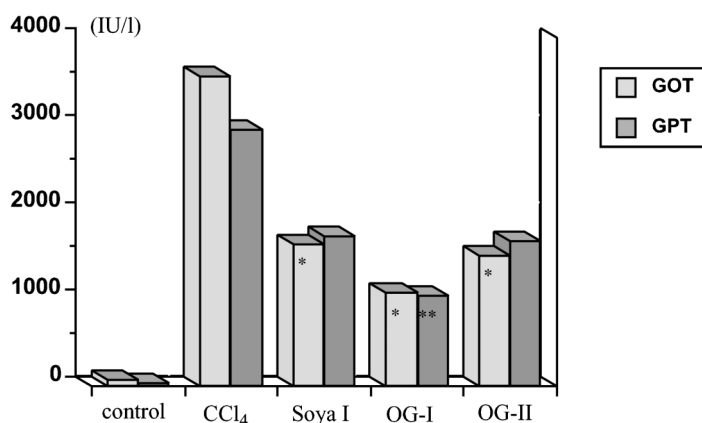
の副作用があり、有効かつ、より安全な薬剤が求められている。

7. マメ科より得られるサポニン

葛花・鶏骨草の研究よりいずれも oleanene glucuronide が肝障害改善作用を示すことが明らかとなったので、次に対象をマメ科全体拡大して成分研究を進めた。その結果、現在までに 40 種の生薬・植物より延べ 190 個を超える triterpene glycoside を分離した (Table 6).²⁸⁾そのうち、新規 sapogenol 21 種を含む 73 種の新規配糖体を明らかにした (Figs. 14, 15)。重要生薬葛根 *Puerariae Radix* からは、初めて oleanene glucuronide の存在を明らかにした。³³⁾12 種 (10 種は新規) の oleanene glucuronide を単離、これらを kudzusaponin と命名した。^{34,35)}また、kudzusapogenol A—C の 3 種の新規サポゲノールを得た。葛根の幅広い薬能の解析の一助となろう。³³⁾われわれの研究はマメ亜科、ネムノキ亜科、ジャケツイバラ亜科のうちのマメ亜科に集中しているが、その中に含まれる oleanene glucuronide の特徴は、28 位が methyl 基で糖部に glucuronic acid を有していることで、それは肝保護作用を示す。その中で最も強いモデルが sophoradiol diglycoside であった。

8. 構造と活性相関

マメ科より得られた oleanene glucuronide や、それらを部分加水分解して得られる prosapogenol をラット初代培養肝細胞を用いた免疫学的肝障害モデ



Effects of Soyasaponin I (Soya I), Crude saponin I (OG-I) and Crude saponin II (OG-II) on CCl₄ induced liver injury by oral administration; Dose was each 500 mg/kg; Each column represents mean of 10 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fig. 13. Effect of Abri Herba Extract on Mice Treated with CCl₄

Table 6. Library of Oleanene Glucuronides Isolated from Leguminous Plants

Plants	Parts	Total OGs	New aglycones	New OGs
Abri Herba	whole	23	10	11
Abri Semen	seed	1	1	0
<i>Aescynomene indica</i>	whole	1	0	0
<i>Amphicarpaea edgeworthii</i>	aerial	1	0	0
<i>Arachis hypogaea</i>	seed	1	0	0
Astragali Semen	seed	6	1	4
<i>Astragalus sinicus</i>	seed	6	0	1
<i>Baptisia australis</i>	root	2	0	1
<i>Campyrotropis hirtella</i>	root	2	0	0
<i>Canavalia gladiata</i>	root	4	0	2
<i>Cicer arietinum</i>	seed	1	0	0
<i>Crotalaria albida</i>	whole	6	0	2
<i>Dalbergia hupeana</i>	bark	3	2	2
Desmodii Herba	whole	2	0	0
<i>Glycine max</i>	root	4	0	0
<i>Glycine max</i> cv. Kuromame	seed	2	0	0
<i>Glycine soya</i>	aerial	4	0	0
<i>Melilotus officinalis</i>	root	4	0	1
<i>Melilotus officinalis</i> [Kumamoto]	aerial	4	0	1
<i>Melilotus officinalis</i> [Rotenburg]	aerial	4	0	0
<i>Medicago polymorpha</i>	aerial	1	0	0
<i>Mucuna sempervirens</i>	leaf	2	0	1
<i>Lathyrus palustris</i>	aerial	4	0	2
<i>Lens esculenta</i>	seed	1	0	0
<i>Lotus corniculatus</i>	aerial	2	0	0
<i>Lupinus polyphyllus hybrid</i>	root	7	0	5
<i>Lupinus polyphyllus hybrid</i>	seed	4	0	0
<i>Pachyrhizus erosus</i>	tuber	2	0	0
<i>P. coccineus</i> cv. Murasakihanamame	seed	1	0	0
<i>P. coccineus</i> cv. Murasakihanamame	aerial	2	0	0
<i>P. coccineus</i> cv. Ooshirobananamame	seed	3	0	0
<i>P. vulgaris</i> cv. Uzuramame	seed	2	0	0
<i>P. vulgaris</i> cv. Taishokintoki	seed	1	0	1
<i>P. vulgaris</i> cv. Toramame	aerial	2	0	0
<i>P. vulgaris</i> cv. Toramame	root	3	0	1
<i>P. vulgaris</i> cv. Torosuku	seed	3	0	0
<i>Pisum sativum</i>	seed	1	0	0
<i>Pueraria lobata</i>	flower	3	0	1
<i>Pueraria lobata</i>	root	12	3	10
<i>Pueraria thomsonii</i>	root	5	0	2
<i>Pueraria thomsonii</i>	flower	3	0	0
<i>Robinia pseudo-acacia</i>	bark	13	0	10
<i>Rudea aurea</i>	seed	1	0	0
<i>Sophora subprostrata</i>	root	11	4	7
<i>Sophora flavescens</i>	root	4	0	3
<i>Vicia faba</i>	seed	1	0	0
<i>Vigna angularis</i> cv. Dainagon	seed	2	0	0
<i>Vigna unguiculata</i> cv. Chuguro	seed	2	0	0
<i>Wisteria brachybotrys</i>	bark	9	0	5
Total	40	50	191	73

