

生薬学研究 40 年

正山 征洋

Pharmacognosical Study during 40 Years

Yukihiro SHOYAMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi,
Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received May 17, 2007)

In order to quality control for medicinal plants such as *Aconitum charricoides*, *Rhemannia glutinosa*, *Atractyodes lancea*, *Pinellia ternata*, *Panax species* and *Gentiana scabra* were clonally micropropagated by tip tissue culture and embryogenetic techniques. Monoclonal antibodies against the bioactive compounds contained in the crude drugs were prepared and set up the ELISA as a high sensitive and quick determination method. A newly developed eastern blotting methodology can stain typically the only antigen molecule and the related compounds having a same aglycone. Knock-out extract can be prepared by using an immunoaffinity column conjugated with monoclonal antibody, and its importance has been discussed. Single chain fragment-variable gene against solamargine was cloned and transformed to a host plant, *Solanum chasianum* resulting in the increase of antigen molecule as 2.5 to 3 times. Three biosynthetic enzymes regarding marihuana compounds, THCA-, CBDA-, CBCA-synthases were isolated. THCA-synthase was cloned, over expressed and confirmed its characteristics including FAD combining enzyme, and finally determined the structure by X-ray analysis. The distribution of THCA-synthase was also investigated using its and GFP hybrid gene. We found new functions for saffron like improving learning and memory and LTP for blocking by ethanol. A folk medicine in Taiwan, *Anoectochilus formosanus* was propagated *in vitro* and investigated opening new pharmacological activities in lipid metabolism.

Key words—plant biotechnology; monoclonal antibody; marihuana; plant metabolism; bioactive natural compound

1. はじめに

研究室では生薬由来の2次代謝産物に関する研究が主体をなし、A. 植物バイオテクノロジーを応用した薬用植物の育種研究、B. 活性代謝物に対するモノクローナル抗体 (MAb) の作成とその応用研究及び小型化抗体 (scFV) 遺伝子のクローニングと育種への応用研究、C. 大麻成分の生合成酵素の精製と酵素遺伝子のクローニング等、D. 植物成分の代謝酵素、特に peroxidase や β -glucuronidase の精製、それら遺伝子のクローニングと形質転換による発現、生体防御との関わり、E. 生薬の生理活性成分の研究等を遂行してきた。以下順を追って解説す

る。

2. 植物バイオテクノロジーによる薬用植物の育種研究

わが国では薬用植物の90%以上を輸入しており、それらの約70%は自生種の採取により供給される。このため産地や採取時期、修治による成分の変動が大きく、したがってコンスタントな薬効が得難い。また薬用植物は付加価値が高いため乱獲が進み資源の払底や環境への悪影響が危惧されている。例えば甘草と麻黄は準砂漠地帯に生息するため、乱獲により砂漠の拡大が惹起されているとの見解から、数年前に中国産の甘草と麻黄の輸出が禁止となったことは記憶に新しい。このような情勢を背景に、植物バイオテクノロジーのうち、特に細胞・組織培養を応用した薬用植物の育種研究を行ってきた。トリカブト (附子)¹⁻⁴⁾ アカヤジオウ (地黄)⁵⁻⁷⁾ オケラ類 (朮)^{8,9)} カラスビシャク (半夏)¹⁰⁻¹⁴⁾ *Panax* 属 (人参)¹⁵⁻¹⁸⁾ リンドウ (竜胆)¹⁹⁾

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

現住所：長崎国際大学薬学部 (〒859-3298 佐世保市ハウステンボス町 2825-7)

e-mail: shoyama@niu.ac.jp

本総説は、平成18年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

など主要な薬用植物のクローン増殖を開発した。本稿ではハナトリカブトのクローン増殖について概説する。

2-1. ハナトリカブトのクローン増殖 *Aconitum* 属植物の塊根は附子と称し、鎮痛、強心、利尿、新陳代謝機能の促進などを目標として、八味地黄丸、真武湯など多くの処方に配合される重要な生薬である。成分としては強心作用を有する *hygenamine*, *coryneine* 等、鎮痛作用を有する猛毒成分として *mesaconitine*, *aconitine*, *hypaconitine* 等、さらにこれらのリポ体等が知られている。漢方においては *aconitine* 系アルカロイドの毒性が強いため種々の修治を加え減毒した炮附子や塩附子などの加工附子が用いられる。*Aconitum* 属植物には 2,3,4,5 倍体が存在するため種間で成分変異が多いことが容易に推察される。また、同一種内における含有アルカロイドの変異も極めて大きいと言われており、均質な原料確保が不可欠である。この点から、附子の原料植物の 1 つであるハナトリカブトのマイクロプロパゲーションについて触れてみたい。

茎頂部を各種のホルモン添加区で培養して *multiple shoot* 形成について検討した結果、BA (5 mg/l) 添加培地で培養することにより良好な増殖が認められた。培養を繰り返しても増殖率の低下はみられなかった。

次に本 shoot を分割し、IAA (0.5 mg/l) 添加培地で培養することにより発根し幼圃物が得られた。この幼植物を継代することなく、20°C、暗黒下でさらに 4 週間培養することにより、平均 2 個の *microtuber* (子根) を形成した (Fig. 1)。この子根は栽培期まで 4°C で保存し、播種することにより、斉一な発芽が認められることから、栽培に当たって極めて有用な方法であることが確認された。²⁾

次に薬培養から不定胚を経由して再分化個体を得る方法について触れる。花直前の蕾から無菌的に薬を採取し、2,4-D (5 mg/l)、カイネチン (1 mg/l) 添加区で培養してカルスを形成し、同一の組成培地でカルスを増殖した。2,4-D (1 mg/l) 添加区でカルスから不定胚を誘導した。同一培地で継代培養することにより、不定胚の増殖と shoot の形成も認められた。成熟胚は GA (1 mg/l)-BA (5 mg/l) 添加区で培養することにより発芽し、shoot を形成した。発根は前述の通りである。¹⁾ 茎頂由来のクロー

ン苗を栽培し、その含有アルカロイドを分析した結果クローン増殖により育成した個体は均質化が進んでいることが明らかとなった。本法により、1 茎頂から年間 12000 本のクローン苗を得ることが可能であり、通常の方法では年間 6 倍前後の増殖率なので、2000 倍のスピードで均質化が進むことになる。同様に人參や朮、竜胆等についても均質性を確認した。

一方ウイルスやバクテリアに感染すると生育不良や含有成分の変異等が惹起する。アカヤジオウについて茎頂を用いたクローン増殖により 3 種のウイルスを除去し、ウイルスフリー植物を得た。本苗を栽培したところ収穫量が格段に上昇し、かつ均質化が進むことを確認した (Fig. 2)。⁶⁾

カラスビシャクのクローン増殖の例を示す。本法によると 1 個の塊茎から年間約 10²³ 個のクローン苗が生産可能な方法で、半夏の枯渇の解消、品質の均質化等に十分貢献可能と考える。¹¹⁾

3. 生薬の薬用成分に対すモノクローナル抗体 (MAb) に関する研究

現在、タンパク、ペプチド等の高分子化合物に係わる研究において MAb なしでは研究の遂行は不可能と言っても過言でない。しかし生薬成分のうち低分子化合物に対する MAb の作製例はモルヒネ等医薬品を除いてはほとんど見当たらなかったため、生薬成分に対する MAb の作製研究をスタートさせた。低分子化合物 (ハプテン) がそれ自身では免疫されないためキャリアタンパクと結合させる必要があるが、ハプテン-キャリアタンパクの合成がかならずしも容易ではない。また、ハプテン分子の結合数の確定法も確立されていないこと等が MAb 研究を希薄にしている要因と考えられていた。そこでわれわれはハプテン-キャリアタンパクコンジュゲートの MALDI-TOF Mass による検出 (Fig. 3) とそれによるハプテン数の確定方法を確立し、免疫化を確実なものとした。²⁰⁻²²⁾



正山征洋

昭和 18 年 4 月 21 日中国大連市生。昭和 41 年福岡大学薬学部卒業。昭和 43 年九州大学大学院薬学研究所修士課程修了。同助手。昭和 50 年-51 年 MGH 博士研究員。昭和 53 年九州大学薬学部助教授。平成 3 年同教授。平成 16 年-平成 18 年 同研究院長、薬学部長、薬学部長。平成 19 年 3 月退職、4 月より現職。

