

カンキツ類の化学成分とがん予防物質に関する研究

十一元晴

Chemical Study of *Citrus* Plants in the Search for Cancer Chemopreventive Agents

Motoharu JU-ICHI

*School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University,
9-11-68, Koshien, Nishinomiya 663-8179, Japan*

(Received November 30, 2004)

The constituents of *Citrus* plants were investigated to develop useful agents that are effective in cancer chemoprevention. We examined the roots and bark of the roots of various *Citrus* plants, resulting in the isolation of many novel compounds. Their structures were determined using spectroscopic methods, especially 2D-NMR spectra. The following new compounds of constituents were found: dimeric coumarins, dimeric acridone alkaloids, and acridone-coumarin dimers. Auraptene and nobiletin are known as useful constituents of the peel of *Citrus* plants for cancer chemoprevention. However, we found that 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HPT) has both antitumor promotion and initiation activities and is more effective than auraptene and nobiletin. We synthesized pentaallyl quercetin (QPA), a useful antitumor compound that has the additional effects of a P-glycoprotein (P-gp) inhibitor. The inhibitory effects of QPA on P-gp were more effective than those of the typical P-gp inhibitors cyclosporin A and verapamil. Both HPT and QPA have antitumor promotion activity and are potential candidates for effective multidrug resistance agents in cancer chemotherapy.

Key words—*Citrus* constituents; cancer chemoprevention; dimeric coumarin; dimeric acridone alkaloid; acridone-coumarin; flavone

1. はじめに

カンキツ類に由来する生薬として「陳皮」, 「青皮」, 「枳実」, 「枳殼」, 「橙皮」, 「仏手柑」などがあり, 中国では「橘紅」, 「香円」, 「橘核」, 「橘絡」などもある。西洋医学では, 一般に健胃薬に分類されるが, 中医学及び漢方医学では臨床上それぞれを区別して駆風, 去痰, 鎮咳, 排膿などにも用いられている。

果実の含有成分として, 精油成分やフラボノイド配糖体及び塩基性成分が知られていたが, 近年, ポリメトキシフラボン類やクマリン類が多数報告され, 抗潰瘍, c-AMP Phosphodiesterase 阻害, 抗アレルギー, 抗炎症, 鎮痛などの生物作用を有するものが発見されている。しかし, 生薬として用いられ

る品種は, ごく一部に限られている。

筆者らがカンキツ類成分の研究を開始した頃は, 輸入の自由化や嗜好の変化からカンキツの価格が暴落し, 多量・多種の栽培品種が放置されたり, 焼却処分されるものが急増し, これらを何とか活用したいと考えたのが発端である。また, アクリドンアルカロイドの1つである acronycine が抗がん剤として臨床試験に付されていた。その頃, カンキツ類の根, 根皮部にもアクリドンアルカロイドが含有されていることが分かり, 制がん効果を持つ化合物が見出されることが期待された。さらに, 果実部の成分に関しては多数の報告があったが, 根皮, 根部に関する報告は, ほとんど皆無に近かった。その原因として, カンキツ類の栽培品種は接木によるものがほとんどであり, 特に根・根皮部を研究材料とすることは種の同定に大いに問題があり, 難しい状況であったことが挙げられる。幸いなことに, 日本におけるカンキツ類の遺伝子資源の保存のために純系種を栽培している農林水産省果樹試験場(現独立行政法

武庫川女子大学薬学部 (〒663-8179 西宮市甲子園九番町 11-68)

e-mail: mjuichi@mwu.mukogawa-u.ac.jp

本総説は, 平成 15 年度宮田記念学術論文賞の受賞を記念して記述したものである。

人農業技術研究機構果樹研究所カンキツ研究部) 興津支場では数年周期で古い木を処分しており, それらを提供頂けることになった. そこで, 制がん物質を求めて, カンキツ類の根皮・根部及び果実部の成分検索を実施することにした.

ところで, 化学発がんには, 少なくとも2つの過程, すなわちイニシエーションとプロモーションという機構が関与し, それぞれの過程にイニシエーターとプロモーターと呼ばれる化学物質が関与していることが明らかになっている. これらの過程を阻止できる化合物が見出せば「がん予防」の有力な武器になり得る. 伊藤らによって確立されたTPAに対するEpstein-Barr virus活性化抑制効果を指標にしたスクリーニング法^{1,2)}は, 微量かつ多種類の試料を短期間に検定することが可能である. 本法を用いた活性試験について京都府立医科大学生化学教室の御協力を頂けることになり, 生物活性の検定にも目途がついた.

活性物質を探索する過程において, 多数の新規クマリン, アクリドンアルカロイド, フラボノイド類を単離し, それらの構造を明らかにした. 特に, 全く新しい型の多数の二量体化合物の構造を決定し, ヘテロ環化学の新しい分野を開拓することができた. また, 発がん予防物質として有望な3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavoneを見出すとともに, 本化合物をリード化合物として入手が容易なquercetinから誘導した3,5,7,3',4'-pentaallylflavoneが発がん予防に有効であるとともに薬物排出に関わるP-糖たんぱく質阻害作用を有することを見出した. 以下にそれらの研究成果について述べる.

2. カンキツ類根皮・根皮部に含まれる新規化合物

研究材料として次のカンキツ類を用いた. ハッサク (*Citrus hassaku* Hort. ex. TANAKA), グレープフルーツ (*C. paradisi* MACF.), マーシュグレープフルーツ (*C. paradisi* MACF.), ユコウ (*C. yuko* Hort. ex. TANAKA), エトログシトロン (*C. medica* L. var. *ethrog* ENGL), ナツダイダイ (*C. natsudaidai* HAYATA), 川野ナツダイダイ (*C. natsudaidai* HAYATA), ヤラハ [*C. paradisi* MACF. (Duncan grapefruit) x *C. tangerina* Hort. ex. TANAKA (Dancy tangerine)], サンボウカン (*C. sulcata* Hort. ex. TAKAHASHI), キクダイダイ (*C. cana-*

riculata Hort. ex. TANAKA), バレンシアオレンジ (*C. sinensis* OSBECK), 文旦 (*C. grandis* OSBECK f. *buntan* HAYATA), 平戸文旦 (*C. grandis* OSBECK f. *HIRADO*), 舟床 (*C. funadoko* Hort. ex. TANAKA), ヤラハ [*Citrus paradisi* MACF. (ダンカングレープフルーツ) x *C. tangerina* Hort. ex. TANAKA (Dancy tangerine)], 黄金柑 (*C. flaviculpus* Hort. ex. TANAKA), プメロ (Pummelo) [*C. grandis* OSBECK cv. *May Pummelo* x *C. paradisi* MACF. (マーシュグレープフルーツ)], ルミー (*C. lumia* RISSO), キノクニ (*C. kinokuni* Hort. ex. TANAKA) 及びユズ (*C. junos* TANAKA). また交雑育成種である [*C. paradisi* MACF. (duncan) x *C. sinensis* OSBECK (ハムリン)], [Okitsu No. 17 x *C. tamurana* TANAKA (日向夏)], [Okitsu No17: unnamed selection *C. tamurana* TANAKA. (日向夏) x *C. sinensis* L. OSBECK cv. FUKUHARA (スウィートオレンジ)], [*C. tamurana* Hort. ex. TANAKA (日向夏) x *C. kinokuni* Hort. ex. TANAKA (ヒラキツ)], [ハッサク (*C. hassaku* Hort. ex. TANAKA) x *C. grandis* (平戸文旦)], [*C. flaviculpus* Hort. ex. TANAKA (黄金柑) x *C. tamurana* Hort. ex. TANAKA (日向夏)], [Swingle Citrumelo (*Poncirus trifoliata* x *C. paradisi*)], [*C. unshiu* MARC. (宮川早生) x *C. sinensis* OSBECK (toropita orange)] (清見) x *C. iyo* Hort. ex. TANAKA (伊予)], 及び [*C. paradisi* MACF. (ダンカングレープフルーツ) x *C. sinensis* OSBECK (ハムリン)] についても含有成分を検索した.

抽出にはアセトンを用い, 得られたエキスを酸性部, 塩基性部に分液処理することなく, セライトに吸着させ, そのままシリカゲルカラムクロマトに付した. さらにカラム, 遠心クロマトを繰り返し行い, 最終的には分取薄層クロマトにより分離した. 主として得られた化合物は多数の新規化合物を含むクマリン及びアクリドンアルカロイドであった. 分液操作を行った過去の研究では, アクリドンアルカロイドが単離されなかったのは, このタイプの化合物の弱塩基一塩基性なしという特異な性質によるものと思われる.

本論文では多数の二量体クマリン, 二量体アクリドンアルカロイド, アクリドンアルカロイド-クマリン及び特異な構造のアクリドンアルカロイドに限

定して紹介する。

これらの構造決定は、主として二次元 NMR スペクトル特に HMQC や HMBC を使用した。一部の新規骨格や珍しい結合形態を有する化合物の構造決定は X 線結晶解析も合わせ行った。

2-1. クマリン二量体 多数の新規二量体クマリンを単離したが、それらは2つのクマリン環の連結様式すなわち炭素-炭素結合、エーテル結合、フラン環やピラン環を形成して連結された型及び Diels-Alder 付加した型の4種に分類できる。

2-1-1. 炭素-炭素結合による二量体

2-1-1-1. ピラン環-ピラン環——Bisclausarin (1), Yukomarin (2) Bisclausarin (1) の PMR は、クマリン環4位の水素のシグナル1個、オレフィン水素1個、2個の1,1-ジメチルアリル基及び1個の2,2-ジメチルピラン環の存在を示した。また、MS から判明した分子式に反して PMR, CMR で単量体に相当するシグナルのみ観測されたことから、完全に対称な構造が推定された。また、O-メチル体のメトキシ基からオレフィン水素に NOE が観測されたことからリニア型のクマリン骨格の存在が判明し、clausarin (3) がピラン環部分で対称型に二量化した構造と推定し、HMBC による炭素-水素の相関により構造を確定した。³⁾ また、yukomarin (2) は種々のデータから二量体クマリンと推定され、その PMR はクマリン骨格の3,4-位及び4位の水素、3個の1,1-ジメチルアリル基、2個の2,2-ジメチルピラン環の存在を示し、HMBC によりピラノクマリン環の間で連結していることが判明した。ピラン環の型式及び構造の確定は O-メチル体の2つのメトキシ基を照射すると、双方ともに4位の水素とピラン環のベンジル位水素に NOE が観測された。したがって2つのピラン環はリニア型であること、すなわち yukomarin は clausarin (3) と nordentatin (4) で構成されていることが証明できた。⁴⁾

2-1-1-2. ジヒドロピラン環-ジヒドロピラン環——Bishassanidin (5) Bishassanidin (5) は、PMR スペクトルにより水素結合した水酸基1個、4位の水素、1,1-ジメチルアリル基2個、2,2-ジメチルピラン環の存在が示唆された。分子量からクマリン単量体が完全に対称に二量化した構造が推定された。既知の hassanidin (6) のデータと比較検討し2,2-ジメチルピラン環部分で二量化した構造と

決定した。⁵⁾

2-1-1-3. ジヒドロピラン環-ラクトン環——Bisnorponcitrin (7) Bisnorponcitrin (7) の PMR スペクトルにおいて、クマリン環の3,4-位及び4位の水素、2,2-ジメチルピラン環オレフィン水素1組、1,1-ジメチルアリル基が2個、隣接したメチン-メチレン水素の存在が判明した。また、分子量から二量体と推定されたが、ピラン環部分の型式、2つのクマリン核の結合位置はメチル体で検討した。O-メチル体のメトキシ基を照射すると、一方からは4位及びオレフィン水素に、他方からは4位とメチン水素に NOE が観測された。したがって2つのクマリンはリニア型のピラノクマリンである norponcitrin (nordentatin) (4) が二量化した化合物であり、その結合位置は3位とジヒドロジメチルピラン環のベンジル位と判明した。⁵⁾

2-1-1-4. ジヒドロピラン環-芳香環——Nordenletin (8) Nordenletin (8) の PMR スペクトルにおいて、クマリン環3,4-位の水素に基づくシグナルが2組観測されたことから、非対称の二量体と推定された。また、1,1-ジメチルアリル基、2,2-ジメチルピラン環、2,2-ジメチルジヒドロピラン環の存在も明らかとなった。O-メチル体の2つのメトキシ基を照射すると、一方からは4位の水素とオレフィン水素に、他方からは4位の水素とベンジル位のメチンに NOE が観測されたことから、リニア型ピラノクマリン xanthoxyletin (9) の demethyl 体の8位と nordentatin (4) のジヒドロ体のジヒドロピラン環のベンジル位で二量化した構造が判明した (Chart 1)。⁶⁾

2-1-1-5. ピラン環メチルの間——Biseselin (10) Biseselin (10) の構造は、PMR スペクトルからクマリン骨格に特徴的な3,4,5,6-位及び2,2-置換ピラン環オレフィン水素2個の存在が判明した。残りのメチル基1個とメチレン基1個のシグナルについては、分子式と合わせ考察し2つの seselin (11) がメチレン-メチレンで連結した珍しい構造であることが判明した。⁴⁾

2-1-2. エーテル結合による二量体

2-1-2-1. Khellactone とピラノクマリン——Khelmarin-A (12), -B (13), -C (14), -D (15) cis-Khellactone (16) のベンジル位の水酸基がリニア型ピラノクマリンである nordentatin (4), xanthoxyle-