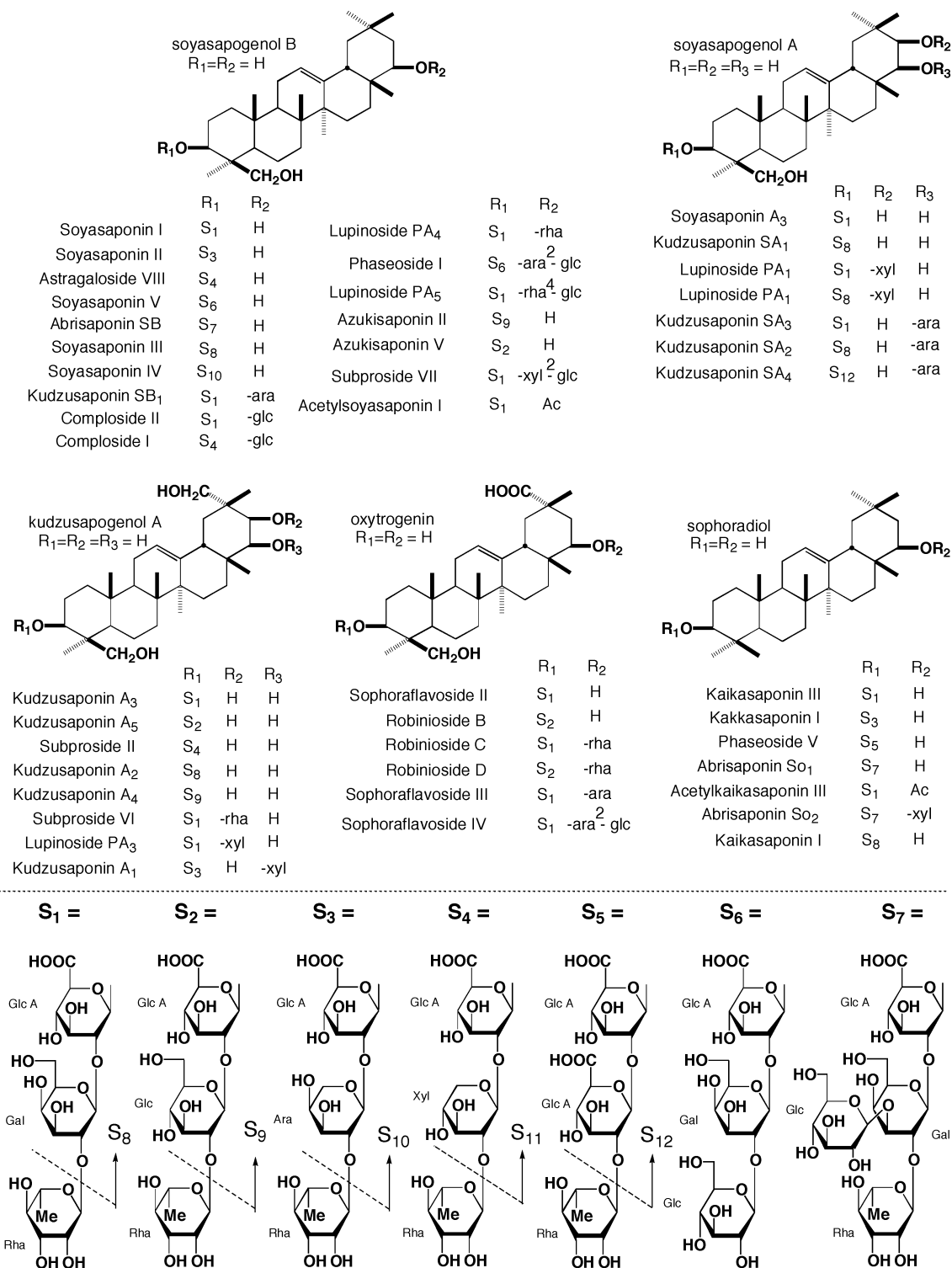


Fig. 14. Oleanene Glucuronides

ルにおいて試験して、以下の構造—活性相関が得られた。²⁸⁾

まず、糖部に関する知見をまとめると、3糖よりも2糖の方がはるかに強い作用を有し、末端 Rha はかならずしも必要ではないこと、及び mono-