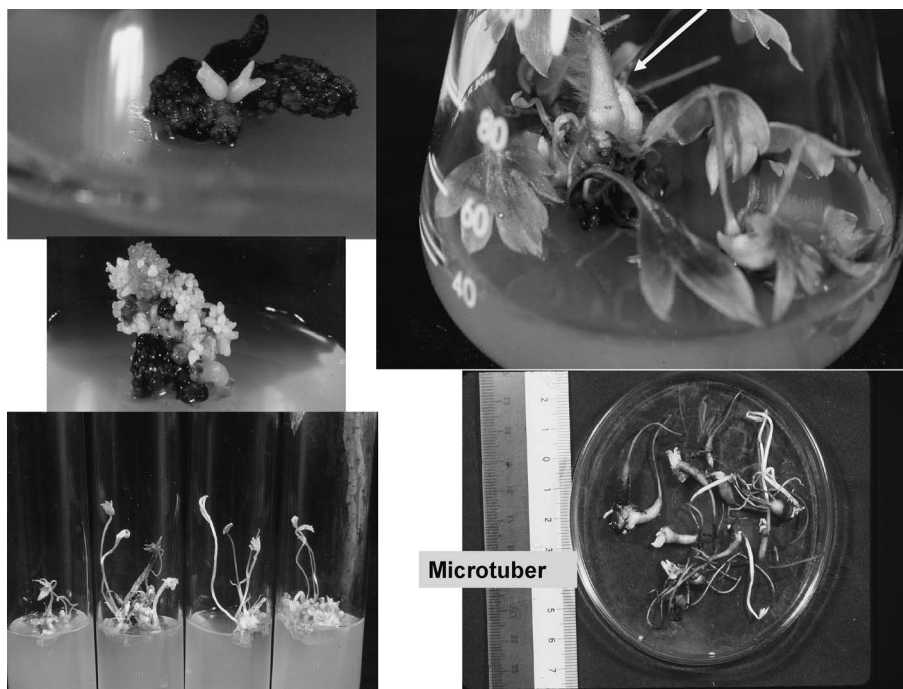


Fig. 1. Micropropagation of *Aconitum charmichaelii* via Embryogenesis

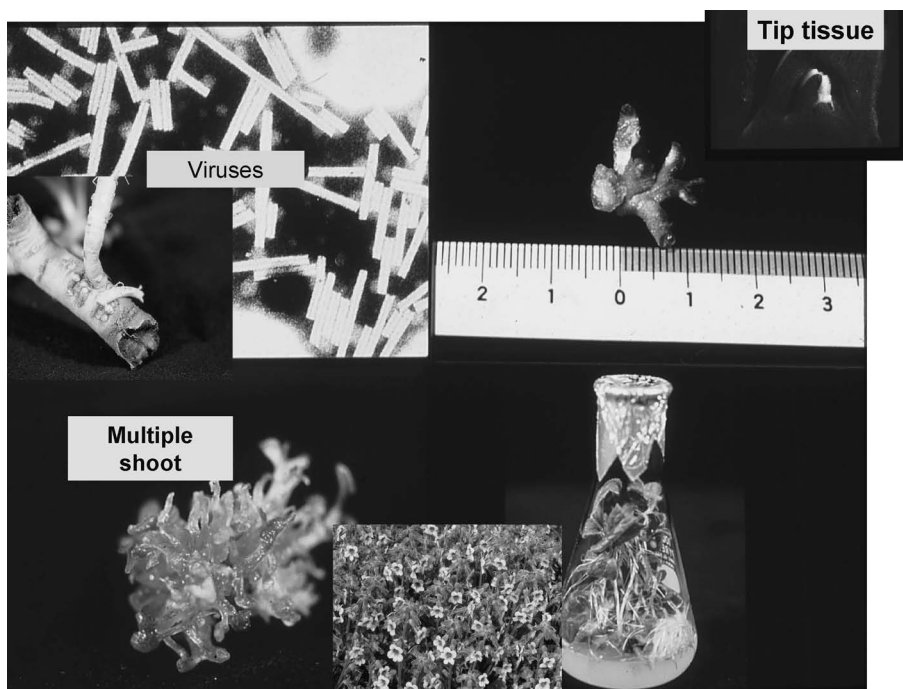


Fig. 2. Micropropagation of *Rhemannia glutinosa* via Tip Tissue Culture

薬用成分として forskolin,²³⁾ 大麻成分,²⁴⁾ アヘンアルカロイド²⁵⁾等のほかに通常分析に手間が掛かる薬理活性配糖体に的を絞り開発を進めてきた。現在までにステロイドアルカロイド配糖体である solamargine,²⁶⁾ 薬用人参の ginsenoside Rb1,²⁷⁾ Rg1,²⁸⁾

Re,²⁹⁾ 甘草の glycyrrhizin,³⁰⁾ サフランの crocin,³¹⁾ 大黄の sennoside A,³²⁾ B,³³⁾ 柴胡の saikosaponin a,³⁴⁾ berberine,³⁵⁾ 芍薬の paeoniflorin³⁶⁾ 等に対する MAb を作成し、高感度の競合的 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を確立した。ま

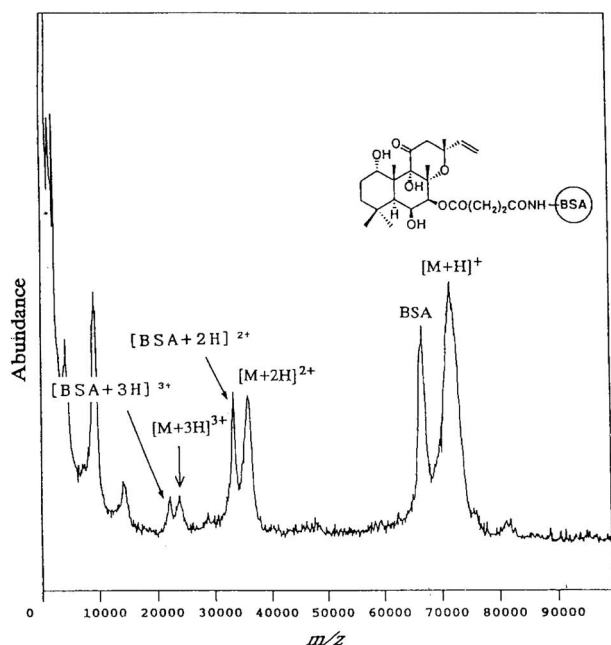


Fig. 3. MALD-TOF Mass Spectrum of Forskolin-BSA Conjugate

た、その応用面としてイースタンブロットイングと命名した抗体染色法を開発した。³⁷⁻⁴²⁾ また、配糖体のワンステップ単離が可能なイムノアフィニティーカラムを開発した。⁴³⁾ さらに小型化抗体遺伝子をクローニングし、このものを宿主植物へ導入し有効成分の高含有種の作出にも成功した。⁴⁴⁾

3-1. 高感度、再現性良好な競合的 ELISA の開発 人参には特殊なダマンラン骨格をアグリコンとする配糖体 ginsenoside 類が含まれており、多様な活性が見出されている。2つの代表的な配糖体である ginsenoside Rb1 (中枢抑制) と Rg1 (中枢興奮)、また抗糖尿病活性作用がみついている Re 等を選び MAb を作製しそれぞれの競合的 ELISA を確立した。Ginsenoside Rb1 は 20–400 ng/ml の検量域で良好な直線性を示している。²⁷⁾ Ginsenoside Rg1 についてもほぼ同様な結果が得られた。²⁸⁾ Table 1 は坑 ginsenoside Rb1MAb に対する他の ginsenoside 類やステロイド化合物の親和性を示したものである。Ginsenoside Rc, Rd にわずかな交差反応性がみられるもののほかの化合物には認められなかった。坑 ginsenoside Rg1MAb もほぼ同様であった。このことから2つの MAb は極めて特異性の高い MAb である。本法は従来の HPLC とよい相関を持つとともになんら前処理を必要とせず、再現性

Table 1. Cross-reactivities of MAb against Ginsenoside Rb1

| Compound | Cross-reactivities (%) |
|---------------------|------------------------|
| Ginsenoside Rb1 | 100 |
| Ginsenoside Rc | 0.024 |
| Ginsenoside Rd | 0.020 |
| Ginsenoside Re | <0.005 |
| Ginsenoside Rg1 | <0.005 |
| Glycyrrhizin | <0.005 |
| Gigitonin | <0.005 |
| Tigogenin | <0.005 |
| Tigonin | <0.005 |
| Gitogenin | <0.005 |
| Digitonin | <0.005 |
| Solamargine | <0.005 |
| Solasonine | <0.005 |
| Cholesterol | <0.005 |
| Ergosterol | <0.005 |
| Ulsolic acid | <0.005 |
| β -Sitosterol | <0.005 |
| Cholic acid | <0.005 |
| Deoxycholic acid | <0.005 |

The cross-reactivities of ginsenosides were determined according to Weiler's equation (Weiler *et al.*, 1976; see Materials and methods section).

良好で感度の面でも HPLC に比べ数百倍高いことが明らかとなった。一方、ginsenoside Re は幅広い親和性を持つ MAb であることが判明したので、²⁹⁾ トータル ginsenoside 分析用に応用可能である。

3-2. イースタンブロットイング 高分子化合物に対するウエスタンブロットイングは必須のツールであるが、低分子化合物に対しては不可能と考えられてきた。われわれは solasodine 配糖体に対してウエスタンブロットイングに準じた染色に初めて成功し、³⁷⁾ イースタンブロットイングと命名した。⁴²⁾ 本稿では ginsenoside について説明する。

2枚の TLC を用いて人参粗エキスを *n*-BuOH-EtOAc-H₂O 系展開溶媒で展開する。1枚の TLC に吸着膜 (PVDF 膜) を被い、ブロットイング液を噴霧後数十秒から数分間 120°C 程度の熱をかけると全成分が膜へと移行する。しかしこのままの状態だと洗浄操作中にサポニンが流失して発色するには至らない。そこで膜を NaIO₄ 液と処理することによりサポニンの糖鎖を酸化的に開環する。そこへタンパクを加えシッフベースを形成し膜への吸着能を付与する。次に坑 ginsenoside Rb1MAb で処理し、標識 2 次抗体、基質を順次添加して反応することによ

り ginsenoside Rb1 が発色することを見出した.³⁹⁾

Figure 4 に本法の原理を模式化した.

Figure 6 は各種漢方薬のイースタンブロットイングである. TLC 上硫酸と加熱することによりすべての化合物が発色するが (Fig. 5 左), イースタンブロットイングによると人參特有の ginsenoside 類のみが発色する (Fig. 5 右). 実は ginsenoside Rb1MAb は Table 1 に示す通り極めて特異性が高い. ところが本イースタンブロットイングによると ginsenoside Rb1 のみでなく, その他の ginsenoside Rc, Rd 等も発色する. これは MAb が糖鎖の一部を認識していたにも係わらず ginsenoside 類の糖鎖を開環したために, 特異性がルーズになり交差性が広がったものと認識している.