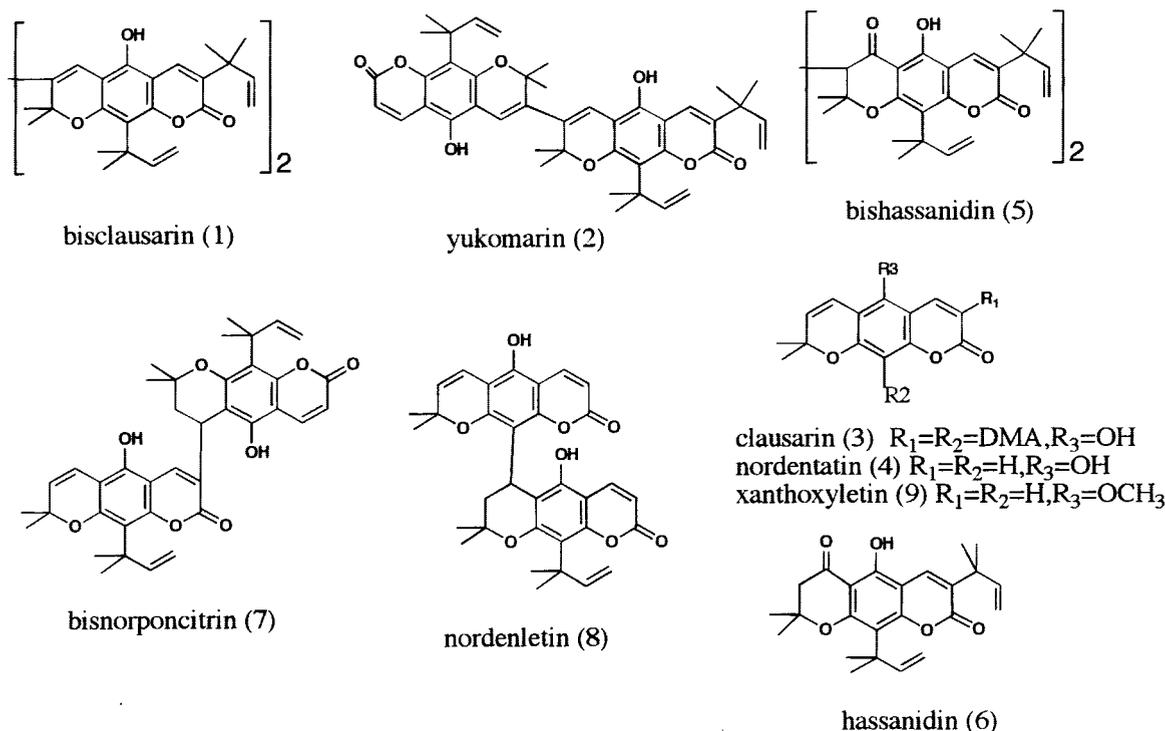


Chart 1

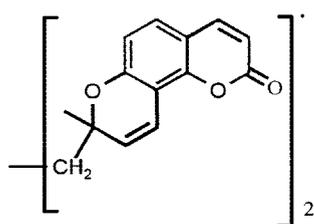
tin (9), clausarin (3) あるいはアンギュラー型ピラノクマリン seselin (11) とエーテル結合した二量体である。Khellactone 部の立体化学は酸素の付け根の水素間の NOE 及びそれらの結合定数から決定できた。また、2つの環の結合位置もベンジル位の水素と他方のピラノクマリンの水素の間に観測される NOE から決定した。^{5,7,8)}

2-1-2-2. ピラノクマリン芳香環——Marshdimerin (17) リニア型クマリンが芳香環の間でエーテル結合した唯一の例である。PMR において4位の水素と推定できるシグナル2個がシングレットとして観測されることから、3位に置換基の存在するクマリンの二量体と推定された。また、4個の1,1-ジメチルアリル基、2個の2,2-ジメチルピラン環の存在も判明した。HMBC による炭素-水素の相関からピラン環はともにリニア型であり、2つのクマリン環の3位に1,1-ジメチルアリル基の存在することが明らかとなった。さらに CMR において4個の1,1-ジメチルアリル基の sp^3 炭素のシグナルのうち1個だけが著しく低磁場に出現していることから、1個は O-置換体、残りの3個は C-置換体と考えられた。2つのクマリン核の結合位置は、4位の水素を照射したときに、NOE が観測されるアリル水素

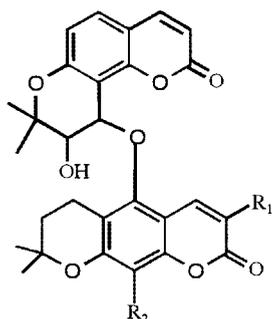
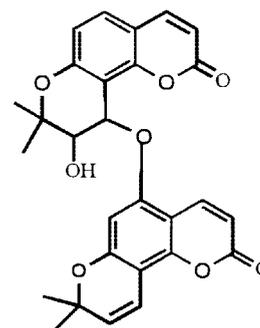
が2個と1個であり、したがって2つのクマリン核の結合位置は2つの clausarin (3) の5位とその O-1,1-ジメチルアリルエーテル体の8位との間でエーテル酸素で連結していることが決定した (Chart 2)。⁹⁾

2-1-3. 環形成による二量体

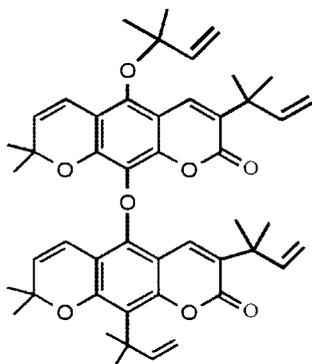
2-1-3-1. シクロブタン環——Bisosthenon (18), Bisosthenon-B (19) Bisosthenon (18) の PMR, CMR データは、分子量から予測される数の半分を示すことから完全に対称な構造が推定された。また、メチン水素間に NOE が観測されたことから osthenon (20) が head-to-head 又は head-to-tail 型にシクロブタン環を形成して二量化した構造が推定された。シクロブタン環上の置換基位置、立体配置の決定には種々の方法が提案されているが、いずれも決定的な手段ではない。幸い良好な結晶が得られたので X 線結晶解析を行った。⁹⁻¹¹⁾ 推定した構造とは異なり、嵩高いクマリン環部分がシスに配置する構造であることが分かり、全く新しい型の化合物の構造決定には、絶対的な証明の必要性を痛感させられた。Bisosthenon-B (19) は各種スペクトルデータから osthenon (20) の対称な二量体と判明した。構造が確定している bisosthenon (18) の PMR デー



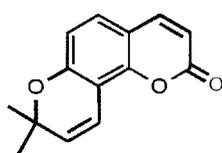
biseselin (10)

khelmarin-A (12) $R_1=H, R_2=DMA$ khelmarin-B (13) $R_1=R_2=H$ khelmarin-C (14) $R_1=R_2=DMA$ 

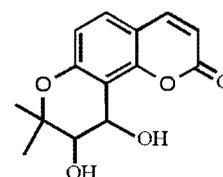
khelmarin-D (15)



marshdimerin (17)



seselin (11)



khellactone (16)

Chart 2

タとの比較から両者では1つのメチン水素のケミカルシフトが異なるだけであり、NOEの測定により、シクロブタン環上の4つの水素が *trans, cis, trans* と判明し構造を決定した。⁹⁾

2-1-3-2. ジヒドロフラン環——Furobinordentatin (21), Furobiclausarin (22) Furobinordentatin (21) は MS, PMR, CMR データから 1,1-ジメチルアリル基とジメチルピラン環を有する2つのクマリンの二量体と推定された。O,O'-ジメチル化体の NOE 測定により2つのピラノクマリンはリニヤ型で、そのピラン間部分で二量化した構造が推定された。また、4つのメチン水素間に相互に NOE が観測されたこと、HMBCにより炭素-水素間の相関を詳細に検討した結果、ピラノクマリンである nordentatin (4) が *cis, trans, trans* の立体配置のテトラヒドロフラン環を介して二量化した構造が判明した。本化合物は未知の新しい骨格を有しており、最終的には X 線結晶解析を行い、その構造を確定した。¹²⁾

また、furobiclausarin (22) に関しては PMR, CMR データを furobinordentatin (21) のそれらと

比較した結果、両化合物は類似した構造であることが判明した。顕著な相違点はクマリン環に特徴的な水素のうち3位のシグナルが認められないこと、1,1-ジメチルアリル基のシグナルが2個分見られることである。したがって、それぞれのクマリン環3位に1,1-ジメチルアリル基を持つ構造を推測した。HMBC スペクトル、NOE を詳細に検討した結果、テトラヒドロフラン環部分の構造は単量体である clausarin (3) が furobinordentatin (21) の場合と同様に *cis, trans, trans* の立体配置のテトラヒドロフラン環を介して二量化した構造と決定した (Chart 3)。^{12,13)}

2-1-3-3. ピラノピラン環——Claudimerin-A (23), Claudimerin-B (24) Claudimerin-A (23) は PMR スペクトルにおいて、クマリン環の4位の水素がシングレットに現われ、2個の1,1-ジメチルアリル基の存在が判明した。残りの2つのメチン水素とメチル基の間に観測された NOE 及び J 値から 2,2-ジメチルジヒドロピラノクマリン環の存在が推定できた。PMR においてクマリン単量体に相当するシグナルしか観測されなかったこと、EI-MS に

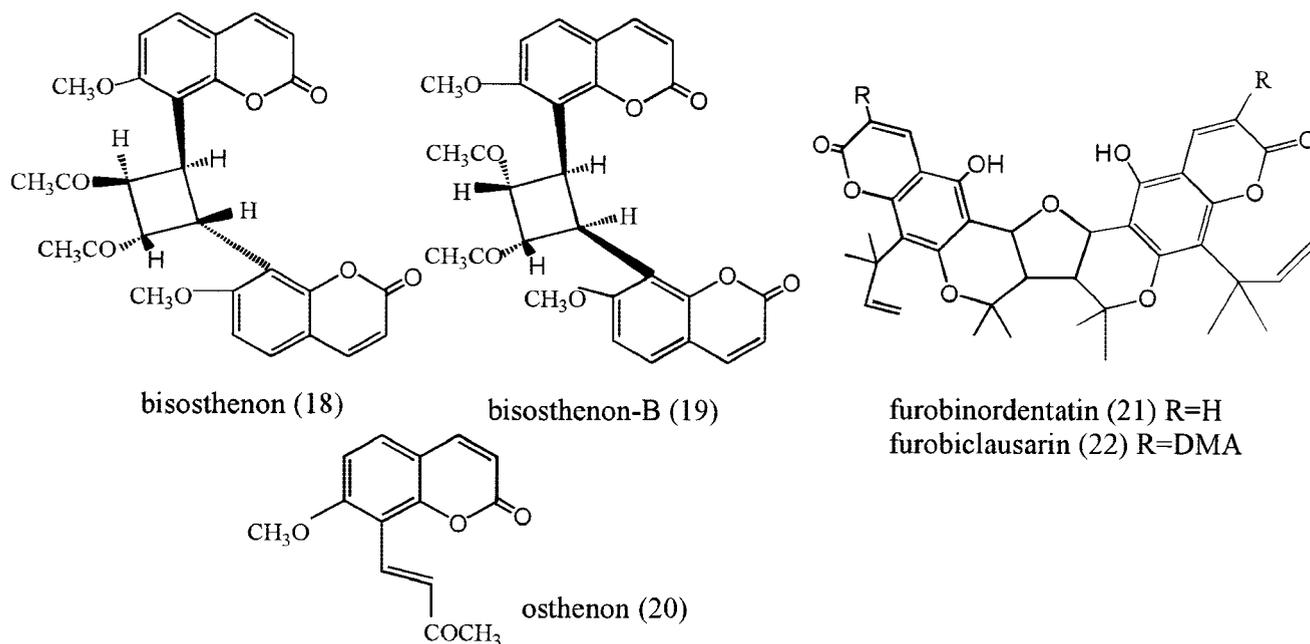


Chart 3

において、分子イオンピークの半分に強いフラグメントイオンが見られたことから、本化合物はジヒドロピラノクマリンが完全に対称に結合した構造を推定した。HMBCの検討により1,1-ジメチルアリル基は3及び8位に存在し、構成する単量体クマリンはclausarin (3)であり、その二量体と推定できた。しかし、2個のクマリン骨格の結合様式及び全構造に関しては、スペクトルデータによるこれ以上の解析が困難であり、未知の全く新しい骨格の存在が考えられたのでX線結晶解析を行った。その結果、ピラノピラン環を介して二量化した構造が判明した。^{14,15)} また、claudimerin-B (24)は種々のスペクトルデータの比較によりclaudimerin-Aのピラノピラン環部分に関する立体異性体と推定できた。ピラノピラン環部分の4つの水素の結合定数が比較的大きいこと、またすべてのシグナル間でNOEが観測されたことから、*trans-trans-trans*又は*cis-trans-cis*のいずれかの立体配置をとることが推定された。PMRにおける結合定数から*trans-trans-trans*が妥当と考えられ、NOESYスペクトルによっても支持された。しかし、他の立体配置の可能性も否定できず、立体構造は未確定である。¹⁵⁾

2-1-3-4. ピラン環——Citrumarin-A (25), -B (26), -C (27), -D (28), -E (29) いずれもリニア型ピラノクマリンともう1つのクマリン骨格が新た

にジヒドロピラン環を形成して連結した構造をしている。連結部の構造については、酸素が置換した炭素に結合した3個の4級メチル基、メチレン-メチレン-メチレン水素の関係をHMBCスペクトルの詳細な検討により決定した。Citrumarin-A (25)はnordentatin (4)と*trans*-dehydroosthol (30), citrumarin-Bはnordentatin (4)と*trans*-dehydroosthenol (31), citrumarin-Cはnordentatin (4)と*trans*-des-O-methylcitrubuntin (32), citrumarin-D (28)はnordentatin (4)と*cis*-des-O-methylcitrubuntin (33)が連結した構造である。Citrumarin-E (29)だけが、リニア型クマリンclausarin (3)を構成分子とし、*trans*-dehydroosthenol (31)との間でピラン環を形成している (Chart 4).¹⁶⁾