glucuronide でも十分強い活性を示すこと、さらには aglycone の 3 位と Glc A との結合が重要であることなどが判明した。一方、5"位酸素官能基が活性を増強させることも明らかになった (Fig. 16)。

アグリコン部に関する知見では、21 位に β -水酸

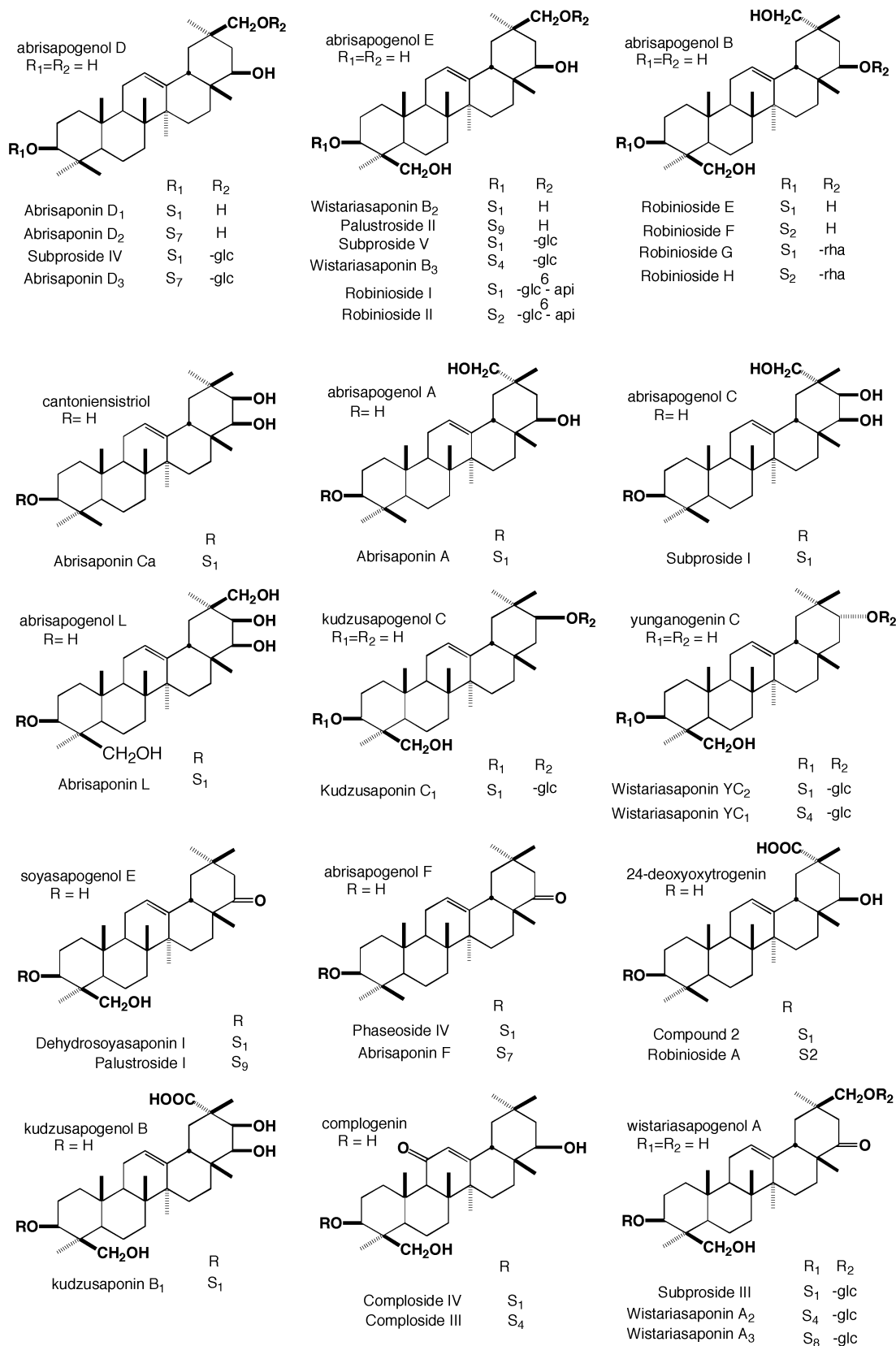


Fig. 15. Oleanene Glucuronides (Continued)