人參のサポニンにはプロトパナクサジオール系とプロトパナクサトリオール系があり, 前述の通りそれぞれ特徴のある薬理活性を有しているの, 各種人參の薬効を予測するためにもどちらの系のサポニンが多く含有するのかを調査する必要がある. また, 資源探索を人參以外の植物に求める場合もある. このような場合, ジオール系とトリオール系サポニンそれぞれに対する MAb を作製しているの

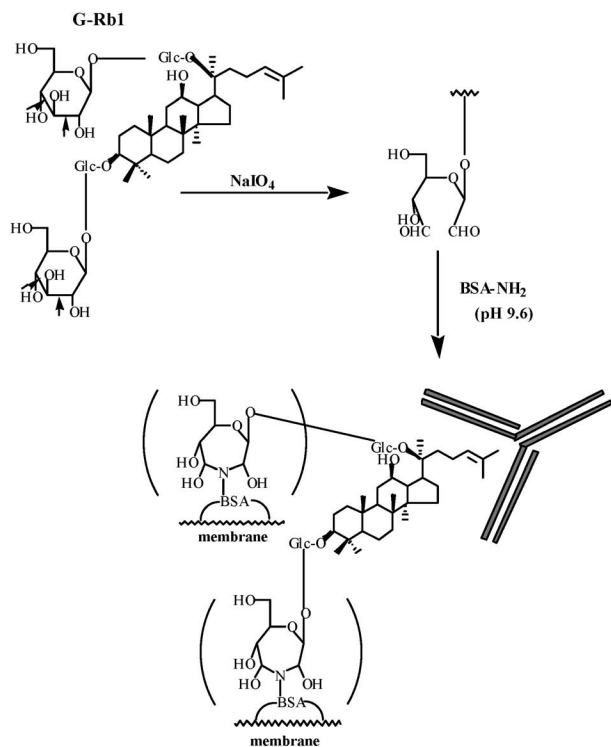


Fig. 4. Scheme of Eastern Blotting for Ginsenoside Rb1 Using Anti-ginsenoside Rb1 Monoclonal Antibody

で, 標識 2 次抗体の標識酵素と基質を変えて染色することにより, 異なる色彩のバンドが得られる. 一方坑 ginsenoside Rg1MAb を用いて上記と同様なエキスの ginsenoside 類をイースタンブロットイングで染色した. Ginsenoside Rg1 と ginsenoside Re はクリヤーに赤色に染色されるがその他の ginsenoside 類は染色されないことが明らかとなった. 坑 ginsenoside Rg1MAb と坑 ginsenoside Rb1 MAb を比べると前者がより特異性が高い. これは 3 位にフリー水酸基を持つ ginsenoside Rg1 に免疫された

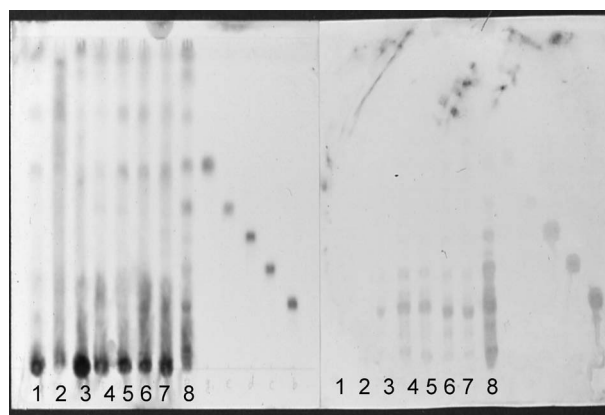


Fig. 5. Eastern Blotting of Kampo Medicines
Line 1: Kikyoto, 2: Daisaikoto, 3: Ninjin'yoeito, 4: Shikunshito, 5: Ninjinto, 6: Hangeshashinto, 7: Shosaikoto, 8: Crude extract of ginseng. Standards of ginsenosides indicated ginsenoside Rg1, Re, Rd, Rc and Rb1 from upper.

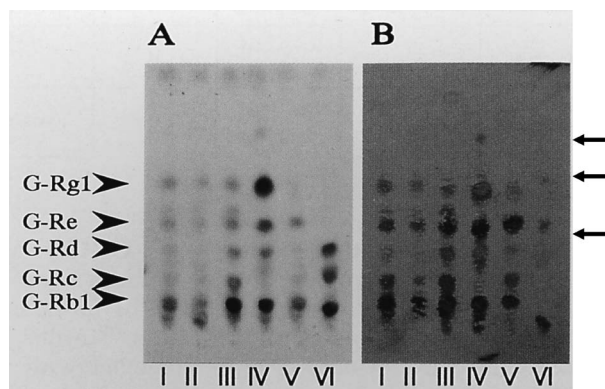


Fig. 6. Double Staining of Eastern Blotting for Ginsenosides Contained in Various Ginseng Using Anti-G-Rb1 and Anti-G-Rg1 Monoclonal Antibodies
A: TLC profile stained by sulfuric acid. TLC was performed on a precoated silica gel plate (Merck) developing with *n*-BuOH-EtOAc-H₂O (15 : 1 : 4, upper phase). Spots were detected by spraying 10% H₂SO₄. B: Eastern blotting by anti-G-Rb1 and anti-G-Rg1 monoclonal antibodies. G abbreviated ginsenoside. I, II, III, IV, V and VI indicated white ginseng, red ginseng, fibrous ginseng (*Panax ginseng*), *Panax notoginseng*, *Panax quinquefolius* and *Panax japonicus*, respectively. Upper purple color spots and lower blue color spots were stained by anti-G-Rg1 and anti-G-Rb1 monoclonal antibodies, respectively.

MAb は 3 位に糖鎖をもつジオール系の ginsenoside 類とは親和性がないことが容易に理解できる。

次に抗 ginsenoside Rb1 MAb と ginsenoside Rg1 MAb により基質を 2 種類用いて 2 重染色を行ったところ、ジオール系が青紫色でトリオール系が赤色に染色された (Fig. 6).³⁹⁾ なお、左はシリカゲル TLC を硫酸で発色したもので各 ginsenoside による発色の違いは認められない。右図の 2 重染色のプロファイルから次のような情報が得られる。1) 青紫色スポットはプロトパナクサジオール系の ginsenoside 類を示す。2) 赤く発色しているスポットはプロトパナクサトリオール系の ginsenoside 類である。3) Rf 値から結合している糖の数を類推することが可能。4) 人參の種類によって ginsenoside 類の含量が異なっており、IV (田七人參) は ginsenoside Rg1 含量が高く、V (アメリカ人參) は ginsenoside Re が多い特異な人參で、VI (竹節人參) は ginsenoside 類含量の低い人參である。

以上の情報を基に矢印を付けた 3 種のマイナーな ginsenoside 類についてその構造を推定した。赤色からいずれもアグリコンはプロトパナクサトリオールである。Rf が一番高い ginsenoside は 2 糖である ginsenoside Rg1 よりも糖の数が少ないことから、1 糖の ginsenoside Rh1 と推定できる。真ん中の ginsenoside は 2 つの糖を持っていることが容易に推察される。一番下の矢印は 3 糖を持つ ginsenoside と言える。これらのデータと文献との比較検討から、上から ginsenoside Rh1, ginsenoside Rf 及び 20-gluco-ginsenoside Rf であることが明らかとなった。以上のように色彩と Rf 値を比較検討することによりアグリコンがいずれの系に属し、糖鎖がどれだけのサポニンであるかということが簡単に予測され、構造決定に費やすエネルギーが格段に少なくなるであろう。

もう 1 つの応用例は次の通りである。新鮮な人參切片に PVDF 膜を覆って溶出成分を吸着する。この膜を前記の通り抗 ginsenoside Rb1 MAb を用いてイースタンプロットイングした (Fig. 7)。Ginsenoside 類は皮層部に多く、中心の柔組織には少ないことが分かり、ginsenoside 類の分布が如実に示されることが明らかとなった。人參のほかに大黃の sennoside 類、*Solanum* 属植物の solasodine 配糖体、甘草の glycyrrhizin、柴胡の saikosaponin 類に

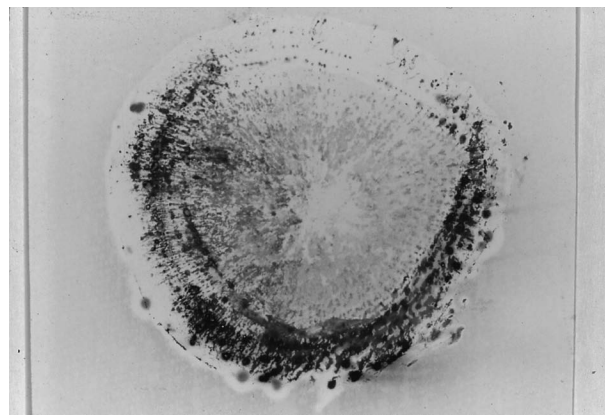


Fig. 7. Immunolocalization of G-Rb1 in Fresh Ginseng Using Anti-G-Rb1 Monoclonal Antibody

Table 2. Saikosaponin Concentration in Bupleuri Radix and Kampo Medicines by NIH Imaging and ELISA Analyses

| Sample | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight powder) | | | | | | |
|----------------------------|---|------|------------------|------|-------|-------|-------|
| | NIH Imaging | | | | | ELISA | |
| | SSa | SSc | SSb ₂ | SSd | Total | SSa | Total |
| Bupleuri radix (Mishima) | 5.21 | 1.48 | ND | 4.82 | 11.51 | 5.62 | 9.75 |
| Bupleuri radix (Austria) | 7.65 | 1.35 | ND | 1.55 | 10.55 | 7.90 | 8.94 |
| Dai-saiko-to | 0.63 | 0.19 | (+) | ND | 0.82 | 0.62 | 1.06 |
| Sho-saiko-to | 0.80 | 0.22 | (+) | ND | 1.02 | 0.76 | 1.19 |
| Saiko-kyoyo-to | 0.69 | 0.13 | (+) | ND | 0.82 | 0.68 | 1.13 |
| Saiko-ka-ryukotsu-borei-to | 0.83 | 0.23 | (+) | 0.19 | 1.25 | 0.89 | 1.43 |
| Sho-seiryu-to | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, ND: not detectable. Data are the means of triplicate assays.