2-1-4. Diels-Alder 付加体——Hassmarin (34), Bisparasin (36) 既知の二量体クマリンとしては最も一般的な型であるが、カンキツ類からは2種が単離できた。Hassmarin (34)はO-demethyl-phenallosin (35)と*trans*-dehydroosthol (30)が、bisparasin (36)はcitrubuntin (37)と*trans*-dehydroosthol (30)が環状付加した構造を有している。クマリン環炭素と連結部水素に関してはHMBCによる相関、さらに立体化学はNOEにより決定した。^{17,18)} 連結部にモノテルペン単位を持つ二量体クマリンは知られているが、hassmarinはモノテルペ

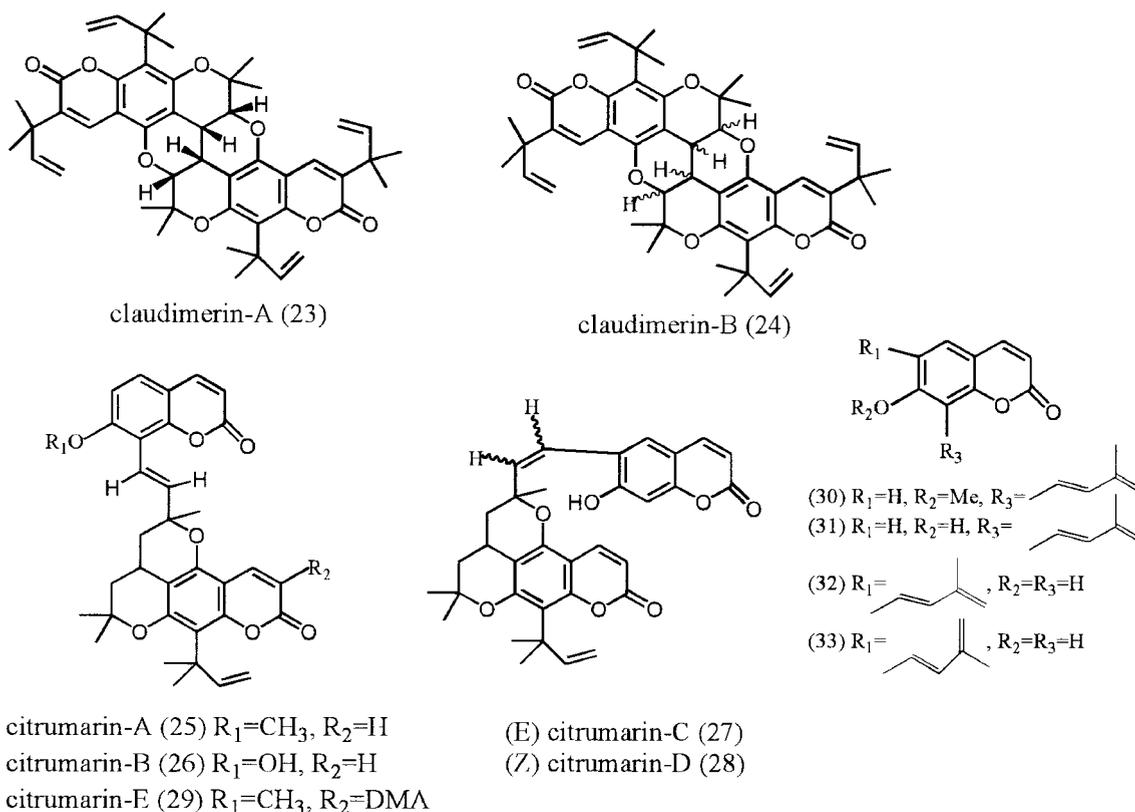


Chart 4

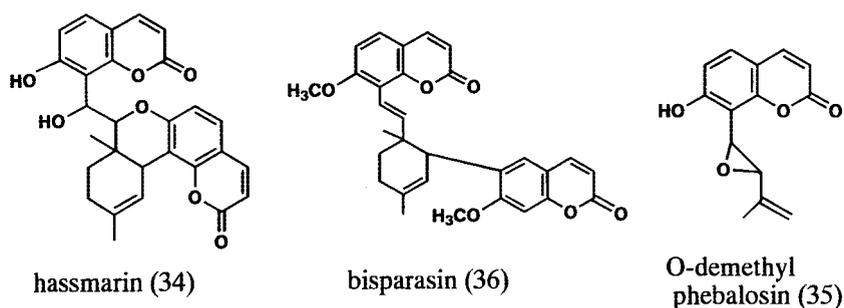


Chart 5

ン部とともにエーテル結合を持った最初の例である (Chart 5).

2-2. アクリドンアルカロイド二量体 Citbismine と命名した一連の新しい二量体アクリドンアルカロイド citbismine-A (38), -B (39), -C (40), -D (41), -E (42), -F (43) を単離した. これまでに知られていた Glycosmis 属植物から得られた Glycobismines-A, -D, -E では, 一方のアクリドン部のカテコール型水酸基が他方のアクリドン部のプレニル基側鎖と 1,4-dioxide 型に結合している. それらに対

し, カンキツ類から得られた citbismine 類では, ヒドロキシイソプロピルフラン環を持つフラノアクリドンアルカロイド furofoline-II (44) の誘導体のジヒドロフラン環と他のアクリドンアルカロイドが結合している. それらの構造は, 種々のスペクトルデータの解析, 最終的には citbismine-A (38) の X 線結晶解析により確定した.¹⁹⁾ 構成成分は, furofoline-II の dihydro-5-hydroxy 体と natuscitrine-II (45), citpressine-II (46) の結合体がそれぞれ citbismine-A^{19,20)} 及び citbismine-F,²²⁾ furofoline-II の di-

hydro-6-hydroxy-5-methoxy 体と natsucitrine-II (45), citpressine-II (46), citracridone-I (47) 及び citpressine-I (48) の結合体がそれぞれ citbismine-B, citbismine-C,²⁰⁾ citbismine-D 及び citbismine-E²¹⁾ である。また, bis-5-hydroxynoracronycine (49) と命名した 5-hydroxynoracronycine (50) の二量体を単離した。本化合物の構造は 5-hydroxynoracronycine を酸と処理して合成した標品との比較により構造決定した (Chart 6).²³⁾

2-3. アクリドン-クマリン二量体

2-3-1. Acrimarine クマリンの 1 種である suberosin (51) が種々のアクリドンアルカロイドと二量化した一連の化合物を acrimarine と命名し, acrimarines-A—N の 13 種 (-C と -L の同一性が判明したため) の構造を明らかにした。^{24—28)} クマリンの結合部位は, アクリドン骨格の 4 位であるものが 2 種 [acrimarine-C (54), acrimarine-D (55)], その他の 11 種はすべて 2 位であり, 他の部位で結合した化合物は未発見である。構造決定は, PMR スペクトルにおいて容易に帰属できるアクリドン骨格とクマリン骨格のシグナルのほかに, 特徴的に出現

する $\delta 5.5—6.5$ 付近のベンジル位とオレフィン水素の 2 つの doublet シグナル, CMR スペクトルにおける $\delta 32—35$ (singlet, ベンジル炭素), $123—126$ (doublet, オレフィン炭素), $132—136$ (singlet, オレフィン炭素) 付近に観測される 3 つのシグナルからアクリドン部とクマリン部の連結部分の構造は決定できた。置換位置は suberosin 部分のメトキシ基からの NOE により決定し, HMBC により確定した (Chart 7)。

2-3-2. Neoacrimarine Suberosin 以外の 3 環性クマリンと種々のアクリドンアルカロイドとの二量体 11 種を単離し, neoacrimarines-A—K と命名し構造決定した。これらは, クマリン骨格の違いにより 3 種類の型に分類できる。

(1) アクリドン-リニア型 3 環性クマリン型: 4 種 [neoacrimarines-A (65), -B (66), -D (67), -E (68)]^{28—30)} クマリン部分は clausarin (3) 又は nordentatin (4) の 2 種で構成され, アクリドンとクマリン骨格を結ぶ炭素-炭素結合の位置は, アクリドン骨格の 2 位のもものが 1 種 (neoacrimarine-D), 4 位のもものが 3 種である。4 位にクマリンが炭素-炭

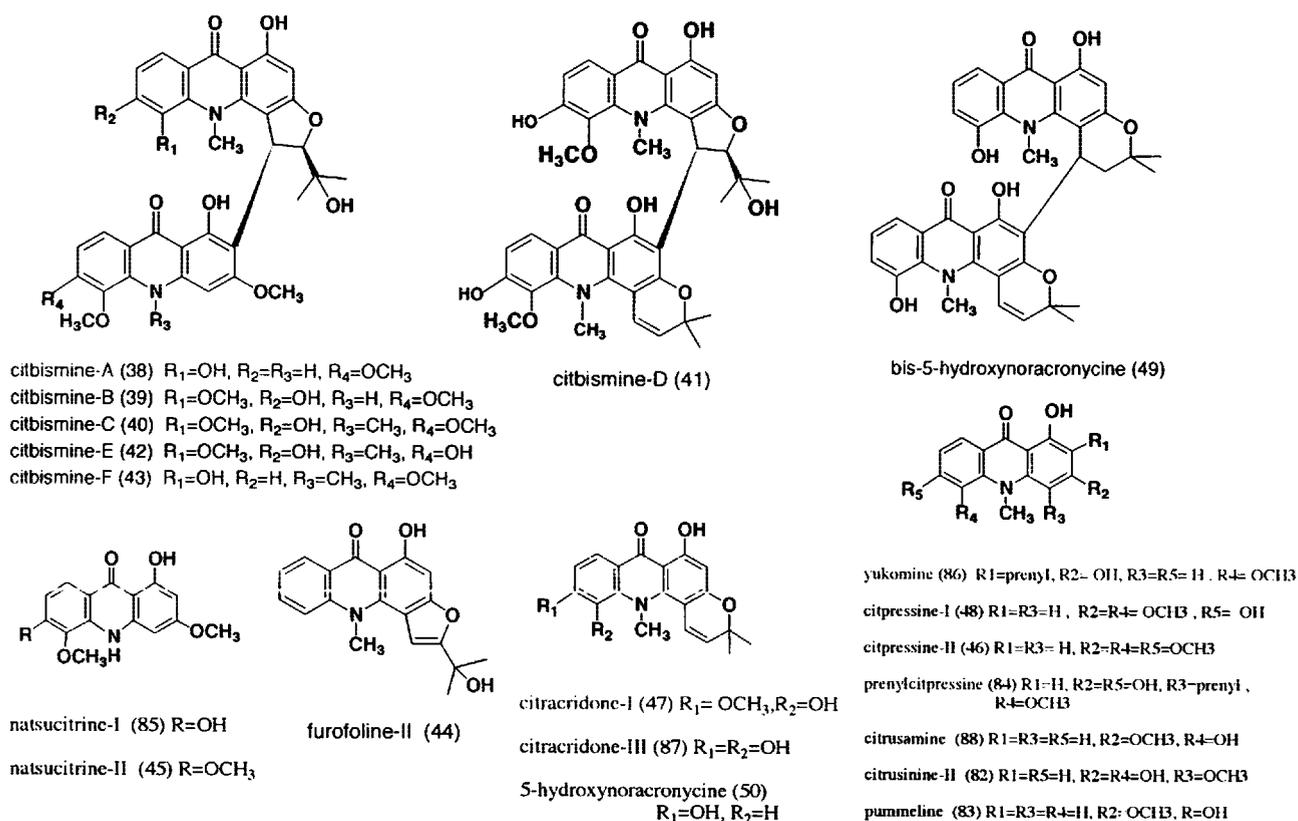
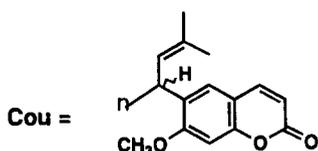
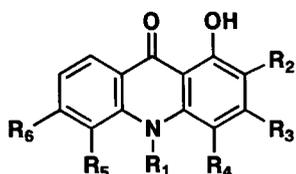


Chart 6



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
acrimarine-A (52)	CH ₃	Cou	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
acrimarine-B (53)	H	Cou	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
acrimarine-C (54)	H	H	OCH ₃	Cou	OCH ₃	OH
acrimarine-D (55)	H	H	OCH ₃	Cou	OCH ₃	OCH ₃
acrimarine-E (56)	H	Cou	OCH ₃	H	OCH ₃	OH
acrimarine-F (57)	CH ₃	Cou	OCH ₃	H	OCH ₃	OH
acrimarine-G (58)	CH ₃	Cou	OH	H	OH	H
acrimarine-H (59)	CH ₃	Cou	OCH ₃	H	OH	H
acrimarine-I (60)	CH ₃	Cou	dimethylpyran		OH	H
acrimarine-J (61)	CH ₃	Cou	dimethylpyran		OCH ₃	OH
acrimarine-K (62)	CH ₃	Cou	OH	H	OCH ₃	H
acrimarine-M (63)	CH ₃	Cou	OH	H	H	H
acrimarine-N (64)	CH ₃	Cou	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃

Chart 7

素結合している場合は、acrimarine の場合も含めてアクリドンはすべて N-H 体である。2つの骨格の結合位置は、HMBCによりジヒドロピラン環のベンジル位水素と炭素の相関を検討して決定した。また、O-メチル体のメトキシ基からのクマリン環4位水素、ジヒドロピラン環のベンジル位水素へのNOEが観測されたことから、クマリン部分のリニア型を証明した。

(2) アクリドン-アンギュラー3環性クマリン型：6種 [neocrimarine-C (67), -F (70), -G (71), -H (72), -I (73), -J (74)]³⁰⁻³² クマリン部分は *cis*-khellactone (16) で、すべてアクリドン骨格の5位とエーテル結合している。PMRスペクトルにおけるケラク톤のジメチルピラン環の酸素の付け根の水素、ジメチル基のシグナルから、結合部分の構造が推定できた。アクリドンとクマリン両環の結合位置はHMBCにおけるケラク톤のベンジル位水素との相関から決定した。なお、ケラク톤部分の立体化学についてはメチレンプロトンのJ値、相互に観測されるNOEから相対配置を決定した。