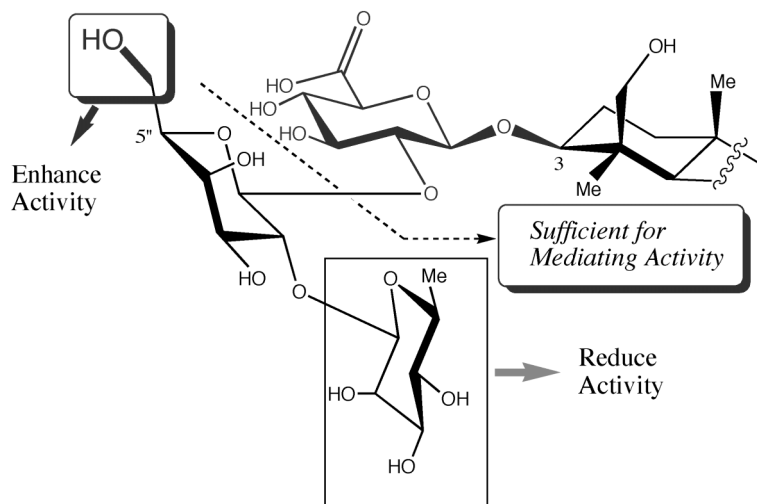


Fig. 16. Structure–Hepatoprotective Relationships of Sugar Moiety

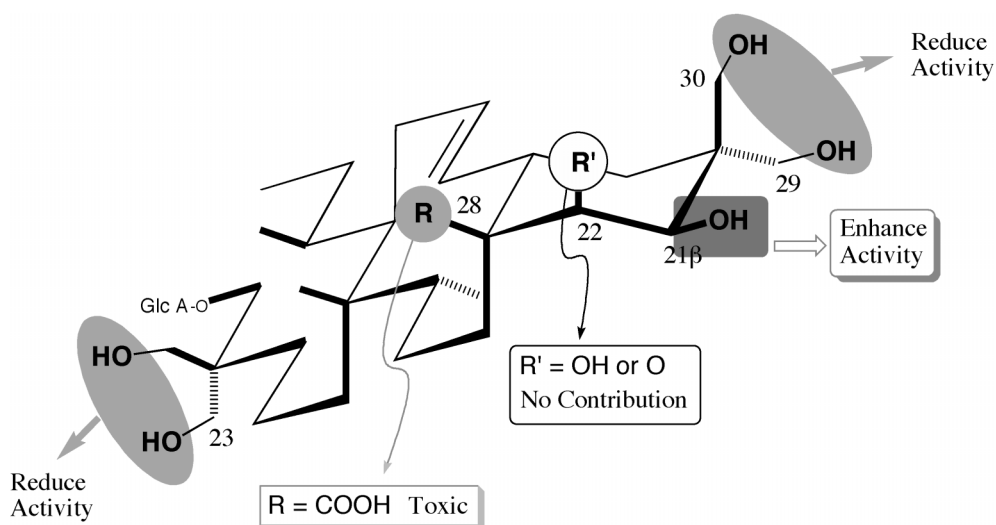


Fig. 17. Structure–Hepatoprotective Relationships

基は肝保護作用を強めるが、 α -水酸基ではその作用は弱い。また、29、30位、及び23、24位に水酸基が結合すると活性が弱くなる。22位はカルボニル基でも肝保護作用にあまり影響ない。一方、28位に遊離カルボン酸が存在すると肝細胞に対する毒性を発現することが判明した (Fig. 17)。

これらの活性と oleanene glucuronide の構造との関係を Fig. 18 に示す。本薬理モデルは補体系による肝障害と考えられるが、oleanene glucuronide は肝細胞膜に結合し、補体系による傷害から肝細胞を保護していると推定され、その際、細胞膜上の疎水性部分や親水性部分を認識しているものと考えられる (Fig. 18)。また、28位にカルボキシル基が存在

すると、逆に細胞膜に傷害を与え、毒性を示すものと考えられる。マメ科 oleanene glucuronide は生体内で種々の生理機能を司る細胞膜の機能解明のバイオロジカルツールとして有用と考えられる。

9. Transglycosylation

マメ亜科以外の例としては、ネムノキ亜科の合歓皮から cytotoxicity を示す glycoside, Julibroside I を単離した (Fig. 19).³⁶⁾ これをアルカリで処理し、28位の糖部を切ると、活性は消失した。そこで28位の糖部は何らかの役割を示すものと判断し、それを他の sapogenol に結合することにした。Julibroside I の28位の糖部をアルカリで切り出し、これをセラミド類縁体に結合させると、cytotoxicity が