ついても同様に配糖体の分布状況を知ることができする方法を開発した。

以上は PVDF 膜を用いる抗体染色であるが、現在は PVDF からポリエーテルスルホン (PES) に換えて研究を継続している。本方は TLC からの転写の必要がなく、直接 PES 膜で化合物を展開し、その膜を染色する方法が可能となった。このことにより転写効率を考慮する必要がなく、したがって定量分析をも可能とした。なお、発色したバンドは NIH イメージングソフトを用いて数値化して、定量値を算出している。

柴胡の柴胡サポニンをイースタンプロットにより定量分析した。Table 2 は本方により定量した結果

であり、HPLCの定量値とよく一致している。⁴⁵⁾

3-3. イムノアフィニティークロマトグラフィーによるワンステップ分離とノックアウトエキスの調整

イムノアフィニティークロマトグラフィーはリガンドと対象となる高分子化合物との親和性によってワンステップの分離が可能なのが特徴である。現在は色々な工夫がなされたイムノアフィニティークラムが市販されている。あとで触れるが、組み換えタンパクでは色々な標識(タグ)を施すので、それらのタグに対する抗体を装着したカラムが作られている。一般に抗体の精製にはProteinG等のアフィニティークラムが、酵素には補酵素や基質、阻害剤等のリガンドを装着したアフィニティークラムが機能する。同様に抗原の精製には抗体が用いられるのは周知の事実である。特にタンパクの場合アミノ酸配列の一部に相当するペプチドを合成し、このものに対するMAbを作製して、このものをリガンドとし、目的とするタンパクの精製に応用可能である。本稿では上記のように分子量の大きな化合物ではなく1000以下の化合物について取り上げてみることにする。天然物一般にそうであるように多数の類似化合物が混在するため、精製には通常のカラムクロマトを繰り返すか、HPLC等で繰り返し精製・分取するほかに手だてがない。このような天然物の一例として前述のginsenoside類について触れる。⁴³⁾

一方で糖鎖は必要なくアグリコンだけが必要な場合もある。このような場合はアグリコンを認識し、糖鎖に関してはラフに認識する、すなわち幅広いcross-reactivityを持つMAbを作製する必要がある。この代表としてsolasodine配糖体について述べる。⁴⁶⁾

上記の坑ginsenoside Rb1MAbをアガロースゲルに結合し、イムノアフィニティークラムを作製、カラムに充填しイムノアフィニティークロマトグラフィーを作製した。このものを用いて適切な溶離液で溶出することによりginsenoside Rb1のワンステップ単離を可能とした。¹⁶⁾

人参の粗エキスをイムノアフィニティークロマトグラフィーに付しバッファー中で抗原抗体反応を行う。この間にginsenoside Rb1はカラムの抗体部分へ結合する。一方ginsenoside Rb1以外の成分はカラムへ結合することはない。洗浄溶媒として調製し

た食塩含有フォスフェートバッファーで洗浄すると大過剰のginsenoside Rb1とそれ以外の成分が溶出する。洗浄が完結したあとにイソチアン酸カリとメタノールを含有する酢酸バッファーを溶出溶媒として溶出する。ポイドボリュウムに大過剰のginsenoside Rb1及びそれ以外のすべての化合物が溶出してくる。完全に洗浄後溶出溶媒によりワンピークとして溶出してくる。この溶出パターンを上述のイースタンブロットティングで検証すると、洗浄フラクションにはオーバーチャージのginsenoside Rb1や他のginsenoside類、さらにアグリコンの異なるサポニン類も溶出している。

一方溶出フラクションにはginsenoside Rb1とmalonyl ginsenoside Rb1が溶出している。Malonyl ginsenoside Rb1はginsenoside Rb1の約60%に相当する交差性を持っていることが判明したので、本化合物がginsenoside Rb1と同様な挙動を示したものと推察される。なお、malonyl ginsenoside Rb1を含むginsenoside Rb1フラクションは弱いアルカリ溶液と加熱することにより容易にginsenoside Rb1へと変換した。よってワンステップで純粋なginsenoside Rb1が得られたことになる。40種以上存在する人参サポニンの中から特定の成分を単離することは容易ではないが、本法は純粋なサンプルが必要なときに威力を発揮している。またginsenosideの定量にELISAを実施しているが、人参サポニン投与後の血清中の含量は極く微量である。かかる場合もアフィニティークラムにより濃縮後ELISAによる定量が可能である。なお、本カラムは10回程度の使用による活性の低下はなく連続使用を可能とする。前述の洗浄溶媒で溶出する画分を繰り返し精製することによりginsenoside RcとRdが分離することが明らかとなった。これは両者がそれぞれ0.024, 0.02というわずかなcross-reactivityを持つことから他の成分と分離したものと考えられる。ここにもMAbの威力を感じずにはいられない。

上記のフラクションを別な観点から眺めてみると、洗浄フラクションと溶出フラクションを比較したのがFig. 8である。ライン1は人参粗エキスである。ライン2は洗浄フラクションである。ライン3は上記の通りワンステップで単離したginsenoside Rb1である。粗エキスと洗浄フラクションを比較すると、洗浄フラクションにはginsenoside Rb1の

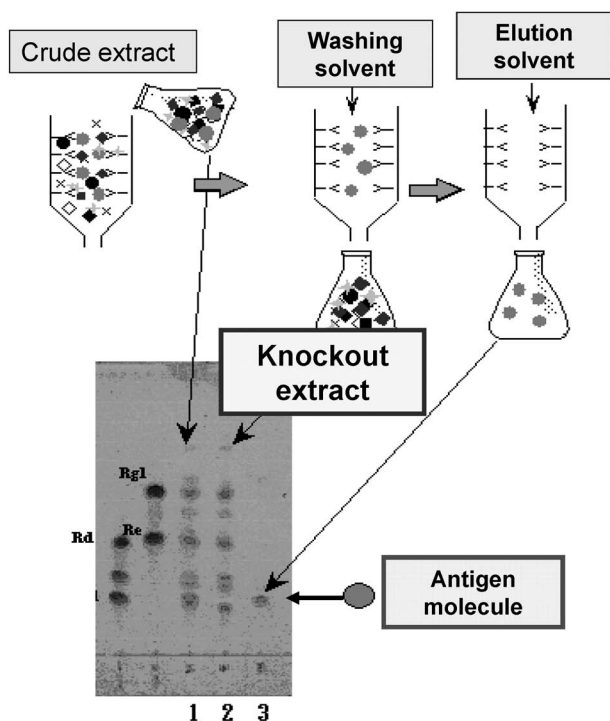


Fig. 8. Preparation of Knockout Extract from Ginseng Crude Extract

みが除かれていることが判る。これはあたかもノックアウト遺伝子を彷彿させる。このため本フラクションをノックアウトエキスと命名した。このようなエキスの調整は通常は不可能である。すなわち各種クロマトを繰り返していると組成が変わり真のノックアウトエキスは得られない。本ノックアウトエキスは真の活性成分を探索する場合に重要な役割を果たすことは明らかである。⁴⁷⁾

一方クロスリアクションの広い MAb を用いて関連化合物を濃縮することもある。例えばインドネシア等でステロイドホルモンの原料として用いられている solasodine 配糖体の場合、糖鎖には関係なくアグリコンである全 solasodine を得ることが必要となる。このような場合は cross-reactivity の広い MAb を用いることにより全 solasodine 配糖体を分離することが可能である。 *Solanum khasianum* 果実の粗エキスを cross-reactivity の広い抗 solamargine MAb を装着したアフィニティークラムで分離した各フラクションをイースタンブロットティングにより検出した。洗浄溶媒にて過剰の solasodine 配糖体が溶出している。次に溶出が認められなくなったので溶出溶媒を加えて全 solasodine 配糖体を溶

出した。明らかに 3 種の solasodine 配糖体が一度に溶出してくることが明らかとなった。⁴⁶⁾

以上の通り特異的な成分をターゲットとする場合は交差性の狭い特異的な MAb をデザインしなくてはならない。一方アグリコンを必要とする場合はアグリコンのみを認識し糖鎖は認識しない MAb のデザインが要求される。本稿では紹介しないが MAb 装着イムノアフィニティークロマトグラフィーは光学分割にも威力を発揮する。また、立体特異的な不斉合成等に抗体触媒が用いられているが、このような抗体を装着したイムノアフィニティークロマトグラフィーは触媒反応と同時に分離カラムとしても応用可能であろう。われわれは立体異性体の例として大黄の senoside A, B に対するそれぞれの MAb を作製し、相互に立体特異性が極めて高いことを明らかにしている。^{32,33)}

3-4. 小型化抗体 Single Chain Fragment-variable (scFV) の作成とその応用 先に cross-reactivity の幅広い代表として抗 solamargine MAb について述べたが、このものの scFV が先行しているので解説する。⁴⁴⁾

定法通り、抗 solamargine MAb 産生ハイブリドーマから RNA を抽出、cDNA とし、vH, vL を PCR で増幅しリンカーにより結合し、大腸菌へ組み替え scFV をクローニングする。scFV 遺伝子の配列を確かめ (Fig. 9)、発現ベクターへ組み込みタンパクの発現を行う。インクルージョンボディとして発現されるので、可溶化後 His タグアフィニティークラムで精製しながら巻き戻し、活性のあるタンパクとする。精製タンパクはウエスタンブロットティング、MALDI-TOF Mass 等で純度を確かめた。本発現システムによると 100 ml の培地当たり 12 mg のタンパクが得られる。本 scFV タンパクは抗 solamargine MAb と比較してほとんど同様な親和性を持っていることが明らかとなり、ELISA その他に威力を発揮する。

次に宿主植物である *Solanum khasianum* へ scFV 遺伝子を直接導入することは不可能なため、*Agrobacterium rhizogenes* を介して *S. khasianum* への形質転換を行った。ヘアリールートを生じたクローンを選別し、scFV 産生クローンを得る。それぞれのポジティブクローンを培養し、生産した scFV タンパクを精製し、ウエスタンブロッテ