(3) アクリドン-フラノクマリン型：1種 [neocrimarine-K (75)]³² ジヒドロフラノクマリン環を有する唯一の例である。PMR及びCMRから3-置換-2-ヒドロキシイソプロピルジヒドロフラン環の存在が判明した。アクリドン環との結合位置はHMBCによるベンジル位の水素と炭素の相関

により決定した (Chart 8)。

2-3-3. Dioxinoacrimarine-A アクリドンアルカロイド-クマリン二量体のうち、benzo-1,4-dioxane環を介して二量化している新骨格の化合物を初めて単離し、dioxinoacrimarine-A (76) と命名した。PMRスペクトルより7,8-置換クマリン骨格、4-メトキシ-5,6-二置換アクリドン骨格の存在が判明した。2つの骨格間に介在するトランス型オレフィン水素、メチル基、メチレン水素の結合様式はHMBCスペクトルによる相関から結合位置並びに相対位置を決定した。^{8,28)} Benzo-1,4-dioxane環を介して二量化していると推定される同様の化合物も単離し、種々のスペクトルを用いて検討しているが、位置異性が未決定になっている。

2-4. 特異な構造を有するアクリドンアルカロイド

2-4-1. アクリドン-リグナン リグナン部分構造を有するアクリドンアルカロイドである。1,4-ジオキサン環を形成して結合しているアクリドンとリグナン部分の相関関係について種々のスペクトル法を用いて検討した。しかし、リグナン部のベンジル位の水素がアクリドン部の5位あるいは6位の酸素とエーテル結合した2通りの位置異性の決定がHMBCなどの2次元NMRを駆使しても困難であった。現在までのところ良好な結晶が得られたacrignine-A (77) のみがX線結晶解析によって構

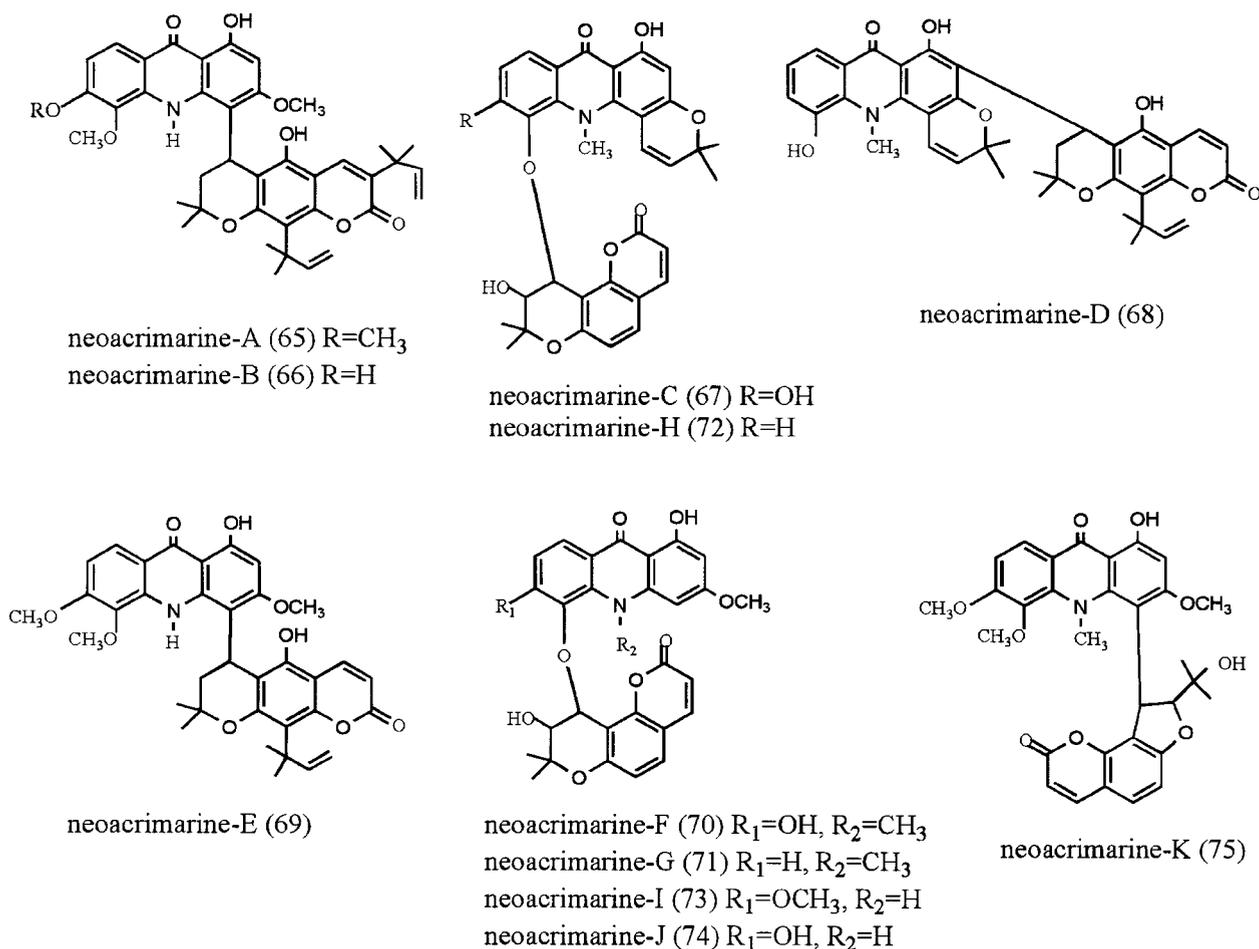


Chart 8

造決定済み³³⁾であるが、残る化合物の構造は未決定である。

2-4-2. シトロポン 7員環部分を持つアクリドンアルカロイド citropone-A (78), -B (79), -C (80) を初めて単離した。Citropone-A の PMR スペクトルにおいて、通常のアクリドンアルカロイドより分子内水素結合した水酸基のシグナルが1個多く、低磁場に特徴的に観測される芳香環プロトンが $\delta 7.97, 6.67$ (各 1H, d) に $J=12.7$ Hz の大きなカップリングで観測されることから新規骨格の存在が推測された。HMBC における相関から7員環部を有する構造が推定されたが、最終的には X 線結晶解析を行って決定した。³⁴⁾ 関連する citropone-B 及び -C の構造は各種スペクトルデータを citropone-A のそれらと比較検討して構造を明らかにした。³⁵⁾ トロポロン型の7員環の部分構造を有しているのにちなんでシトロポンと命名した。

2-4-3. アザクリドン 6員環部分の1つがピ

リジン環になった azacridone-A (81) を初めて単離した。通常のアクリドンアルカロイドの PMR スペクトルでは観測されない $\delta 9.19$ (1H, s), 8.54, 8.06 (1H, d, $J=4.9$ Hz) の著しく低磁場のシグナルは、それらのケミカルシフト、J 値から 3,4-置換ピリジン環の水素と決定した。³⁶⁾

アザ型アクリドンアルカロイドは合成品の例はあったが、天然物として得られたのは最初の例であり、また、6位が窒素であるアザアクリドンとしては唯一の例である (Chart 9)。

2-5. アクリドンアルカロイドの抗発がんプロモーション活性 Berenblum らによる発がん多段階の提唱以来、化学物質によって発生するがんは、イニシエーション→プロモーション→プログレッションの過程で発生・進行するものと考えられている。³⁷⁾ イニシエーション段階は短期間、非可逆的であるのに対し、プロモーション段階は長期間を必要とし、可逆的であることから、プロモーション過程

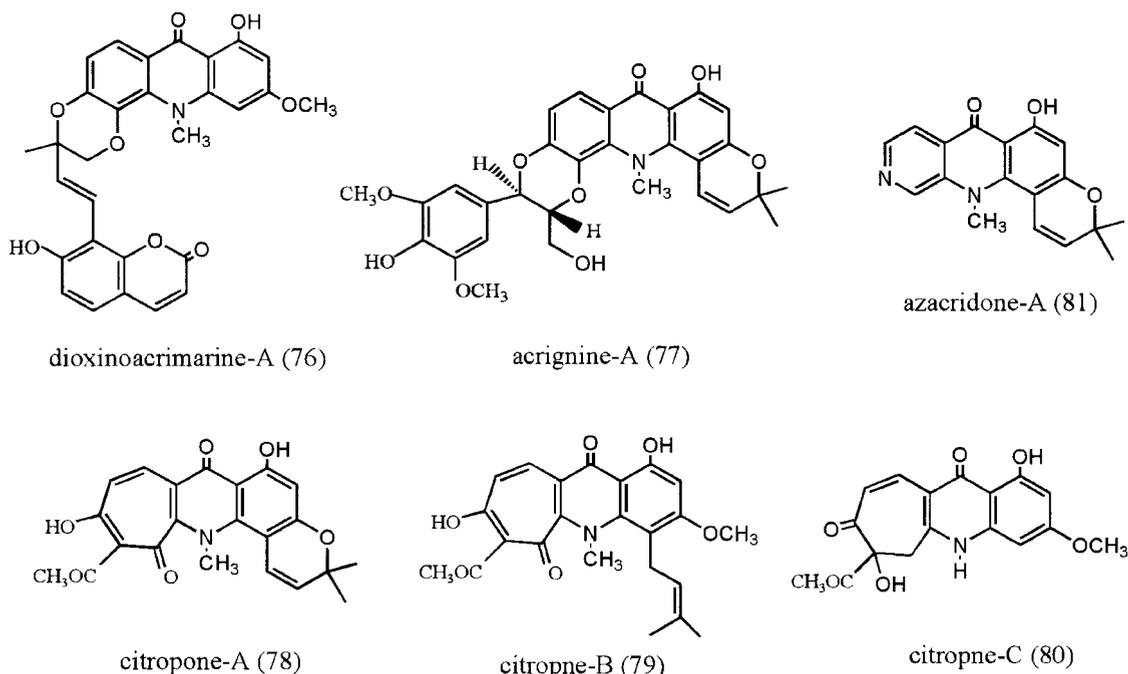


Chart 9

の阻害剤を開発することが、「がんの化学予防」に最も効果的な手段と見なされている。この2段階目に作用する化合物は「発がんプロモーター」と呼ばれており、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) はその代表的な化合物である。

筆者らは、伊藤らにより確立された短期簡易検定法である TPA による Epstein-Barr virus (EBV) 活性化抑制作用を指標にしたスクリーニング法^{1,2)}を用いて単離成分の活性を検討した。なお、この試験により EBV-EA 産生を抑制した化合物は *in vivo* においても活性を有することが多く、抗発がんプロモーターとなり得ると考えられている。実験は、EBV ゲノムを保有する Raji 細胞を n-酪酸存在下発がんプロモーターである TPA とともに培養し、EBV 活性化により強く誘導産生される早期抗原 (EA) を間接蛍光抗体法により検出し細胞の数を測定した。活性の評価は、TPA 及び n-酪酸のみを加えた陽性コントロール群 (約 30% の細胞に EBV-EA が観測される) と、検体を加えた系との EBV-EA 発現率の比較により行った。細胞自身の生存率 (細胞毒性) については、2—3 日の通常培養条件における細胞の自然死率が 10—20% であることから、試薬・検体などを加えて処理した細胞 (2 日後) の生存率が 60% 以上であれば細胞毒性は弱いものと判断した。

比較的多く単離できた単量体及び二量体のアクリドンについて EBV 発現抑制試験を行った。いずれの化合物も 1000 mol ratio/TPA の高濃度でも細胞毒性は弱かった。単量体のアクリドンアルカロイドでは citrusinine-II (82), pummeline (83), prenylcitpressine (84), 5-hydroxynoracronycine (50), 二量体アクリドンクマリンでは試験に付した acrimarine のすべて、neoacrimarines-A (65), -B (66), -E (69) が 1000 mol ratio/TPA の濃度で EBV-EA の発現を 100% 抑制した。特に 5-hydroxynoracronycine (50), neoacrimarine-A (65), -G (71) は 10 mol ratio/TPA の濃度でも 10—13% の抑制活性を示した。したがって、これらの化合物は抗発がんプロモーターとして有望な化合物と考えられる。また、natsucitrine-I (85), yukomine (86) には 10 mol ratio/TPA 濃度でも、それぞれ 10%, 17% の抑制効果が認められた。³⁸⁾ 各濃度で良好な活性を示した citpressine-I (48), -II (46), citracridone-I (47), -III (87), yukomine (86), citrusamine (88) も細胞毒性の弱い、抗発がんプロモーターとして期待できる (Table 1a, Table 1b)。

構造と活性の関係について考察すると、次の傾向が認められた。1) フェノール性水酸基の影響: 5 位又は 6 位に水酸基を持つ化合物は、これらの位置に水酸基を持たない化合物に比べて強い活性が見ら

Table 1a. Relative Ratio of Activation with respect to Positive Control

Sample (TPA 32 pmol=100%)	Concentration (mol ratio/TPA)			
	1000	500	100	10
	% to control (% viability)			
Citpressine-I	24.2 (80)	42.4 (>80)	78.9	100
Citpressine-II	28.3 (70)	50.5	80.9	100
Citracidone-I	6.0 (70)	34.4	77.8	92.9
Citracidone-II	36.7 (80)	68.0	83.7	93.5
Citracidone-III	19.2 (50)	55.7	75.4	97.8
Natsucitrine-I	8.4 (80)	21.7	52.4	89.5
Natsucitrine-II	36.8 (80)	68.3	92.7	100
Citrusinine-II	0 (80)	61.6	80.1	100
Grandisine-II	23.3 (70)	50.8	100	100
Glycocitrine-I	12.0 (80)	68.3	100	100
Grandisinine	27.2 (80)	48.5	90.1	100
Yukomine	33.7 (70)	35.7	80.2	82.6
Citramine	53.6 (80)	71.6	100	100
Pummeline	0 (70)	33.1	90.6	100
Buntanine	23.9 (20)	93.1 (60)	100	100
Honyumine	14.8 (50)	51.2 (60)	87.0	100
Prenylcitpressine	0 (60)	50.1	86.4	100
Citrusamine	11.3 (70)	26.7	72.7	93.5
5-hydroxynoracronycine	0 (70)	20.2	49.4	87.8
5-methoxynoracronycine	57.2 (60)	67.0	100	100
1, 3-dihydroxy-N-methylacidone	27.7 (80)	52.3	82.1	92.6
1-hydroxy-3-methoxy-N-methylacidone	17.9 (70)	64.4	91.8	100
1-hydroxy-3-acetoxyacidone	30.2 (80)	76.6	100	100
1, 3-diacetoxyacidone	21.8 (80)	50.8	94.0	100
Acrimarine-F	0 (50)	0 (50)	47.7 (80)	66.8
Acrimarine-B	10.0 (80)	44.3	65.8	88.2
Acrimarine-D	31.7 (70)	72.1	100	100