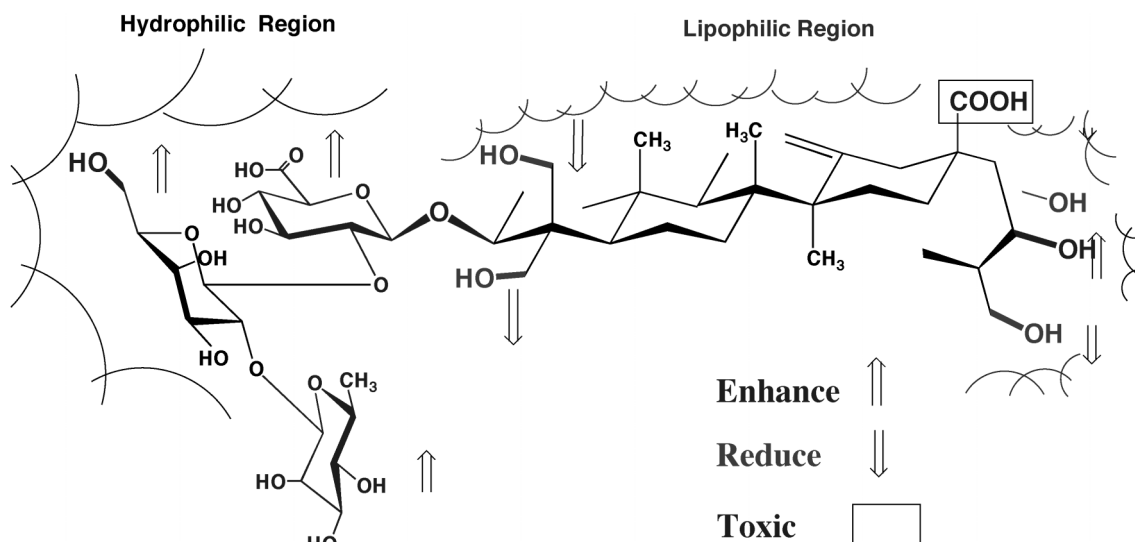


Fig. 18. Structure–Hepatoprotective Relationships of Oleanene Glucuronides

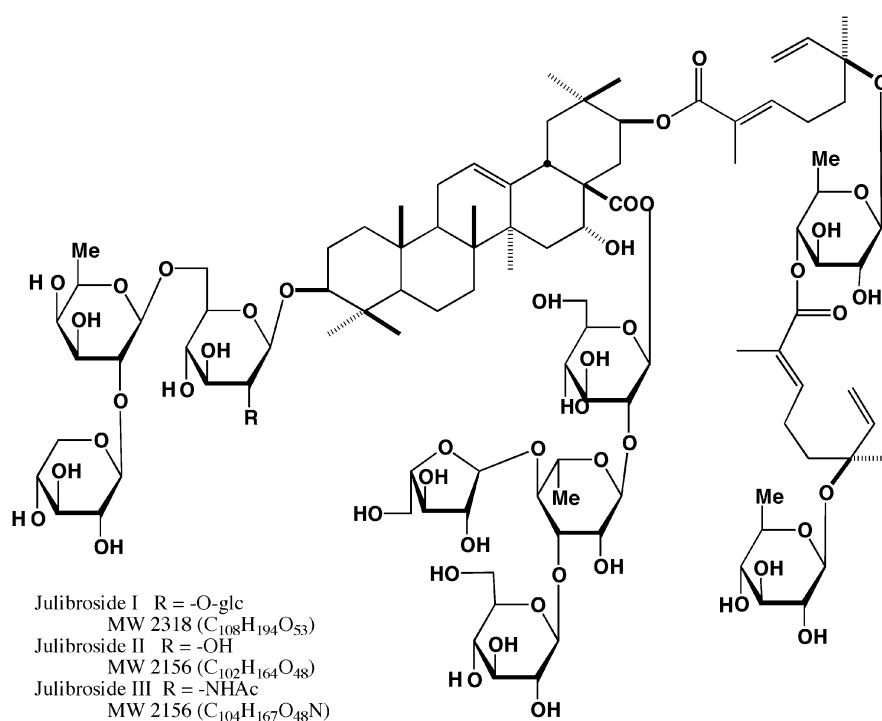


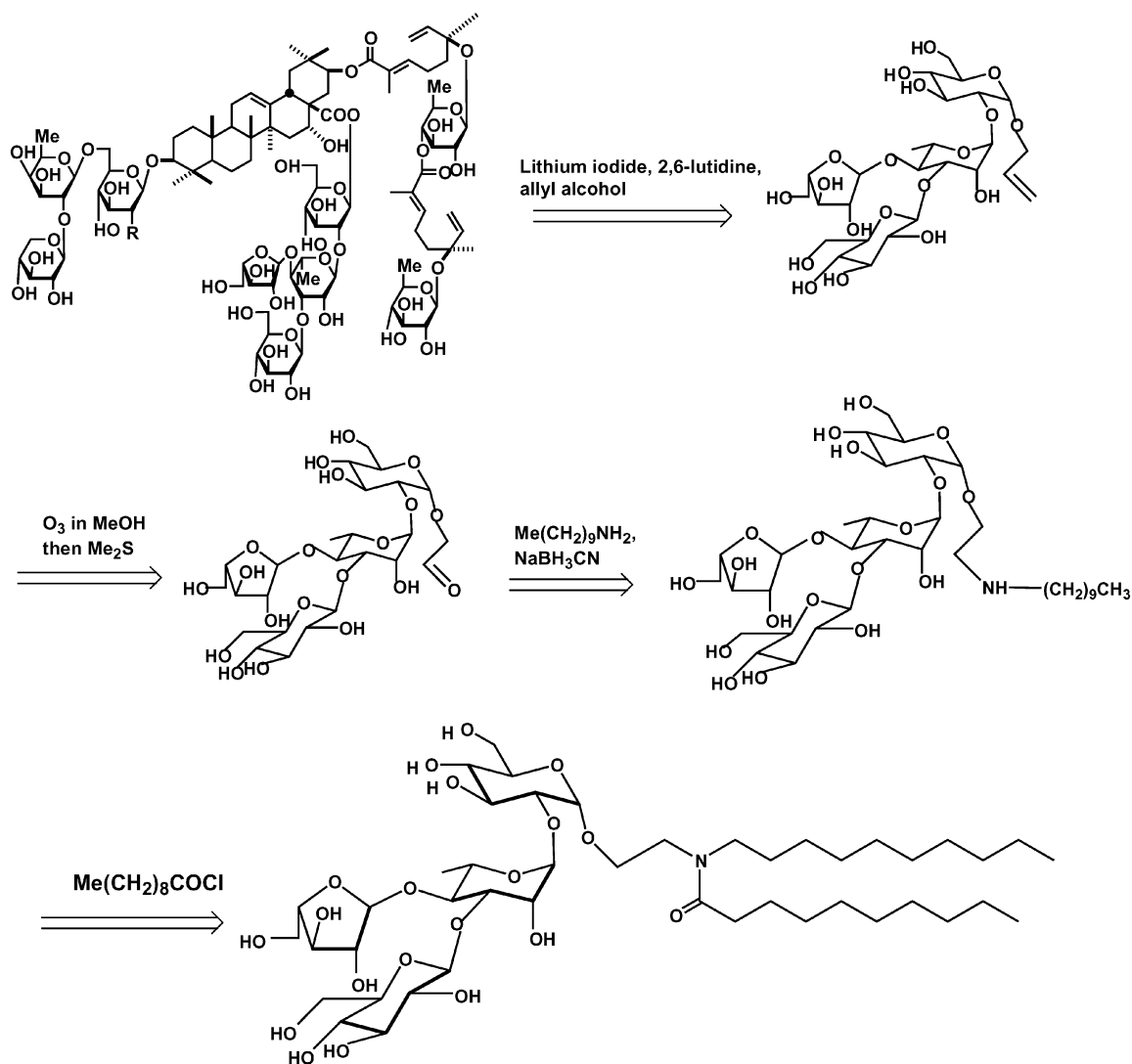
Fig. 19. Julibrosides Isolated from *Albizzia Julibrissin*

発現した (Scheme 3).³⁷⁾ また一方, この糖部を steroidal sapogenol に結合させると, やはり cytotoxicity が発現した.^{38,39)} 次に肝保護作用を持つ oleanene glucuronide の 3 位の糖部を glycyrrhizinic hydrolase で切り, これを steroidal sapogenol に結合させると, cytotoxicity ではなく肝保護作用を示す (Scheme 4). したがって糖部は cytotoxicity 並

びに肝保護作用発現に必要であることが伺われた. われわれはこの方法を transglycosylation と呼んでいる.