ATGGCCAGGTGCAACTGCAGGAGTCAGGACCTGAACTGGTGAAGCCT
M A Q V Q L Q E S G P E L V K P

GGGGCTTCTGTGAAGATATCCTGCAAGACTCTGGATACACATTCCT
G A S V K I S C K T S G Y T F T

GGAAACCTCATACACTGGGTGCAGCAGAGTCTGGAAAGAGCCTTGAG
G N L I H W V Q Q S P G K S L E

HCDR1
TGGATTGGACATATAAATCCTAACAATGGTGGTACTGTCTACAACCAG
W I G H I N P N N G G T V Y N Q

HCDR2
AAGTTCACGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTTATCCAACACA
K F T G K A T L T V D K L S N T

GCCACATGGAGTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATCCGCAGTCTAT
A H M E F R S L T S E D S A V Y

TACTGTGCAAGATCGGGACGTGACTACCCTTACTGGGGCCAAGGGATC
Y C A R S G R D Y P Y W G Q G I

HCDR3
ACGGTACCGTCTCCTCAGGTGGAGGGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCT
T V T V S S G G G S G G G S

Linker
GGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAAAATCATG
G G G G S D I E L T Q S P K L M

TCTACATTAGTAGGAGACAGGGTCAAGGCCAGTCTCAG
S T L V G D R V S V T C K A S Q

LCDR1
AAATGATTTAGTCATGTAGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGGCAATCT
N V F S H V A W Y Q Q K P G Q S

LCDR2
CCTAAAGCATTGATTATTCGACATCCAACCGGTACAGTGGAGTCCCT
P K A L I Y S T S N R Y S G V P

LCDR3
GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATC
D R F T G S G S G T D F T L T I

AGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAATATTTCTGTCAGCAATAT
S N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y

AACACCTATCCGTACACGTTTCGGCGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
N T Y P Y T F G G G T K L E L K

CGG
R

Fig. 9. Nucleotide and Deduced Amino-acid Sequences of Anti-solamargine Single Chain Fragment-variable Antibody
Linker fragment is shown in *italics*. Nucleotide sequences encoding respective complementarity determining regions (CDRs) are underlined.

イング (Fig.10) と MALDI-TOF Mass (Fig.11) により精製度を確かめると同時にその分子量からアミノ酸シーケンスが正しいことを確認した。

一方 solasodine 配糖体を ELISA により分析した結果、ワイルドタイプの *A. rhizogenes* で感染して生じたヘアリールート及び再分化植物を比べたところ、scFV 遺伝子を導入したヘアリールート及び再分化植物は 2.5-3 倍の solasodine 配糖体を含有することが明らかとなった (Fig. 12)。当然ながら Fig. 13 に示す通り scFV タンパク量と比例している。このことから植物体内で scFV タンパクはハプテン分子と抗原抗体反応を行い、コンプレックスが不活化し系外へ排除され、この結果 solasodine 配糖体の生合成経路が正の方向へ進むものと考えている。本法は抗体を用いたミサイル療法に類似するためミサ

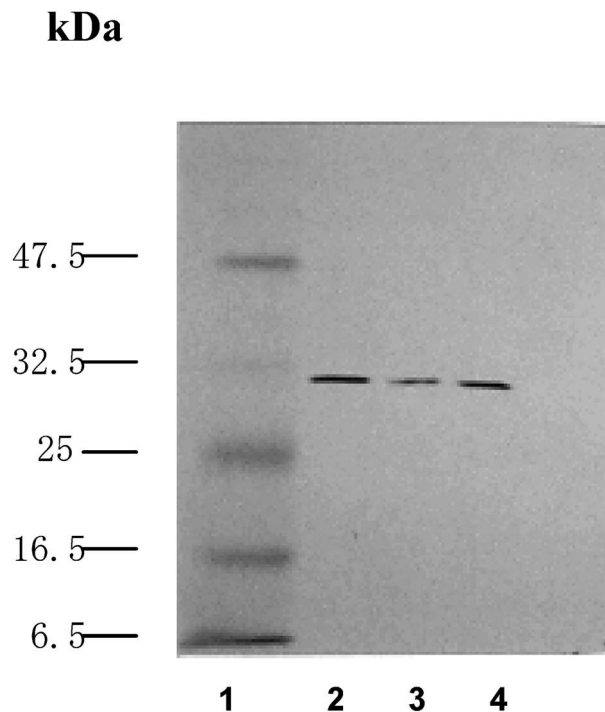


Fig. 10. Determination of scFv Protein in Transgenic Plant by Western Blotting

Lines 1 to 4 are protein molecular weight markers, scFv from *E. coli*, affinity-purified scFv from hairy root clone, affinity-purified scFv from transgenic plant, respectively.

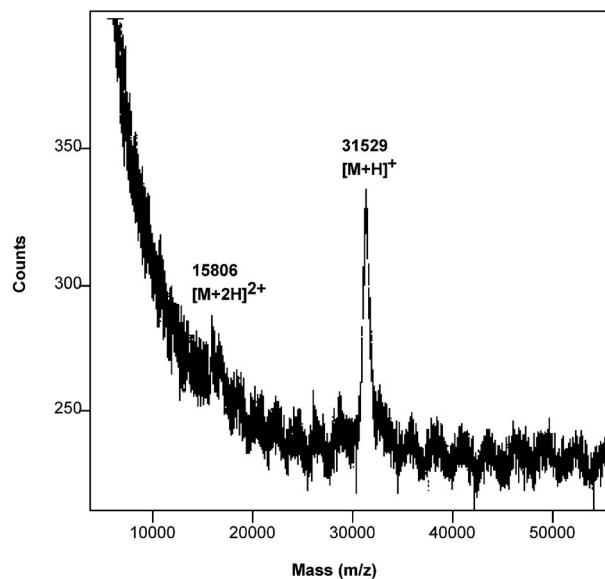
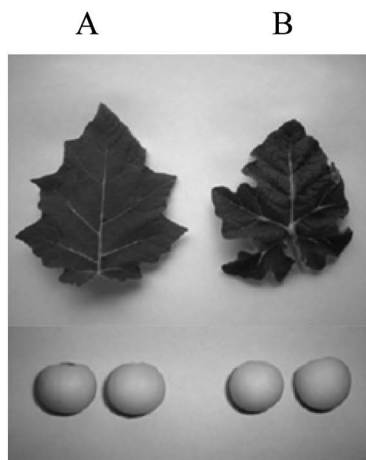


Fig. 11. MALDI-tof Mass Spectrometry of Anti-solamargine scFv

イル型分子育種法と命名した。

3-5. 分析キットの開発 われわれはフィールドでの研究も少なくないので、コンパクトでかつ特異性の高い分析キットの開発が望まれる。Figure 14



| Solasodine glycosides | μg/g dry wt. |
|-------------------------|-------------------------------|
| <i>Control</i> | |
| Leaf | 54.50 ± 2.08 |
| Fruit | 53.43 ± 3.90x10 ³ |
| <i>Transgenic plant</i> | |
| Leaf | 144.48 ± 4.64 |
| Fruit | 126.95 ± 6.03x10 ³ |

Leaf and fruit of control (A) and transgenic plant (B)

Fig. 12. Comparison of Solasodine Glycosides in Wild and Transgenic Leaf and Fruit of *Solanum khasianum*

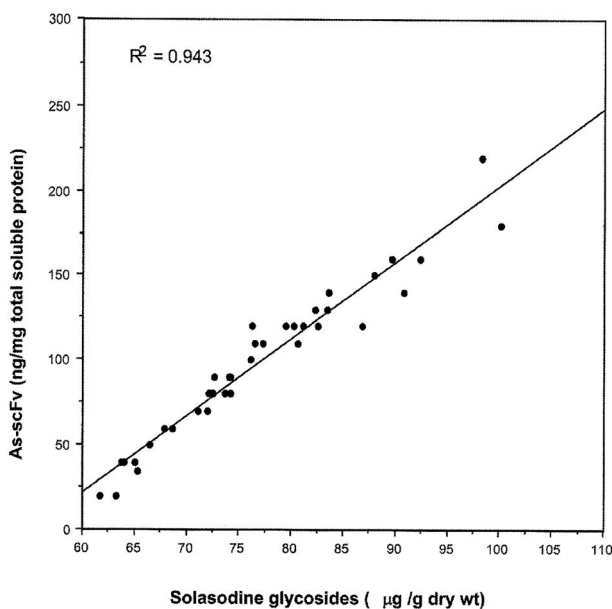


Fig. 13. Comparison of Solasodine Glycoside Concentrations from Hairy Root Clones and scFv Expression Levels

はセンナや大黄に含まれる sennoside A, B を対象としたキットである。⁴⁸⁾ 本方では検出に金コロイドを用いている。sennosideA, B それぞれのヒト血清アルブミン (HSA) コンプレックスを固層化し、サンプル中の sennosideA, B と添加する金コロイド結合抗 sennosideA 及び抗 sennosideBMAb との間で競合が起き、sennosideA 及び B 含量が少ない場合、両金コロイド結合 MAb が固層化抗原上にトラップされ、赤い色となる。本方は残念ながら競合法

なので含量が高いと発色せず、含量が低い場合や含有しないときに発色するため、イメージが逆となるので、願わくば競合でなく直接法で発色したいと考えている。このほかに ginsenoside 類,⁵⁰⁾ glycyrrhizin⁴⁹⁾ についても同様に作製した。

以上の成果を基に平成 13 年度から 3 年間、JST のサポートによる「実用化のための育成研究」プロジェクトに「モノクローナル抗体を基盤とした薬用成分分析キット及びイースタンプロット法の開発研究」が採択され、ポスドク 2 名、研究者 2 名の計 5 名体制で研究を行ってきた。これらの研究を統合して、分析キットの作製・販売を行っている企業へ技術移転され、産学連携事業がスタートしている。⁵¹⁾