Table 1b. Relative Ratio of Acridone-Coumarin Dimers Activation with respect to Positive Control

Sample (TPA 32 pmol=100%)	Concentration (mol ratio/TPA)			
	1000	500	100	10
	% to control (% viability)			
Neoacrimarine-A	0 (70)	44.2	80.3	100
Neoacrimarine-B	0 (70)	41.7	77.2	95.6
Neoacrimarine-C	4.6 (60)	59.8	85.0	100
Neoacrimarine-D	9.0 (60)	60.9	86.7	100
Neoacrimarine-E	0 (60)	48.7	79.9	100
Neoacrimarine-F	8.4 (60)	61.5	88.0	100
Dioxinoacrimarine-A	12.5 (60)	63.7	89.2	100
Glycyrrhetic acid	15.6 (70)	54.3	100	100

れる。また、5位に水酸基を持つピラノアクリドンは強い活性を示す。2) 2,2-ジメチルピラン環を持つアクリドンアルカロイドでは活性を有するものが

認められるが、それらにおいてはアンギュラー型の方がリニア型より活性が強い。3) アクリマリン類は、それらを構成する単量体のアクリドンアルカロ

イドより活性が強い。4) アクリドン骨格の2位にクマリン部が置換した acrimarine-B (53), -F (57)の方が4位にクマリン部が置換した acrimarine-D (55)よりも活性が強い。構造と活性の相関に関してはさらなるデータの蓄積が必要であり、また、*in vivo*での活性も未検討である。

3. カンキツ果実に含まれるがん予防物質

1990年アメリカがん学会は「がん予防に役立つ食物」のガイドライン³⁹⁾を発表したが、その推奨する食品をピラミッドで表した中で、カンキツ類は中位にランクされている。また、日本でも1996年生研機構のプロジェクトの1つとして「カンキツによるがん予防に関する基礎的研究」が発足した。果実部の研究に着手することには、多くの先人の数多くの研究により多種・多数のクマリンやフラボノイドの存在が報告されており、さらにカンキツ類に含まれる抗発がんプロモーターとして auraptene (89),⁴⁰⁾ 及び nobiletin (90)⁴¹⁾ が知られていたので大きなためらいがあった。しかし、活性を指標とした分離が行われていなかったため、新しい発見の可能性を期待して活性物質の探索に着手した。

3-1. 活性品種の選定 農林水産省果樹試験場(現独立行政法人カンキツ研究部)興津支場で栽培されたミカン科に属する3属(Citrus, Fortunella, Poncirus)の果皮(81種)をn-hexane, 99% EtOHで抽出した。得られたエキスをEBV-EA活性化抑制試験に付し、その効果を検討した結果、メキシカンライム(*C. aurantifolia*)、シャデンユ(*C. grandis* cv. Shtian you)、ナツダイダイ、イヨ、森田ネーブル(*C. sinensis* OSBECK)、シュンコウカン(*C. shunkokan* Hort. ex TANAKA)、スダチ(*C. sudachi* Hort. ex SHIRAI)、クネンボ(*C. nobilis* Lour. var Kunep)、ヤツシロ(*C. yatsushiro* Hort. ex TANAKA)、ケラジ(*C. keraji* Hort. ex TANAKA)、キノクニ、シイクワサー(*C. depressa* HAYATA)、コウジ(*C. leiocarpa* Hort. ex TANAKA)、ネイハキンカン(*Fortunella crassifolia* SWINGLE)、ナガキンカン(*F. margarita* SWINGLE)、カラタチ(*Poncirus trifoliata* RAFIN.)のヘキササンエキスが100 µg/ml濃度で100%、10 µg/ml濃度で60%以上のEBV活性化抑制作用を示した。⁴²⁾特にメキシカンライム、ナツダイダイ、スダチ、ヤツシロ、キノクニのヘキササンエキスは1 µg/mlの低濃度でも20%

以上の抑制効果を示し、細胞生存率も100 µg/ml濃度で60%以上と良好であったことから、細胞毒性の弱い抗発がんプロモーターを含有していることが期待された。タヒチライム、バルガモット(*C. bergamia* RISSO et POIT)、ルミーのヘキササンエキスは100 µg/ml濃度で100%、10 µg/ml濃度で80%以上の強い抑制効果を示したが、高濃度における細胞毒性が強かった。しかし、低濃度でも良好な活性が認められたことから低用量での抗発がんプロモーション作用が期待される。

ヘキササン、エタノールのいずれにも高い活性値が認められたが、ヘキササンエキスの方が、活性の強い傾向が認められたので、活性成分は低極性部に存在すると推定した。

そこで比較的強い活性が認められた品種のうち、8種[タヒチライム、バルガモット、ルミー、グレープフルーツ、キヌカワ(*C. glaberrima* Hort. ex TANAKA)、ナツダイダイ、バレンシアオレンジ、オオベニ(*C. tangerina* Hort. ex TANAKA)]のエキスを調製・分画し、得られたフラクションをEBV活性化抑制試験に付して活性成分の分布を検討した。シリカゲルを使用したカラムクロマト又は分取薄層クロマト(diisopropyletherで展開)を用い、Rfが0.7以上、0.7未満—0.5以上、0.4未満に分画した。活性試験の結果、Rf値が0.5付近のゾーンに強い活性が見られ、このゾーンはUV照射で蛍光を発することから、活性本体をクマリンやフラボノイドと推定した。

3-2. 果皮成分の分離 果皮をアセトン抽出し、得られたエキスを水/酢酸エチルエステルでの分配あるいはDiaion HP-20カラムにより分画した。さらにシリカゲルを用いたカラムクロマト、分取薄層クロマトなどを繰り返してクマリン21種、フラボン14種を単離した。特にフラボン類はカンキツ類に特徴的に多く含まれることが知られているポリメトキシフラボンであった。

3-3. 単離成分の発がん抑制効果

3-3-1. クマリン類の抗発がんプロモーション活性 カンキツ類に含まれるクマリンでは、auraptene (AUR) (89)がEBV活性化抑制作用を有することが知られており、⁴⁰⁾抗発がんプロモーターとして有望視されている。また、最近、epoxyauraptene, 5-(3,7-dimethyl-6-epoxy-2-octenyloxy) psora-

len, 8-geranyloxypsoralen など EBV 活性化抑制作用を示すことが報告されている。⁴³⁾

カンキツ果皮より単離した 21 種のクマリンを EBV 活性化抑制試験に付したところ, mexoticin (91) が AUR よりも強い活性を示し, その効果は 1000 mol ratio/TPA で 100%, 500 mol ratio/TPA でも約 90% EBV 活性化を抑制し, 細胞生存率も 1000 mol ratio/TPA で 60%以上と良好であった。⁴⁴⁾

今回の実験によって, カンキツ類に含有される抗発がんプロモータークマリンとして注目されている AUR (89) と同等又はそれ以上の活性を示す化合物が見出された。特に mexoticin は有望な化合物と考えられるが, 含有量が少なく *in vivo* 実験に進むことができなかった (Chart 10, Table 2)。

3-3-2. フラボン類の活性試験

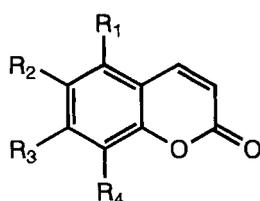
1) 抗発がんプロモーション活性 ポリメトキシフラボン類はカンキツ類に特徴的な成分であり血小板凝集抑制, リンパ球増殖抑制, 抗潰瘍, 抗炎症などの生物活性を示すことが報告されている。⁴⁵⁾

特に, ノビレチン (NBL) (90) は抗酸化作用を

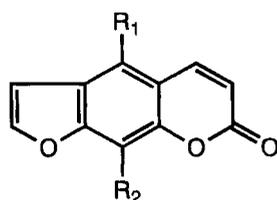
始め多くの生理作用を有し, マウス皮膚がん抑制作用を示すことから抗発がんプロモーターとして期待を集めている。その他のカンキツ由来のフラボノイドでも hesperidin (111) や diosmin (112) はラット口腔, 食道, 大腸, 膀胱がんを抑制すること, quercetin (113), luteolin (114) も発がん抑制効果を有することが報告されている。⁴⁶⁾

カンキツ果皮から単離したフラボン 14 種について, EBV 活性化抑制試験に付して活性を検討した。その結果, 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxyflavone (HPT) (115) に 1000 mol ratio/TPA で 100%, 500 mol ratio/TPA でも約 70%の最も強い抑制効果が認められ, 細胞生存率も 1000 mol ratio/TPA で 70%以上と良好であった (Chart 11, Table 3)。⁴⁷⁾

活性の強さは, 置換基の数, 種類及び結合位置の違いにより, 次のような傾向が認められた。①メトキシ基の増加に伴って活性の強化が認められる。②水酸基よりもメトキシ基を有する化合物の方が強い活性を示す。③メトキシ基の結合位置による大きな差異は認められない。しかし, 3 位にメトキシ基を



92. $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH_2CH(OH)C(OH)(Me)_2$ marmin
 93. $R_1=R_2=H, R_3=OCH_2CH(O)C(Me)_2, R_4=CH_2COCH(Me)_2$ isoponcinarin
 94. $R_2=R_4=H, R_3=OMe, R_1=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH_2CH=C(Me)_2$
 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin
 95. $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH_2CH(OH)C(=CH_2)(Me)$
 7-(6-hydroxy-3,7-dimethyl-2,7-octadienyloxy)-coumarin
 96. $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH=CHC(OH)(Me)_2$
 7-(7-hydroxy-3,7-dimethyl-2,5-octadienyloxy)-coumarin
 89. $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH_2CH=C(Me)_2$ auraptene
 97. $R_2=R_4=H, R_3=OMe, R_1=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH_2CH(OH)C(=CH_2)(Me)$
 5-(6-hydroxy-3,7-dimethyl-2,7-octadienyloxy)-7-methoxycoumarin
 98. $R_1=R_2=H, R_3=OMe, R_4=CH_2COCH(Me)_2$ isomeranzin
 99. $R_1=R_2=H, R_3=OMe, R_4=CH_2CH(OH)C(OH)(Me)_2$ meranzin hydrate
 91. $R_2=H, R_1=R_3=OMe, R_4=CH_2CH(OH)C(OH)(Me)_2$ mexoticin



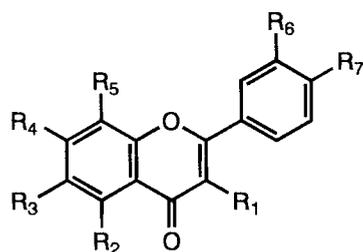
100. $R_1=R_2=H$ psoralen
 101. $R_1=OMe, R_2=H$ bergapten
 102. $R_1=R_2=OMe$ isopimpinellin
 103. $R_2=H, R_1=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH_2CH=C(Me)_2$ bergamottin
 104. $R_1=H, R_2=OCH_2CH(OH)C(OH)(Me)_2$ heraclenol
 105. $R_1=OMe, R_2=OCH_2CH(OH)C(OH)(Me)_2$ byakangelicin
 106. $R_2=H, R_1=OCH_2CH=C(Me)_2$ isoimperatorin
 107. $R_2=H, R_1=OCH_2CH=C(Me)CH_2CH_2CH(OH)C(OH)(Me)_2$
 5-(6,7-dihydroxy-3,7-dimethyl-2-octenyloxy)-psoralen
 108. $R_2=H, R_1=OCH_2CH(OH)C(OH)(Me)_2$ oxypeucedanin hydrate
 109. $R_1=OMe, R_2=OCH_2CH=C(Me)_2$ phellopterin

Chart 10

Table 2. Inhibitory Effects of Treatment with Coumarin on TPA-induced EBV-EA Activations (TPA 32 pmol=100%)

Sample	Concentration (mol ratio/TPA)			
	1000	500	100	10
	% to control (% viability)			
Marmin (92)	5.2 ^{a)} (60) ^{b)}	43.6	77.0	100
Isoponcimarin (93)	0 (60)	42.9	75.8	97.4
5-geranyloxy-7-methoxycoumarin (94)	0 (60)	39.9	70.2	96.1
7-(6-hydroxy-3, 7-dimethyl-2, 7-octadienyloxy)-coumarin (95)	0 (60)	39.1	69.1	96.8
7-(7-hydroxy-3, 7-dimethyl-2, 5-octadienyloxy)-coumarin (96)	0 (60)	37.0	66.3	92.0
Auraptene (AUR) (89)	0 (70)	38.9	68.0	95.8
5-(6-hydroxy-3, 7-dimethyl-2, 7-octadienyloxy)-7-methoxycoumarin (97)	0 (60)	35.0	66.1	92.1
Isomeranzin (98)	0 (60)	25.8	71.8	92.5
Meranzin hydrate (99)	0 (60)	14.1	48.2	81.0
Mexoticin (91)	0 (60)	11.2	46.9	80.0
Psoralen (100)	20.7 (70)	62.9	82.5	100
Bergapten (101)	18.0 (70)	60.3	81.5	100
Isopimpinellin (102)	14.4 (60)	55.7	77.8	100
Bergamottin (103)	9.9 (60)	49.0	76.9	100
Heraclenol (104)	9.7 (60)	46.8	78.3	100
Byakangelicin (105)	8.0 (60)	44.3	75.9	100
Isoimperatorin (106)	7.0 (60)	42.7	76.5	100
5-(6, 7-dihydroxy-3, 7-dimethyl-2-octenyloxy)-psoralen (107)	7.2 (60)	43.9	75.0	100
Oxypeucedanin hydrate (108)	6.5 (60)	41.4	74.8	100
Phellopterin (109)	4.7 (60)	38.2	70.6	97.8
Bergapten dimer (110)	25.5 (60)	64.8	85.7	100

a) Values present relative percentages to the positive control (100%). b) Values in parentheses are viability percentages of Raji cells.