10. おわりに

ナス科, 及びマメ科起源民間薬の有効性の科学的証明を目的に始められた本研究も一応の活性相関及び最適モデルの提出に漕ぎ着けた. すなわち *Sola-*

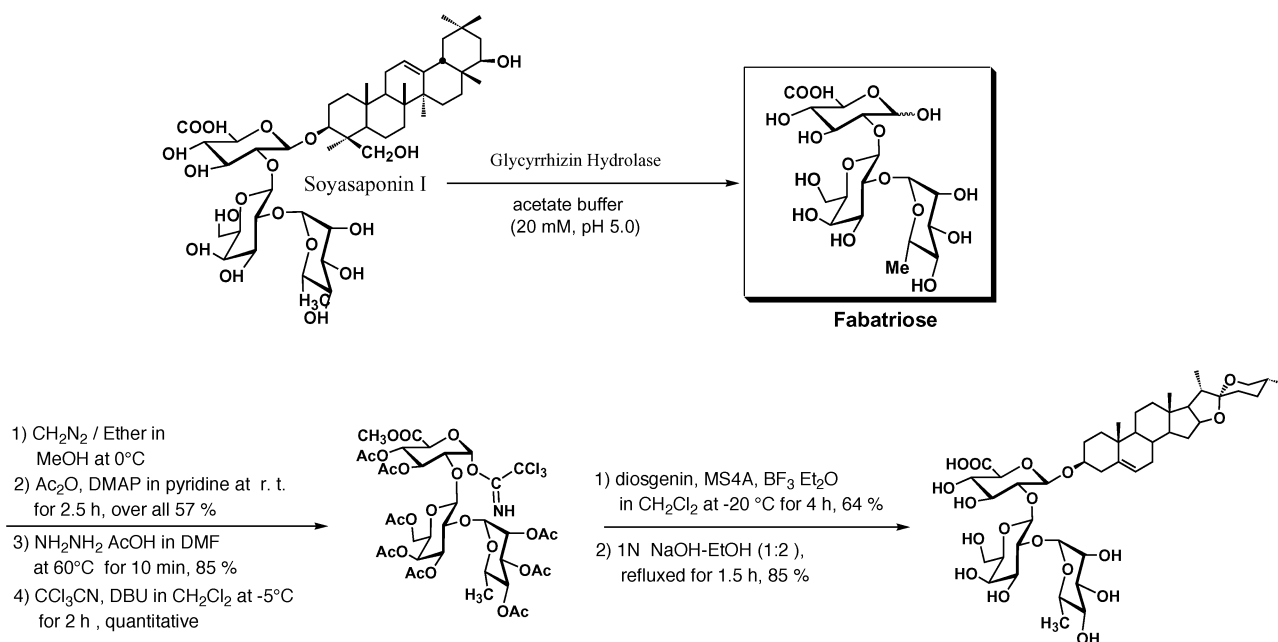


Scheme 3. Transglycosylation (1)

num に含まれる steroidal glycoside (最適モデル: β -lycotetraosyl tigogenein) は抗腫瘍, 抗ヘルペス活性を有し, 一方 1 マメ科に含まれる oleanene glucuronide (最適モデル: β -D-galactopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl sophoradiol) は抗肝障害作用を示すことが判明, 民間薬として適用されるゆえんを明らかにした. メカニズムについては今後更なる検討を要するが, 抗ヘルペス活性は steroidal glycoside の細胞膜溶解性, また肝保護作用は oleanene glucuronide が細胞膜と相互作用を持ち保護作用をしているものと考えられる. また, 一連の solanaceous glycoside を研究していく過程で, 2. で述べたように pregnane glycoside が得られてくるが, これは植物生体中で Marker 分解のような分解反応若しくは生合成が生起していることを示唆す

るもので, 同様の反応はヒトの身体中の代謝でも十分に考えられる. となると steroidal glycoside は steroidal hormone のプロドラッグと成り得るかも知れない. いま代謝を含めての実験を行っている.

謝辞 本研究は多くの共同研究者, 村上光太郎, 中野公子, 矢原正治, 金城順英, 梶本哲也, 橋本文雄, 小野政輝, 吉満 齊, 池田 剛, 大川雅史の各先生, 並びに博士, 修士, 卒業生の学生諸氏, さらに第一製薬(株) (江島明男, 北川正之の各氏), (株)太田胃散 (新甫勇次郎, 中島嘉次郎, 細野 剛, 山崎 律の各氏), 農研機構・野菜茶研(松井正春, 吉田建実の各氏) の諸氏によってなされたものであり, 衷心より謝意を表します.



Scheme 4. Transglycosylation (2)