4. 大麻に関する研究

4-1. 無毒大麻の育種研究 大麻には特異な構造を持つカンナビノイド (CN) と称する一連の成分が 70 種以上単離構造決定されている。Figure 1 に新鮮なアサに含有する主 CN を示した。また、外形は同じでも、CN が全く異なる品種があり、これらを生理品種と称する。これらのうち麻酔性、幻覚性を持つのが tetrahydrocannabinol (THC) である。THC のカルボン酸タイプの存在が予想されていたが単離されていなかった。このものの単離構造決定に初めて成功したのが 1967 年である。⁵²⁾ アサの研究を始めた当時は大麻禍が激増期だったので厚生省、栃木県との共同研究で活性を持たないアサの育種からスタートし、8 年間に要して THCA をほと

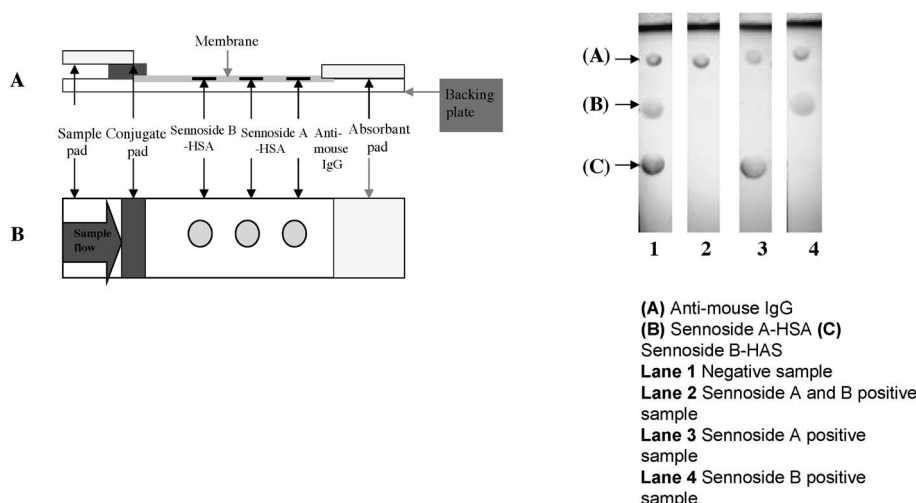


Fig. 14. Schematic of an Immunochromatographic Strip Test

A: Cross-section, B: Top view and immunochromatographic strip test of sennoside A and B. (A): Anti-mouse IgG.

んど含まず cannabidiolic acid (CBDA) を主 CN とする CBDA 種 (無毒大麻) を育成し, さらに繊維としても使用に耐える品種「とちぎしろ」として品種登録するに至った. 本品種は日本全国の栽培農家に在来種に替えて栽培することが義務付けられに至った. また, 近年 CBD の薬理作用が詳細に研究されつつあり, CBD の原料供給にも寄与できると言えよう.

4-2. CN の生合成酵素に関する研究 1970-1980 年代はトレーサーを用いた植物成分の生合成研究が全盛期を迎えた時代だったので, 大麻成分についても研究を行って大麻成分が酢酸・マロン酸経路とメバロン酸経路から生合成されることを明らかにした.^{53,54)}

脳とマクロファージから CN に対する 2 種のレセプター (CB1, CB2)^{55,56)} 及び 2 種の内在性リガンド (anandamide, 2-arachidonyl glyceride)^{57,58)} が発見され, CN が有力な医薬素材と考えられるようになってきた.

そこで CN 高含有品種の作出やアサの 2 生理品種の成因解明を目的として, 3 種の CN 生合成酵素, THCA synthase,⁵⁹⁾ CBDA synthase,⁶⁰⁾ カンナビクロメン酸 (CBCA) synthase^{61,62)} を精製した. これらのうち一番最初に精製した THCA synthase について概説する.

先にも述べたがアサには 2 種の生理種があり CN の質的量的異変が大で, また成育期によっても CN の変動が極めて大きいことを明らかにしているの

で, 酸素の精製にも適した材料を吟味する必要がある. THCA synthase に関しては当然ながら THCA をメジャーとして含有する THCA 種であるメキシコ種を選んだ. また幼若葉と成熟葉では前者の活性が 4 倍近く高いことからメキシコ種の 3 週齢葉を材料とし phosphate buffer (pH 7.0) で抽出した. 粗酵素液を遠心後 Table 3 に示す精製ステップにより SDS-PAGE において THCA synthase をワンバンドまで精製することに成功した.

本酵素の性質について検討した. pH6 前後で最も活性が高いことが判明した. 次に各種金属イオンの要求性を調べたところ, いかなる金属イオンも活性に影響しないことが明らかとなった. また NAD, NADP, FAD, FMN 等補酵素類もなら活性には影響しなかった. THCA synthase は oxydoreductase と考えられるので以下の検討を行ったが, H₂O₂ や分子状の酸素を要求せず, P-450 インヒビターによる酵素阻害も認められなかった. さらにラジカル除去剤も活性に影響しなかった. 以上の結果から本酵素は dehydrogenase であると推察される. しかし前述のごとく NAD, NADP, FAD, FMN 等の補酵素を要求しないことから通常の dehydrogenase とは大きく異なっていることが推察された.

同様に CBDA synthase と CBCA synthase を CBDA 種の幼若葉から抽出精製した. これら両酵素のうち前者は THCA synthase と性質が極めて類似していることが判明した. 一方 CBCA synthase は類似の性質を持っているが分子量は約倍で, 2 量体酵素で

Table 3. THCA synthase Activity under Purification Steps

| Purification step | Total activity (pkat) | Protein (mg) | Specific activity (pkat/mg protein) | Purification (fold) | Yield (%) |
|---|-----------------------|--------------|-------------------------------------|---------------------|-----------|
| Crude extract | 3635 | 664 | 5.47 | 1 | 100 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 70–90% sat. | 2888 | 47.3 | 61.1 | 11 | 79 |
| DE-52 | 1437 | 1.58 | 909 | 166 | 40 |
| Phenyl Sepharose CL-4B | 783 | 0.487 | 1608 | 293 | 22 |
| Hydroxylapatite | 332 | 0.171 | 1942 | 354 | 9.1 |

あることが明らかとなった。これらの諸性質については紙面の関係で割愛する。ただし CBCAsynthase については興味ある反応を触媒することが分かったのでこの点について触れる。

CBCAsynthase により生成する CBCA は旋光度がないことからラセミ体と考えられていた。ところが CBCA を CBCAsynthase により反応して得られた CBCA と合成により得られた CBCA を比較したところ CD スペクトルが異なっていることが明らかとなった。Figure 15 (A) は合成して得られた CBCA を脱炭酸により得たカンナビクロメン (CBC) をキラル HPLC で分析した結果で、ほぼ等価の 2 つのピークがみられる。一方 Fig. 15 (B) は酵素反応により得られた CBCA を脱炭酸した CBC である。エナンチオマーが 5 : 1 の割合で混在している。そこでそれぞれのエナンチオマーを分取し CD スペクトルを測定した。この結果アサから単離した CBC の CD スペクトルは酵素反応で得られたスペクトルと一致した。以上の結果から CBCA は CBGA から CBCAsynthase により 5 : 1 のエナンチオ選択的に生合成されることが明らかになった。なお 3 位の立体配置については目下検討中である。

酵素は大変特異性が高いのが普通であるが、CBCAsynthase は特異性が低い酵素で基質を変えても触媒できることが分かった。目下クローニング中なので、ポイントミュテーションにより活性部位のアミノ酸を変換し、触媒能を調節する酵素のデザインを具現化するに相応しいモデル酵素と言える。

4-3. 生合成酵素遺伝子のクローニングとその発現⁶³⁾ CN の生合成は以下の 3 種の酵素が関与する。1) olivetolic acid を形成するための polyketosynthase, 2) olivetolic acid と geraniol pyrophosphate を結合する olivetol-geraniol transferase, 3) CBGA の閉環反応を触媒する前述の 3 酵素である。

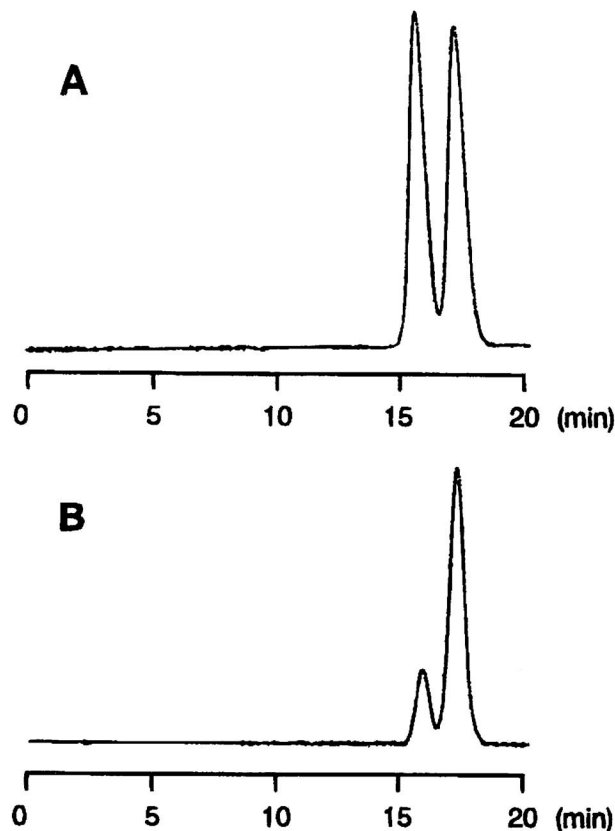


Fig. 15. Optical Resolution of CBC by Chiral HPLC
Chromatogram A: CBC chemically synthesized from CBGA, Chromatogram B: CBC prepared by decarboxylation of the enzymatically synthesized CBCA.