116	R ₁ =R ₅ =R ₆ =H, R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₇ =OMe	5,6,7,4'-tetramethoxyflavone
117	R ₁ =R ₃ =R ₆ =H, R ₂ =R ₄ =R ₅ =R ₇ =OMe	6-demethoxytangeretin
118	R ₁ =R ₆ =H, R ₂ =R ₄ =OH, R ₃ =R ₅ =R ₇ =OMe	5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavone
119	R ₁ =R ₅ =H, R ₄ =OH, R ₂ =R ₃ =R ₆ =R ₇ =OMe	7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone
120	R ₁ =R ₅ =H, R ₂ =OH, R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₇ =OMe	5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone
121	R ₁ =R ₆ =H, R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₇ =OMe	tangeretin
122	R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =OMe	6-demethoxynobiletin
123	R ₁ =R ₅ =H, R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₇ =OMe	sinensetin
124	R ₁ =H, R ₂ =OH, R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =OMe	5-demethylnobiletin
90	R ₁ =H, R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =OMe	nobiletin
125	R ₅ =H, R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₇ =OMe	3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone
126	R ₃ =H, R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =OMe	3,5,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone
127	R ₂ =OH, R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =OMe	5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone
115	R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =OMe	3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone

Chart 11

持つ化合物は、この位置にメトキシ基を持たない化合物に比べて強い活性を示すことから、活性発現に重要と考えられる。

今回の実験により、これまでカンキツに含まれるフラボノイドのうち、最も有望な抗発がんプロモーターとして注目されている NBL (90) と同等あるいはそれ以上の活性を示す化合物が見出された。特に NBL 以上の強い活性を示した HPT は抗発がんプロモーターとして有望な化合物であることが示唆された。そこで、最も強い抑制作用を示した HPT

について、マウス皮膚二段階発がん抑制試験⁴⁸⁾を行い、その有効性を検討した。実験はマウス背部にアセトンに溶解した 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を塗布してイニシエーションを行い、1週間後から TPA を塗布してプロモーションを始めた。陽性コントロール群には、TPA を週 2 回 20 週間塗付し続け腫瘍形成を促した。一方、実験群においては、DMBA でイニシエーション後 TPA 処理 1 時間前にアセトンに溶解した HPT を塗布して、コントロール群と同様の処理をした。TPA 塗付を開

Table 3. Inhibitory Effects of Treatment with Flavonoids on TPA-induced EBV-EA Activations (TPA 32 pmol = 100%)

Sample	Concentration (mol ratio/TPA)			
	1000	500	100	10
	% to control (% viability)			
5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone (116)	12.7 ^{a)} (70) ^{b)}	50.6	78.9	100
6-demethoxytangeretin (117)	11.4(70)	48.9	74.0	96.5
5, 7-dihydroxy-6, 8, 4'-trimethoxyflavone (118)	9.9(70)	39.5	68.0	95.7
7-hydroxy-5, 6, 3', 4'-tetramethoxyflavone (119)	9.1(70)	40.4	72.5	94.7
5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone (120)	8.3(70)	38.9	69.3	93.7
Tangeretin (121)	9.3(70)	36.8	66.0	93.0
6-demethoxynobiletin (122)	8.5(70)	40.3	72.1	95.3
Sinensetin (123)	7.2(70)	35.7	65.0	91.9
5-demethylnobiletin (124)	7.6(70)	38.0	69.2	92.7
Nobiletin (NBL) (90)	6.0(70)	33.0	62.1	91.4
3, 5, 6, 7, 3', 4'-hexamethoxyflavone (125)	6.5(70)	43.6	72.1	95.9
3, 5, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxyflavone (126)	5.7(70)	39.3	68.4	94.6
5-hydroxy-3, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxyflavone (127)	3.6(70)	32.6	60.4	90.3
3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone (HPT, 115)	0(70)	30.1	59.9	88.4

a) Values present relative percentages to the positive control (100%). b) Values in parentheses are viability percentages of Raji cells.

始後 20 週間、マウス 1 匹当たりの背部に発生する腫瘍の数と腫瘍の発生したマウスの匹数を観測し、陽性コントロール群と比較した (Fig. 1)。

陽性コントロール群では、プロモーション開始後 6 週間で腫瘍が発生し、10 週後にはすべてのマウスに腫瘍が発生した。一方、HPT を塗布した群では、8 週後に腫瘍が発生し始め発生率は 10 週後で約 25%、15 週後でも約 55%であった。また、20 週後における平均腫瘍数は、コントロール群では約 9.5 個に対し HPT を塗布した群では約 3 個となり、強力な抑制効果が認められた。さらに腫瘍の大きさにも差異が認められた。腫瘍は直径 1 mm 以上のものを記録したが、HPT を塗布したグループのマウスに発現した腫瘍の大きさは、コントロール群のマウスのものに比べて明らかに小さいことが確認された。以上の結果から HPT は *in vivo* においても有意な抗発がんプロモーション作用を有することが明らかとなった。

2) NO 産生抑制試験 ラジカルの 1 つである nitric oxide (NO) は内皮由来弛緩因子として同定され、血圧の調節、血小板凝集、好中球の活性化、神経の可塑性、細胞のアポトーシスなどに関わることが報告されている。また、NO は DNA 側鎖の切断や塩基の脱アミノ反応などを起こし発がんイニシエーターとしても作用することが知られている。⁴⁹⁾

そこで、NO の発がんイニシエーション作用を利用して NO ドナーである (±)-(E)-methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide (NOR 1) をイニシエーター、TPA をプロモーターとして用い、イニシエーション段階におけるマウス皮膚二段階発がん抑制試験⁵⁰⁾を行い HPT の効果を検討した。

NOR1 塗布の前後 2 週間に渡って、HPT 又は NBL を投与したのち、週 2 回、20 週間 TPA を塗布し続けた。TPA 処理を開始後 20 週間、マウス 1 匹当たりの背部に発生する腫瘍の数並びに腫瘍の発生したマウスの匹数を観測し、陽性コントロール群と比較した。

まず、NOR1 によるイニシエーション作用を確認するために DMBA との比較によりその効力を検討した。イニシエーターとして DMBA 又は NOR1 を用いた場合、次のような結果が得られた。

① DMBA では 6 週目、NOR1 では 7 週目に腫瘍が発生し始め、それぞれ 10, 12 週目にすべてのマウスに腫瘍が発生した。

② 20 週後のマウス 1 匹当たりの平均腫瘍数は DMBA では約 9.5 個、NOR1 では約 8 個が発現した。

以上のように DMBA のイニシエーション作用は NOR1 のそれよりも強いことが示されたが、大き

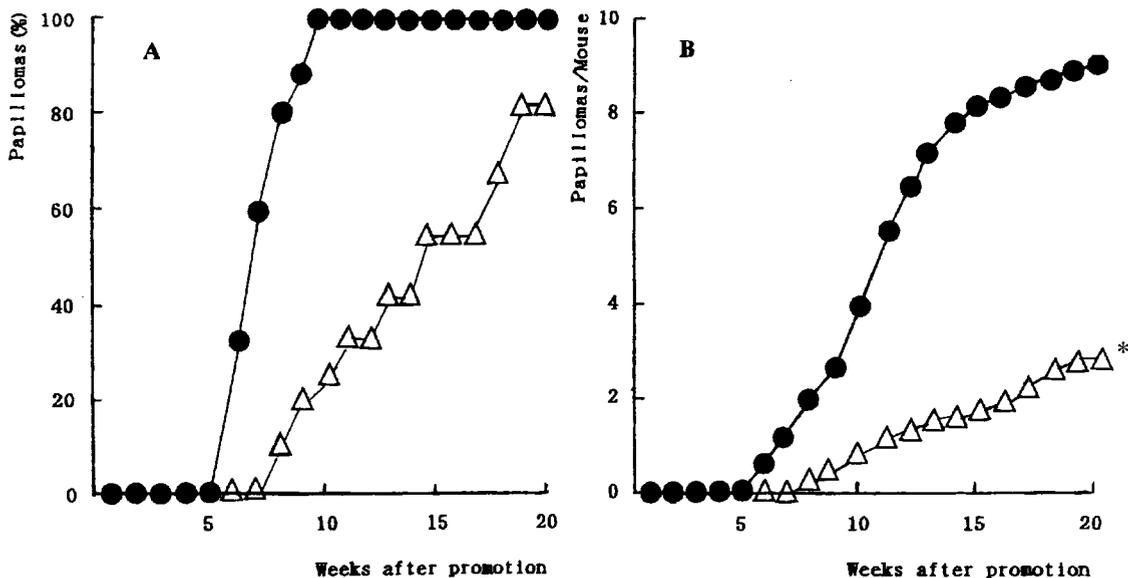


Fig. 1. Inhibition of TPA-induced Tumor Promotion by Multiple Application of 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone (85 nmol)
 A: Percentage of mice bearing papillomas, B: Average number of papillomas per mouse.
 ●: control TPA alone, △: TPA + 85 nmol of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone. *Statistically different from control group ($p < 0.005$).

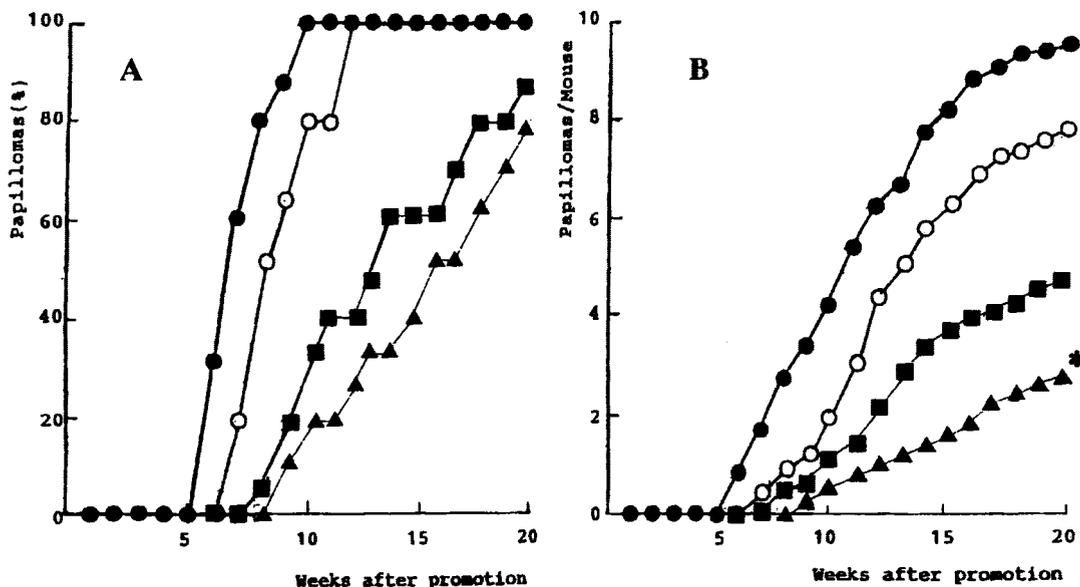


Fig. 2. Inhibition of NOR1/TPA-induced Tumor Promotion by Multiple Application of Nobiletin (NBL) and 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone (HPT)
 A: Percentage of mice bearing papillomas, B: Average number of papillomas per mouse.
 ●: DMBA (390 nmol) + TPA (1.7 nmol), ○: NOR1 (390 nmol) + TPA (1.7 nmol), ■: NOR1 (390 nmol) + 0.0025% NBL (2 weeks) + TPA (1.7 nmol), ▲: NOR1 (390 nmol) + 0.0025% HPT (2 weeks) + TPA (1.7 nmol). * $p < 0.05$ in t -test between NOR1 + TPA versus HPT treatment.