REFERENCES

- Ripperger H., Schreiber K., "The Alkaloids," eds. by Manske R. H. F., Rodrigs R. G. A., Academic Press, New York, 1982.
- Kupchan S. M., Barboutis S. J., Knox J. R., Cam C. A. L., *Science*, **150**, 1827–1831 (1965).
- Based on a lecture presented at the 123th Annual Meeting on the Pharmaceutical Society of Japan, Nagasaki, 28 March 2003.
- Zhu X.-H., Tsumagari H., Honbu T., Ikeda T., Ono M., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 8043–8046 (2001).
- Nohara T., Yabuta H., Suenobu M., Hida R., Miyahara K., Kawasaki T., *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1240–1247 (1973).
- Gonzalez A. G., Francisco C. G., Barreira R. F., Lopez E. S., *Ann. Quim.*, **67**, 433–438 (1971).
- Tagawa C., Okawa M., Ikeda T., Yoshida T., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **44**, 4839–4841 (2003).
- Ohmura E., Nakamura T., Tian R.-H., Yahara S., Yoshimitsu H., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8443–8444 (1995).
- Zhu X.-H., Takagi M., Ikeda T., Midzuki K., Nohara T., *Phytochemistry*, **56**, 741–745 (2001).
- Chi S.-C., Shan C.-Y., "Chugoku Gendai Yakusou Jiten," *Kogyochousakai*, 1980, pp. 79–87.
- Murakami K., Ezima H., Takaishi Y., Takeda Y., Fujita T., Sato A., Nagayama Y., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 67–73 (1985).
- Nakamura T., Komori C., Lee Y.-Y., Hashimoto F., Yahara S., Nohara T., Ejima A., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 564–566 (1996).
- Ikeda T., Ando J., Miyazono A., Zhu X.-Z., Tsumagari H., Nohara T., Yokomizo K., Uyeda M., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 363–364 (2000).
- Yoshida K., Shingu K., Yahara S., Nohara T., Marubayashi N., Ueda I., Miyahara K., Kawasaki T., *Tetrahedron Lett.*, **28**, 673–674 (1988).
- Yahara S., Izumitani Y., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1943–1946 (1988).
- Fujiwara Y., Yahara S., Ikeda T., Ono M., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 234–235 (2003).
- Kinjo J., Aoki K., Okawa M., Hirakawa T., Nohara T., Nakajima Y., Hosono T., Someya M., Niiho Y., Kurashige T., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 708–710 (1999).
- Kinjo J., Takeshita T., Abe Y., Terada N.,

- Yamashita H., Yamasaki M., Takeuchi K., Murakami K., Tomimatsu T., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1174–1179 (1988).
- 19) Niiho Y., Yamasaki R., Nakashima K., Ito H., Takeshita T., Kinjo J., Nohara T., *Yakugaku Zasshi*, **109**, 424–431 (1989).
- 20) Niiho Y., Yamasaki R., Nakashima K., Ito H., Takeshita T., Kinjo J., Nohara T., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 604–611 (1990).
- 21) Yamasaki T., Nakajima Y., Niiho Y., Hosono T., Kurashige T., Kinjo J., Nohara T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 831–833 (1997).
- 22) Miyao H., Arao T., Udayama M., Kinjo J., Nohara T., *Planta Medica*, **64**, 5–7 (1998).
- 23) Kinjo J., Udayama M., Okawa M., Nohara T., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 203–206 (1999).
- 24) Okawa M., Kinjo J., Yang C. R., Nonaka G., Nohara T., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1202–1205 (2001).
- 25) Morita K., Hirose T., Kinjo J., Hirakawa T., Okawa M., Nohara T., Ogawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 351–356 (2001).
- 26) Oh S.-R., Kinjo J., Shii Y., Ikeda T., Nohara T., Ahn K. S., Kim J. H., Lee H.-K., *Planta Medica*, **66**, 507–510 (2000).
- 27) Hirayama H., Wang Z., Nishi K., Ishimatsu T., Ueda S., Kubo T., Nohara T., *British Journal of Urology*, **71**, 143–147 (1993).
- 28) Kinjo J., Nohara T., “Studies in Natural Products Chemistry,” Vol. 25, ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier, London, 2001, pp. 89–124.
- 29) Miyao H., Sakai Y., Takeshita T., Kinjo J., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1222–1227 (1996).
- 30) Miyao H., Sakai Y., Takeshita T., Ito Y., Kinjo J., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1228–1231 (1996).
- 31) Takeshita T., Hamada S., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 846–848 (1989).
- 32) Sakai Y., Takeshita T., Kinjo J., Ito Y., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 824–826 (1990).
- 33) Kinjo J., Miyamoto I., Murakami K., Kida K., Tomimatsu T., Yamasaki M., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1293–1296 (1985).
- 34) Arao T., Kinjo J., Nohara T., Isobe R., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1176–1179 (1995).
- 35) Arao T., Kinjo J., Nohara T., Isobe R., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 362–366 (1997).
- 36) Ikeda T., Fujiwara S., Kinjo J., Nohara T., Ida Y., Shoji J., Shingu T., Isobe R., Kajimoto T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 3483–3490 (1995).
- 37) Ikeda T., Kajimoto T., Nohara T., Kinjo J., Wong C., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1509–1510 (1995).
- 38) Ikeda T., Kajimoto T., Kinjo J., Nakayama K., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 3513–3516 (1998).
- 39) Ikeda T., Miyashita H., Kajimoto T., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 2353–2356 (2001).