CN のアルキル部位は通常 pentyl 基であるが、アジア地区には propyl 基も多く、methyl 基の存在も報告されている。このことから polyketosynthase のクローニングを行っており、3 個の遺伝子、pk-1 から 3 を単離し、そのうち pk-1 を昆虫細胞に組み込み発現系を構築し、その酵素タンパクの性状を明らかにするとともに、活性を調査した。その結果 hexylCoA をスターターとして添加した場合、olivetol が生成されるが、olivetolic acid 生成能が低いことが判明したので現在も検討中である。

3種の大麻成分生合成酵素を精製しその性状について述べた。その中で研究が先行している THCA 生合成酵素のクローニングについて概説する。

既に N 末端アミノ酸配列を報告しているが、さらに詳細な情報を得るために精製酵素を BrCN 及び V8 プロテアーゼにより部分分解を行い内部構造フラグメントを得た。これらを基に重複プライマーを用いて PCR により増幅し、アガロース電気泳動にて約 350 bp のバンドを確認した。本増幅産物を M13 ペクターにクローニング後シーケンシングした結果、部分分解産物の配列を保持することが明らかとなり、THCA 生合成遺伝子の部分構造を示していると結論した。

まず最初に先の 350 bp 増幅産物のアンチセンスプライマーと N 末端アミノ酸配列によるセンスプライマーを用いて PCR を行い、約 1 Kbp の cDNA フラグメントをクローニングした。一方 350 bp 増幅産物のセンスプライマーと adapter primer を用いた 3'RACE により 3'末端をクローニングした。同様に 1 kbp の cDNA フラグメントを基にアンチセンスプライマーと oligo (dT) 17adapter primer と adapter primer を用いて 5'RACE により 5'末端をクローニングした。最終的に両 RACE 産物を基にしたプライマーを合成して PCR を行い全長をクローニングした (Fig. 16)。

得られた cDNA は Fig. 16 に示す通り 545 個のアミノ酸をコードする 1635bp で、分子量の理論値は 59 kDa と算出された。先に述べた通りアサから精製した THCA synthase の分子量は 75kDa であるので両者の差異は大きい。この点に関しては 6 カ所に N-glycosylation site を保持していることからプロセッシングが必要なことがうかがえる。

本 cDNA を *Agrobacterium* を介してタバコ細胞へ導入し、CBGA とインキュベートすることにより CBGA は THCA に交換した。このことから CN を大麻以外の植物で合成することに成功した世界で最初の例となった。

4-4. THCA synthase の大量発現と X 線構造解析 次に昆虫細胞による発現系を構築した。組換え THCAs は、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System を用いて発現用ウイルスを調製し、Sf9 を宿主細胞として分泌発現を行った。THCA 合成酵素の cDNA を鋳型として PCR 法により、THCA

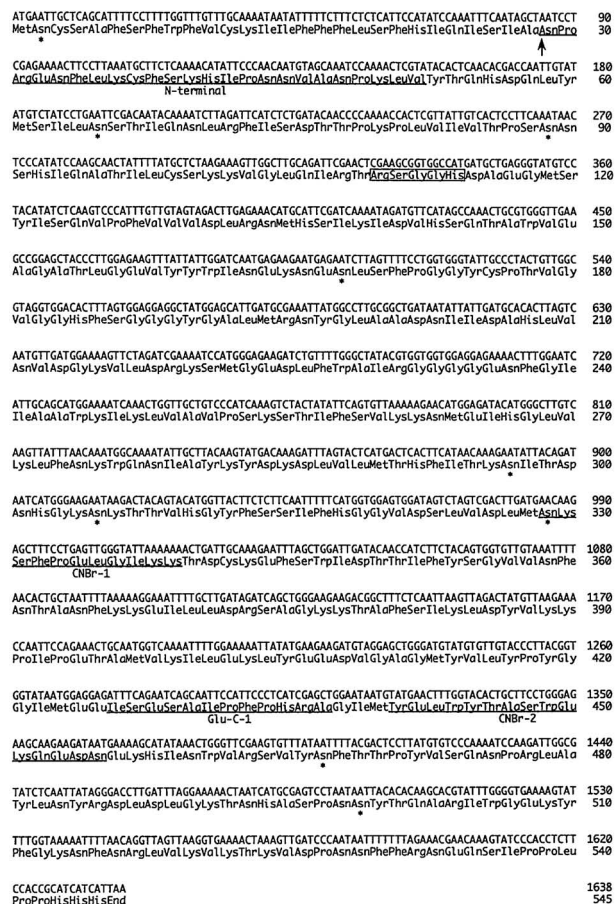


Fig. 16. Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of THCA synthase

合成酵素遺伝子をコードする領域を増幅し、制限酵素 BamH I 及び Sac I によって切断後、バキュロウイルスへのトランスファーベクター pFastBac1 にクローニングした。クローニング後、塩基配列の確認を行い、大腸菌 DH10Bac に形質転換することで組換えバックミドを作成した。ここで得られた組換えバックミドを Sf9 細胞に形質移入することで組換え THCA 合成酵素バキュロウイルスの作製を行った。

培養上清 1 l から約 2 mg の精製 THCA 合成酵素を得ることに成功し、得られた THCA synthase は SDS-PAGE 上で単一なバンドとして確認できた。回収した THCA synthase の波長スペクトルを測定すると、360 nm 及び 440 nm 付近に FAD に特徴的な吸収極大を示した。また、精製 THCA 合成酵素溶液を濃縮したところ、FAD 由来の黄色を呈していたことから、THCA synthase が補酵素として FAD を含んでいることを確認した。⁶³⁾

精製した THCA synthase を用いて、結晶化スクリーニングを行った。結晶の析出を経時的に顕微鏡下で観察した結果、96 条件中 24 条件において微結晶若しくは沈殿が確認され、そのうちクエン酸ナトリウム塩を含む条件において単結晶を確認することができた。

単結晶が確認された条件を基に結晶化条件の最適化を行った。この結果 0.1 mm 程度の結晶を得ることができた (Fig. 17).⁶⁴⁾

結晶解析には分子置換法を用いた。まず最初に分子置換法を適用するための検索モデルを検討した。タンパク質立体構造データベースを対象として、各種プログラムを用いて THCA synthase の一次構造から、立体構造の特徴が類似するタンパク質を検索した結果、Glucooligosaccharide oxidase (GOOX) が THCA synthase と相同性を持つことが判明した。本モデルを用いて電子密度図を作製した結果、GOOX の FAD に相当する部位に電子密度を確認し構造を決定した。最終的に THCA synthase Fig. 18 に示す構造と決定した。

THCA synthase は、FAD の結合ポケットを境界にして大きく 2 つのドメインに分けられる。これらの 2 つのサブドメインに FAD のアデニル酸部分が挟まれて存在する形を取っている。

ポケット内の Tyr をフェニールアラニンに変換することで活性が消失することから、本 Tyr が必須であることを明らかにした。

以上 THCA synthase の構造解析から生合成メカニズムを解明することができた。現在までに植物 2

次代謝産物に関する膨大な生合成酵素がクローニングされ酵素タンパクが発現されているが、最終的な反応メカニズムを直接的に証明した例は少ない。今後は酵素タンパクの構造解析を明らかにして行くことが望まれる。

4-5. THCA synthase の発現部位⁶⁵⁾ THCA synthase の分布を明らかにするために、緑色蛍光タンパク (GFP) と THCA synthase を結合した形のハイブリッド遺伝子をタバコに導入してその発現を検討した結果、Fig. 19 の D にみられるように腺毛部分に蓄積することが明らかとなった。CN 類が植物細胞や昆虫細胞のアポトーシスを引き起こすことが明らかとなったことから、THCA synthase は腺毛の分泌細胞から分泌され、貯蔵部位で CBGA から CN を生合成して貯蔵し、外敵に対する生体防御の役割を担っていると考えている。

5. 生薬の有効成分の代謝研究

生薬成分は最終産物と考えられてきたが、そうではなかった。生薬黄芩の有効成分 baicalin (フラボノイド配糖体) は植物の感染等により各種酵素が誘導され、生体防御に関わっていることが判明した。すなわち最初に glucuronidase が誘導され、配糖体がアグリコン (baikalein) となり、そのものが誘導 peroxidase とカップリングし、感染部位で起こる酸化バーストの中であって、多量に発生する過酸化水

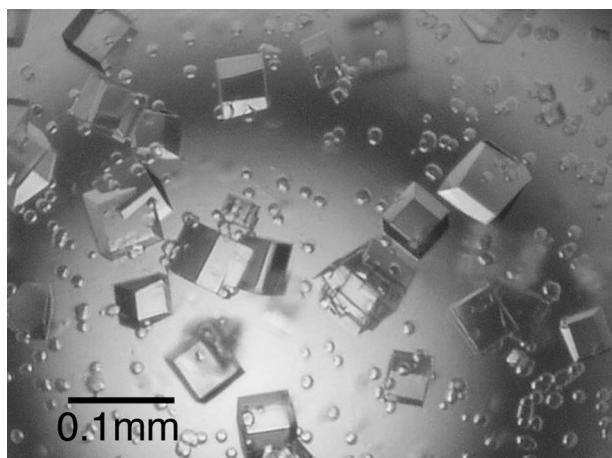


Fig. 17. Crystals of THCA synthase



Fig. 18. Structure of THCA synthase

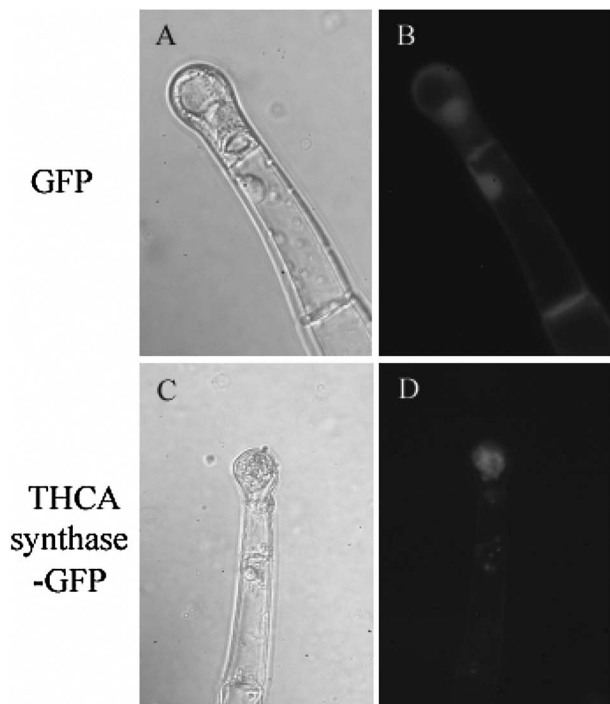


Fig. 19. Localization of THCA synthase in the Storage Cavity of the Glandular Trichomes of Transgenic Tobacco Plants
Scope (A) or fluorescence microscope (B). The expression of THCA synthase-GFP visualized under a phase contrast microscope (C) or fluorescence microscope (D).