な差異が認められなかったため NOR1 も DMBA 同様にイニシエーターとしての役割を十分に果たすことができるかと判断した (Fig. 2)。

NOR1 を用いた陽性コントロール群では、プロモーション開始後 7 週間後腫瘍が発生し、12 週間後ではすべてのマウスに腫瘍が発現した。一方、

HPT (115) 又は NBL (90) を投与した群では、それぞれ 9 週間後、8 週間後に腫瘍が発生し始め、発生率は 12 週間後で約 25%、40%であった。また、20 週間後における平均腫瘍数は、コントロール群では約 8 個に対し、HPT を投与した群では約 3 個、NBL を投与した群では約 5 個となり、顕著な抑制効果が認め

られた。HPT, NBL 両化合物ともに良好な抑制活性を示したが、HPT には NBL より強い活性が認められ、本化合物のイニシエーション段階での優れた発がん予防効果が明らかとなった。以上の結果から、HPT は *in vivo* でのマウス皮膚二段階発がん抑制試験においても良好な結果を示し、発がんのイニシエーション、プロモーションの両段階で抑制効果を示すことが明らかとなった。また、HPT は NBL より有望な発がん予防物質と結論した。⁵¹⁾

HPT は多様な生物活性を有することが知られている。例えば HL-60 細胞を分化誘導し、がん細胞の細胞毒性を高めること、⁵²⁾ TNF α の発生抑制に有効であること、⁵³⁾ さらに cAMP phosphodiesterase 抑制活性を有することも報告されている。⁵³⁾ また、HPT を始め NBL, tangeretin (TNG) (121) 等のポリメトキシフラボン含量の多いカンキツ類 (クレメンタイン, サワーオレンジ, スイートオレンジ) の植物オイルが真菌類に抑制効果を示すことから自然界におけるカンキツの抵抗性の要因とも考えられている。⁵⁴⁾

最近、澤田らのグループは抗がん剤の排出に関係している P-糖たんぱく質へのカンキツ果汁成分の影響を検討した結果、NBL や tangeretin (121) などが P-糖たんぱく質を阻害することを明らかにしている。⁵⁵⁾ したがって、HPT の抗発がん作用と抗がん剤排出阻害作用を組み合わせることができれば、新しい観点からのがん治療法の可能性が期待される。

3-4. 誘導体の合成 これまでの結果から、HPT は発がんのイニシエーション、プロモーションの 2 つの過程で抑制効果を示すことが明らかとなり、発がん予防物質として有望であることが判明した。その作用機序の解明などには多量の HPT が必要であるが、天然物としては含有量が少なく、多量入手することは困難である。また、既知の合成スキームに従った合成は、工程が長く、総収率も低い。そこで HPT をリード化合物として比較的簡単な構造を持ち、活性の強い化合物の創製を試みることにした。

3-4-1. フラボンエーテル類の合成 メトキシ基の数が最も多く存在する (7 個) HPT に最も強い抗発がんプロモーション活性が認められたことから、メトキシ基の増加によって活性が強化されるこ

とが明らかである。これは、フラボノイドによるラジカルや活性酸素の消去や捕捉作用による抗酸化作用には、フェノール性水酸基の存在が不可欠と考えられている⁴⁵⁾ のと対照的であり、HPT の抑制作用はラジカル産生抑制に基づくことが推測された。

デザインに当たっては、酸素官能基の数をできるだけ多くすること、脂溶性を高めることを意図して、種々のアルキルエーテル類を合成することにした。原料には、市販品として入手が容易であり水酸基 5 個を有する quercetin (113) 及び morin (128) を選んだ。水酸基を種々のアルキル基 (メチル, エチル, n-プロピル, n-ブチル, アリル基) でエーテル化し、炭素鎖が伸長した誘導体を合成した (Chart 12)。⁵⁶⁾

3-4-2. 合成フラボンエーテル類の抗発がんプロモーション活性 合成したフラボンエーテル類 10 種及びアセテート 2 種について EBV 活性化抑制試験を行った。その結果、morin (128) 及び quercetin (113) のアリル体 137 及び 138 に最も強い抑制効果が認められた。その効果は、1000 mol ratio/TPA で 100%, 500 mol ratio/TPA でも 80% 以上の EBV 活性化を抑制し、細胞生存率も 1000 mol ratio/TPA で 70% と良好であった (Table 4)。⁵⁷⁾

構造と活性には次のような傾向が認められた。

1) メチル体 (129, 130) は 1000 mol ratio/TPA で 95% 以上、500 mol ratio/TPA でも 75% 以上の EBV 活性化を抑制したが、エチル, n-プロピル, n-ブチルと置換基の伸長に伴い、活性強度は低下した。この結果は、側鎖の伸長による脂溶性の増強はかならずしも活性の強化につながらないことを示している。しかし、アリル体 (137, 138) に強い効果が観察されたことから、ある程度の脂溶性は効果的に働き、置換基の不飽和結合が抑制活性に関与しているものと推測された。

2) 同種の置換基を有する化合物においては、morin 誘導体 (B 環 2', 4' 位置換体) が quercetin 誘導体 (B 環 3', 4' 位置換体) と比べて若干強い抑制効果を示したことから、酸素官能基の結合位置も活性発現に関与するものと考えられる。

3) アセテート (139, 140) よりメチル体 (129, 130) の方が若干活性が強いことから、エーテルをエステルに変換する形で脂溶性の増強を図っても、活性向上には寄与せず逆にマイナス因子となりかね

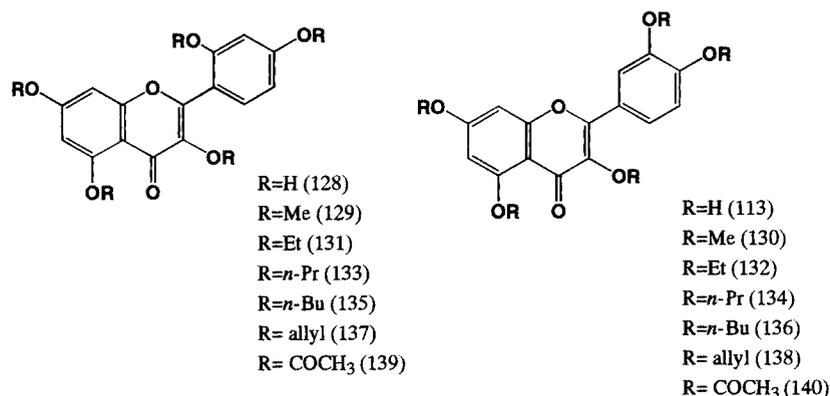


Chart 12

Table 4. Inhibitory Effects of Treatment with Flavonoid Derivatives on TPA-induced EBV-EA Activations (TPA 32 pmol=100%)

Sample	Concentration (mol ratio/TPA)			
	1000	500	100	10
% to control (% viability)				
Morin pentamethyl ether	4.2 ^a (70) ^b	30.1	74.0	96.9
Quercetin pentamethyl ether	3.5 (70)	28.8	70.3	95.6
Morin pentaethyl ether	6.3 (70)	38.2	81.4	100
Quercetin pentaethyl ether	9.4 (70)	40.6	85.9	100
Morin pentapropyl ether	11.8 (70)	45.4	88.0	100
Quercetin pentapropyl ether	18.4 (70)	49.9	92.7	100
Morin pentabutyl ether	20.7 (60)	52.3	96.4	100
Quercetin pentabutyl ether	23.5 (60)	55.5	97.9	100
Morin pentaallyl ether	0 (70)	15.8	55.0	81.7
Quercetin pentaallyl ether	0 (70)	18.9	58.4	85.0
Morin pentaacetate	5.7 (70)	35.2	78.4	100
Quercetin pentaacetate	7.6 (70)	30.5	70.1	100
HPT	0 (70)	30.1	59.9	88.4

^a) Values present relative percentages to the positive control (100%). ^b) Values in parentheses are viability percentages of Raji cells.

ない。

以上の結果から活性の発現には、置換基の種類、結合位置、そして脂溶性が関与していることが考えられる。Morin 及び quercetin のアリル体は、HPT より強い抑制効果を示したことから、抗発がんプロモーターとしての活用が期待できる。

3-4-3. Quercetin Pentaallyl Ether (QPA) の活性
In vitro 実験において強い抑制作用が認められたアリル体のうち、quercetin pentaallyl ether (QPA) (138) について *in vivo* マウス皮膚二段階発がん抑制試験を行い活性の評価を行った。DMBA によりイニシエーションを行い、1 週間後から TPA を塗

布してプロモーションを始めた (Fig. 3)。

陽性コントロール群では、プロモーション開始後 6 週間で腫瘍が発生し、10 週後にはすべてのマウスに腫瘍が発生した。一方、QPA を塗布した群では、9 週後に腫瘍が発生し始め、発生率は 10 週後で 20%、15 週後でも 60%であった。また、20 週後における平均腫瘍率は、コントロール群では約 9 個に対し、QPA を塗布した群は約 4 個となり、顕著な抑制効果が認められた。この結果、QPA は *in vivo* においても有意な抗発がんプロモーション作用を有し、HPT とほぼ同等の抑制効果を持つ有望な抗発がんプロモーターであることが明らかとなった。⁵⁷⁾ また、

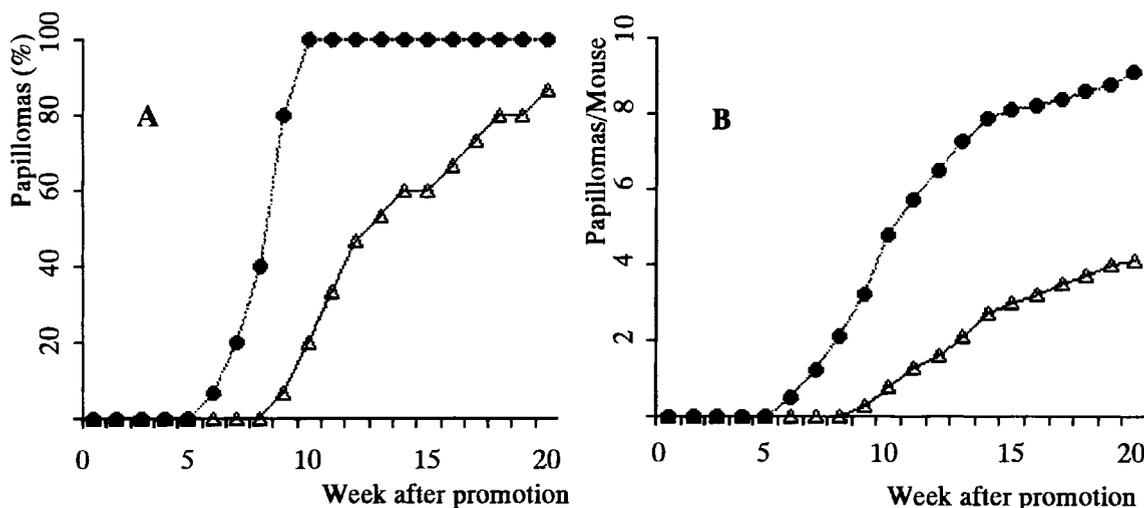


Fig. 3. Inhibition of TPA-induced Tumor Promotion by Multiple Application of Quercetin Pentaallyl Ether (85 nmol)

A: Percentage of mice bearing papillomas, B: Average number of papillomas per mouse.

●: control TPA alone, △: TPA+85 nmol of quercetin pentaallyl ether.

HPT, QPA の活性の強さは, *in vitro* 及び *in vivo* において, 活性の標準物質として頻用される glycyrrhetic acid (141) や curcumin (142) より強いものであったことから, P-糖たんぱく質との相互作用や抗発がんプロモーターの作用機序の解明にも利用できると思われる。

3-5. P-糖たんぱく質阻害作用 近年, 薬物と健康食品との相互作用が話題になっている。グレープフルーツジュースに関してジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬, シクロスポリン, テルフェナジン, ミダゾラムなどと併用すると, 薬物の血中濃度の上昇をもたらすことが報告され, その原因物質の解明が行われている。⁵⁸⁾ ジュースに含まれているフラボノイドが CYP3A4 を阻害することがヒト肝ミクロソームを用いた実験で認められ,⁵⁹⁾ naringin (143), naringenin (144), quercetin (113) などが *in vitro* で阻害作用を示すことが報告されている。その後, 各種のフラノクマリン類が発見され阻害物質は 6',7'-dihydroxybergamottin (145), bergamottin (146) 及びそれらの二量体であることが明らかにされた。⁶⁰⁾ 最近, 澤田らはオレンジジュースと抗がん剤の相互作用を検討し, ジュースに含まれるポリメトキシフラボンが CYP3A4 ではなく, P-糖たんぱく質の薬物排出作用を阻害することにより体内での滞留時間を延長する効果のあることを明らかにした。⁶¹⁾ すなわち, LLC-PK1 cell においてはビンブラスチンの取込は cyclosporin-A, HMF, tangeretin,

nobiletin による影響はないが, MDR1 で変性した LLC-GA5-COL 300 cell では著しく増大した。したがって, これらのポリメトキシフラボンが P-糖たんぱく質による薬物溶出を著しく阻害することが明らかになった。ポリメトキシフラボン類には発がん予防効果があることを合わせ考えると, 薬物の排出阻害に基づく抗がん剤の投与量の削減・効果の延長など, 治療法に新しい手段が加えられることになる。そこで安価で入手が容易な原料から簡単に誘導した QPA の P-糖たんぱく質阻害作用を検討した。比較のため, その他の誘導体についても検討した結果 (Figs. 4, 5), プチルエーテル, quercetin, morin では効果が認められなかったが, メチル, エチル, プロピル, アリルエーテルのすべてが K562/ADM cell による vincristine の取込を増加させた。特に quercetin のメチル (130), アリルエーテル (138) 及び morin のエチルエーテル (131) は 10.6, 10.8, 14.4 倍も取込の増加を示した。⁶²⁾ これらの P-糖タンパク阻害作用は, 代表的な薬物である cyclosporin A や verapamil より強いものであった。安価で豊富な素材から容易に合成できる QPA は抗発がんプロモーター, イニシエーターであるとともに P-糖タンパク質の阻害作用を示すことから「がんの化学療法」の薬物として有力な候補であることが明らかとなった。

4. おわりに

本研究を遂行するにあたり, 終始有益な御指導・

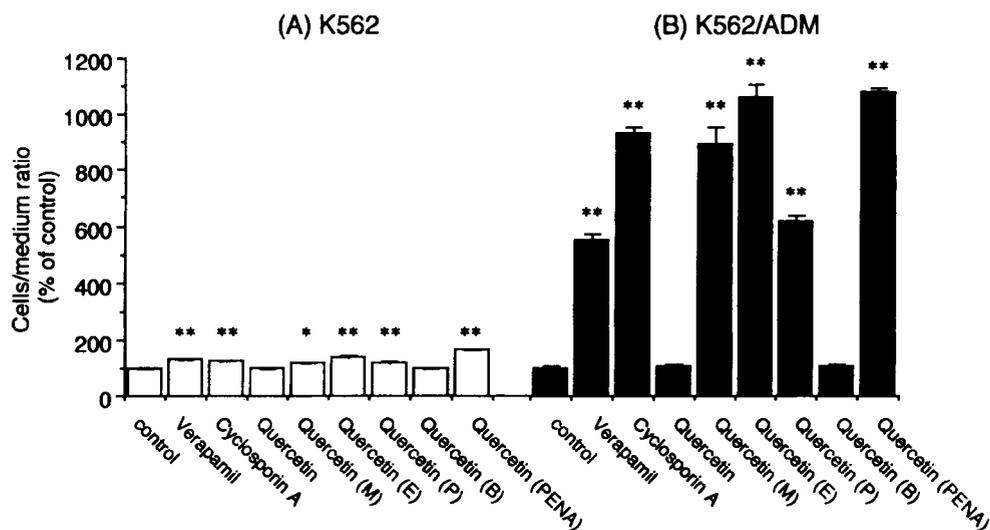


Fig. 4. Effects of 20 μ M Quercetin and its derivatives on the Uptake of [3 H] Vincristine by (A) K562 and (B) K562/ADM Cells

Each bar represents the mean S.E. from four experiments. Significant differences from the control were determined by ANOVA followed by Duncan's test (* p <0.05, ** p <0.01).

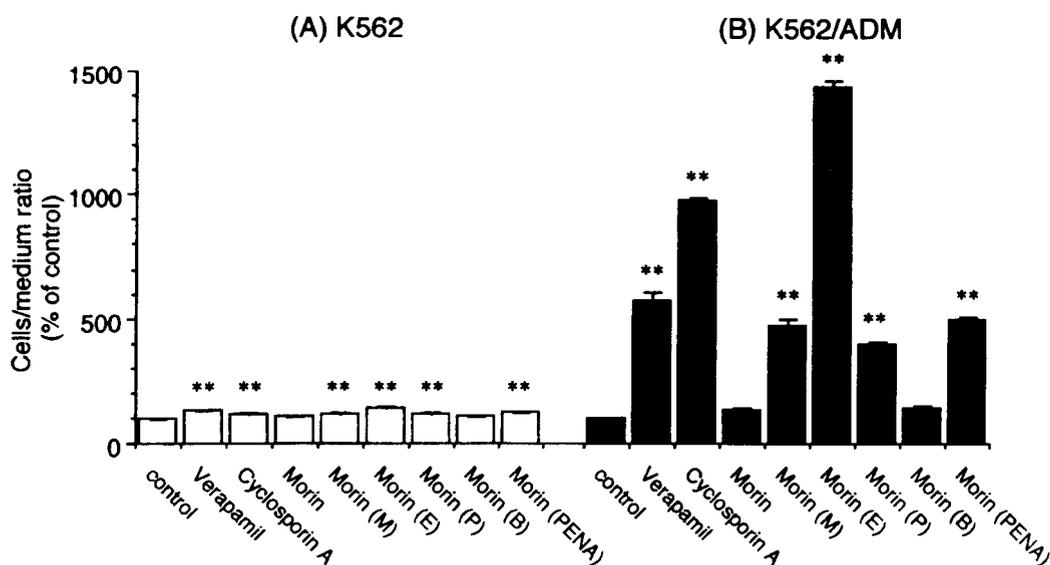


Fig. 5. Effects of 20 μ M Morin and its Derivatives on the Uptake of [3 H] Vincristine by (A) K562 and (B) K562/ADM Cells

Each bar represents the mean S.E. from four experiments. Significant differences from the control were determined by ANOVA followed by Duncan's test (** p <0.01).

御鞭撻を賜りました名城大学薬学部 古川 宏教授に厚く御礼申し上げます。また、次の方々に大変な御援助を頂きました。名城大学薬学部 井藤千裕博士：種々の機器測定と解析，京都府立医科大学 西野輔翼教授，徳田春邦博士，九州大学薬学研究院 澤田康文教授，大谷寿一博士：生物活性の測定，徳島文理大学薬学部 浅川義範教授，橋本敏弘博士，Duke 大学 A. T. McPhail 教授，名古屋市立大学薬学部 畑野研一郎博士：X 線結晶解析，農林水

産省果樹試験場(現 独立行政法人カンキツ研究部) 矢野昌充博士，大村三男博士：植物資料の提供。本研究は武庫川女子大学薬学部薬化学 II 教室において遂行されましたが，特に本教室に在籍されました竹村優子博士，岩瀬由紀子博士の御尽力に感謝致しますとともに，引用文献に挙げました卒論生の方々の御協力に感謝致します。

REFERENCES

- 1) Ito Y., Yanase S., Fujita J., Harayama T., Takashima M., Imanaka H., *Cancer Lett.*, **13**, 29–37 (1981).
- 2) Henle G., Henle W., *J. Bacteriol.*, **91**, 1248–1256 (1966).
- 3) Ju-ichi M., Takemura Y., Okano M., Fukamiya N., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **32**, 1189–1193 (1991).
- 4) Ikeda S., Takemura Y., Ju-ichi M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **48**, 999–1002 (1998).
- 5) Takemura Y., Nakata T., Ju-ichi M., Okano M., Fukamiya N., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1213–1215 (1994).
- 6) Ju-ichi M., Takemura Y., Azuma M., Tanaka K., Okano M., Fukamiya N., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2252–2255 (1991).
- 7) Ito C., Matsuoka M., Oka T., Ju-ichi M., Niwa M., Omura M., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1230–1232 (1990).
- 8) Takemura Y., Kawaguchi H., Maki S., Ju-ichi M., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 804–809 (1996).
- 9) Takemura Y., Isono Y., Arima Y., Ju-ichi M., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **45**, 1169–1172 (1997).
- 10) Ito C., Ju-ichi M., Inoue M., Muraguchi M., Mizuno T., Tanahashi S., Omura M., McPhail D. R., McPhail A. T., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1957–1959 (1989).
- 11) Ito C., Mizuno T., Tanahashi S., Furukawa H., Ju-ichi M., Inoue M., Muraguchi M., Omura M., McPhail A. T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2102–2107 (1990).
- 12) Takemura Y., Ju-ichi M., Hatano K., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 997–998 (1994).
- 13) Takemura Y., Ju-ichi M., Hatano K., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2436–2440 (1994).
- 14) Takemura Y., Nakata T., Uchida H., Ju-ichi M., Hatano K., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2061–2062 (1993).
- 15) Ju-ichi M., Takemura Y., Okano M., Fukamiya N., Hatano K., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 11–14 (1996).
- 16) Takemura Y., Ju-ichi M., Nakagawa K., Omura M., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 73–76 (1993).
- 17) Ito C., Ono T., Takemura Y., Nakata N., Ten H., Ju-ichi M., Okano M., Fukamiya N., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1302–1304 (1993).
- 18) Ito C., Nakagawa M., Inoue M., Takemura Y., Ju-ichi M., Omura M., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1657–1658 (1993).
- 19) Takemura Y., Inoue M., Kawaguchi H., Ju-ichi M., Hashimoto T., Kan Y., Takaoka S., Asakawa Y., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1548–1549 (1994).
- 20) Takemura Y., Matsushita Y., Nagareya N., Abe M., Takaya J., Ju-ichi M., Hashimoto T., Kan Y., Takaoka S., Asakawa Y., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1340–1345 (1995).
- 21) Ju-ichi M., Takemura Y., Nagareya N., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **42**, 237–240 (1996).
- 22) Takemura Y., Ju-ichi M., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **51**, 851–855 (1999).
- 23) Takemura Y., Wada M., Ju-ichi M., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 693–696 (1998).
- 24) Ju-ichi M., Inoue M., Kajiura I., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3202–3205 (1988).
- 25) Furukawa H., Ito C., Mizuno T., Ju-ichi M., Inoue M., Kajiura I., Omura M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1990**, 1593–1599.
- 26) Ito C., Tanahashi S., Tani Y., Ju-ichi M., Omura M., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2586–2588 (1990).
- 27) Takemura Y., Isono Y., Arima Y., Ju-ichi M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **34**, 2363–2372 (1992).
- 28) Takemura Y., Ju-ichi M., Omura M., Haruna M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **38**, 1937–1942 (1994).
- 29) Takemura Y., Maki S., Ju-ichi M., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **36**, 675–680 (1993).
- 30) Takemura Y., Kurozumi T., Ju-ichi M., Okano M., Fukamiya N., Ito C., Ono T., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 11–14 (1996).

- wa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1757–1759 (1993).
- 31) Takemura Y., Kuwahara J., Ju-ichi M., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Heterocycles*, **45**, 1411–1416 (1997).
- 32) Takemura Y., Takaya J., Okamura Y., Atarashi T., Nagareya N., Ju-ichi M., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1518–1521 (1998).
- 33) Takemura Y., Abe M., Ju-ichi M., Ito C., Hatano K., Omura M., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 406–407 (1993).
- 34) McPhail A. T., Ju-ichi M., Fujitani Y., Inoue M., Wu T.-S., Furukawa H., *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3271–3272 (1985).
- 35) Ito C., Tanahashi S., Fujiwara K., Nakagawa M., Ju-ichi M., Fujitani Y., Inoue M., McPhail A. T., Wu T.-S., Kajiura I., Omura M., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1881–1885 (1990).
- 36) Takemura Y., Isono Y., Ju-ichi M., Omura M., Ito C., Furukawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 789–790 (1993).
- 37) Berenblum I., *J. Pathol. Bacteriol.*, **32**, 425 (1929).
- 38) Takemura Y., Ju-ichi M., Ito C., Furukawa H., Tokuda H., *Planta Med.*, **61**, 366–367 (1995).
- 39) Nishino H., *Mol. Med.*, **33**, 380–385 (1996).
- 40) Murakami A., Kuki W., Takahashi Y., Yonei H., Nakamura Y., Ohno Y., Ohigashi H., Koshimizu K., *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 443–452 (1997).
- 41) Murakami A., Nakamura Y., Torikai K., Tanaka T., Koshiba T., Koshimizu K., Kuwahara S., Takahashi Y., Ogawa K., Yano M., Tokuda H., Nishino H., Mimaki Y., Sashida Y., Kitanaka S., Ohigashi H., *Cancer Res.*, **60**, 5059–5065 (2000).
- 42) Iwase Y., Takemura Y., Ju-ichi M., Kawaii S., Yano M., Okuda Y., Mukainaka T., Tsuruta A., Okuda M., Takayasu J., Tokuda H., Nishino H., *Cancer Lett.*, **139**, 227–236 (1999).
- 43) Miyake Y., Murakami A., Sugiyama Y., Isobe M., Koshimizu K., Ohigashi H., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3151–3157 (1999).
- 44) Iwase Y., Takemura Y., Ju-ichi M., Yano M., Tokuda H., Nishino H., presented at the 45th Annual Meeting of The Japanese Society of Pharmacognosy, Sendai, on September, 1998. Abstract p 241.
- 45) Benavente-Garcia O., Castillo J., Martin F. R., Orturio A., Del Rio J. A., *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4505–4515 (1997).
- 46) Tanaka T., Sumida T., Ogawa H., *Foods Food Ingredients J.*, **177**, 43–47 (1998).
- 47) Iwase Y., Takemura Y., Ju-ichi M., Ito C., Furukawa H., Kawaii S., Yano M., Mou X.-Y., Takayasu J., Tokuda H., Nishino H., *Cancer Lett.*, **154**, 101–105 (2000).
- 48) Tokuda H., Ohigashi H., Koshimizu K., Ito Y., *Cancer Lett.*, **33**, 279–285 (1986).
- 49) Halliwell B., *Lancet*, **344**, 721–724 (1994).
- 50) Tokuda H., Ichiishi E., Onazawa M., Yamaguchi S., Konoshima T., Takasaki M., Noshino H., “Biology of Nitric Oxide,” Part 6, eds. by Moncada S., Tada N., Maeda H., Higgs E. A., Portland Press, London, 1998, pp. 185–186.
- 51) Iwase Y., Takemura Y., Ju-ichi M., Yano M., Ito C., Furukawa H., Mukainaka T., Kuchide Y., Tokuda H., Nishino H., *Cancer Lett.*, **163**, 7–9 (2001).
- 52) Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K., Yano M., *Anticancer Res.*, **19**, 1261–1270 (1999).
- 53) Manthey J. A., Grohmann K., Montanari A., Ash K., Manthey C. L., *J. Nat. Prod.*, **62**, 441–444 (1999).
- 54) Del Rio J. A., Arcas M. C., Benavente-Garcia O., Ortuno A., *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4423–4428 (1998).
- 55) Ikegawa T., Ushigome F., Koyabu N., Morimoto S., Shoyama Y., Ohtani H., Sawada Y., *Cancer Lett.*, **160**, 21–28 (2000).
- 56) Ohtani H., Ikegawa T., Ju-ichi M., Iwase Y., Ito C., Furukawa H., Morimoto S., Shoyama M., Naito M., Tsuruo T., Sawada Y., presented at the 121st Annual Meeting of The Pharmaceutical Society of Japan, Sapporo, on March, 2001, Abstract 3, p 84.
- 57) Iwase Y., Takemura Y., Ju-ichi M., Mukainaka T., Ichiishi E., Ito C., Furukawa H., Yano M., Tokuda H., Nishino H., *Cancer Lett.*, **173**, 105–109 (2001).
- 58) Bailya D. G., Malcolm J., Arnold O., Spencer J. D., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 101–110

- (1998).
- 59) Guengerich F. P., Kim D. H., *Carcinogenesis*, **11**, 2275–2279 (1990).
- 60) Guo L.-Q., Taniguchi M., Xiao Y.-Q., Baba K., Ohta T., Yamazoe Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 122–129 (2000).
- 61) Takanaga H., Ohnishi A., Yamada S., Matsuo H., Morimoto S., Shoyama Y., Ohtani H., Sawada Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 230–236 (2000).
- 62) Ikegawa T., Ohtani H., Koyabu N., Ju-ichi M., Iwase Y., Ito C., Furukawa H., Naito M., Tsuruno T., Sawada Y., *Cancer Lett.*, **177**, 89–93 (2002).