素（細菌類を殺菌）を消去して、植物へのダメージを緩和するメカニズムが明らかとなった。⁶⁵⁻⁶⁷ また、ケシのモルヒネも人類への贈り物としての最終産物と信じられてきたが、細菌類の感染により酸化バーストが惹起されとともに、種々の peroxidase が誘導され、そのものによりモルヒネが2両体となり細胞壁を強化することにより生体防御システムを遂行していることを明らかにした。^{68,69} 現在は上述の大麻成分についても、植物における意義を解明すべく研究が続けられている。

6. 生薬の活性成分探索

6-1. サフラン サフラン *Crocus sativus* は柱頭及び花柱（めしべ）のみを乾燥させたもので、鎮けい剤、通経剤として用いられるほか、赤痢、はしか、黄疸、痛風、リウマチにも使用される、万能治療薬的に用いられてきた。ディオスコリデスの薬物誌「マテリアメデイカ」には「新鮮なものほどよく、二日酔い、血行不良や子宮薬、便通薬、強壯薬として用いる」と記載されている。また、ギリシャ時代には催淫剤としても用いられた。日本では一般に鎮静、鎮痛、通経の目的で家庭薬製剤の原料とし

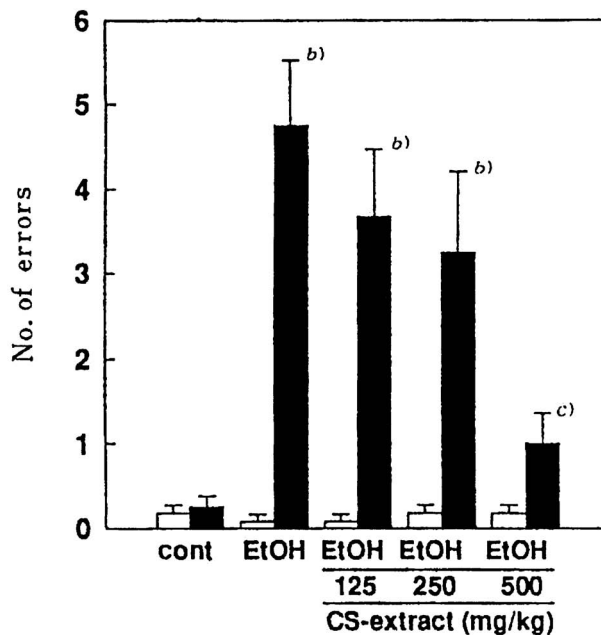


Fig. 20. Effect of Saffron Extract on Learning and Memory

て用いたり、また、染料用、鑑賞用に栽培される。「本草綱目」には継続して服用すれば精神面を安定させると書かれており、古来よりうつ状態、ヒステリー、恐怖、恍惚、婦人閉経・産後の瘀血（おけつ）や腹痛など、駆瘀血作用を有する生薬として用いられてきた。また、近年サフランエキス及びその含有成分の抗腫瘍活性、抗高脂血症作用、抗動脈硬化作用、肝障害改善作用、血小板凝集制作用、血管拡張作用などの薬理作用が報告されている。

6-1-1. サフランと記憶学習 サフランの50%エタノールエキス単独ではマウスの記憶学習にたいしてなんら作用が認められないが、アルコールによる記憶障害や記憶再現障害を用量依存的に改善することが認められた（Fig. 20）。以上からアルコールによる記憶学習障害を起こさせたモデルマウスを用いることにより、サフランのエキスが改善効果をもたらすことが明らかとなった。⁷⁰

長期増強作用とは、動物の脳の重要な部位である海馬の一定部位を刺激することによって、数十分から数時間に及ぶシグナルを発生する現象をいう。このためこの現象は記憶学習と密接な関係を持っていると考えられ、記憶学習を評価する方法として応用されている。また、海馬のスライスを用いる実験も行われている。この実験においてもアルコールによる長期増強の発現阻害を起こしたモデルを用いた。

正常な長期増強の発現状況とラットにエタノールを経口投与して長期増強の抑制をかけた状態を比較して、サフランエキスの経口による前投与により長期増強の発現が改善することが明らかになった (Fig. 21).⁷¹⁾

次にエタノールを静脈内へ投与して長期増強発現の抑制を行った状態に対するエキスの経口前投与の効果も、同様にアルコールに対する拮抗作用が認められる。さらにアルコールを脳内へ直接与えることによってもサフランエキスの改善作用が認められた。これらの実験を通してサフランエキスはアルコールによって長期増強が阻害されている状態を改善することが明らかとなった。⁷²⁾

次にアルコールにより長期増強を阻害したモデルマウスを用いて、各成分の活性を調べたところ、クロセチン配糖体に活性が集中することが明らかとなったので、クロセチン配糖体を精製して3種の配糖体をそれぞれ分離した。それらの成分はサフランの独特の色素成分であるクロシンとその類似成分であった。

クロシンを与えていないマウスに対してクロシンを与えたことにより明らかに長期増強を強めていることが判る。しかしその作用は強いとは言えないので、前述のアルコール阻害モデルマウスを用いた実験を行い、クロセチン配糖体類の効果を評価した。最も作用が強いのはクロシンで、糖の数が少なくなるにしたがって作用も弱まっている (Fig. 22)。また、それぞれの化合物は用量依存的に強まって行くことが明らかとなった。^{73,74)} さらにクロシンはNMDAレセプターを介して作用していることを示

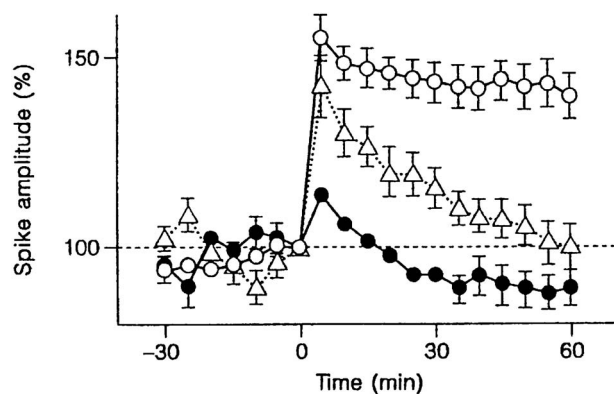


Fig. 21. Effect of Saffron Extract on Long Term Potentiation Blocked by Ethanol

唆する結果を得た。^{75,76)}

6-1-2. サフラン及びクロシンの抗皮膚がん活性⁷⁷⁾ 皮膚がんを作らせない成分を調べる場合、簡単な評価系として、マウスの皮膚にイニシエーターを塗り、その後20週間後にプロモーターを繰り返し塗布する。あらかじめサフランのエキスやクロシンを経皮投与や経口投与することにより皮膚がんの発生状況をコントロールと比較して評価するものである。

水のみを与えたものでは5週目辺りから皮膚がんの発生率が急激に増加し、10週目になるとすべてのマウスが皮膚がんを発生した。一方サフランエキスを与えた群は8週目から皮膚がんの発生が認められるが、発がんマウスの比率が低く、20週目においても80%となっている。

次に皮膚がんの数を調査した結果、水だけを与えた群は5週目から増加し、20週目には1匹当たり10個の皮膚がんが発生している。エキスを与えた群は一匹当たりの数が明らかに少なく、20週目で6個となっている。

以上からサフランエキスの経口投与によって皮膚がんの発生を抑えることができることを明らかにした。次にエキス中の活性成分の探索を行った。水のみを与えたマウスでは5週目から急激に比率が上昇し、10週目で100%となった。クロシンを与えたマウスでは上昇カーブがずれてきており、20週目で80%となっている。

オゾン層の破壊によって紫外線の照射量が増加し、特に紫外線量の多い地域によっては皮膚がんの増加が危惧されている。このような問題に対して多くの紫外線吸収剤が開発され応用されている。今回

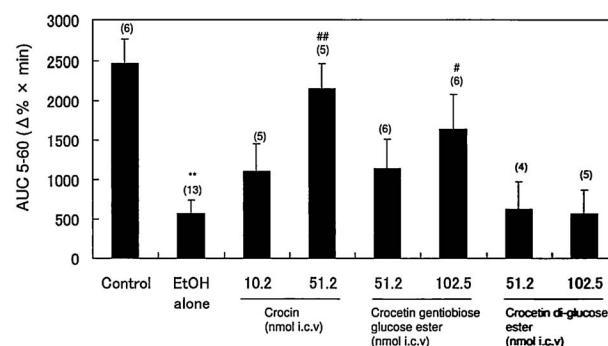


Fig. 22. Dose-dependent Effects of Crocin and Its Analogues on the LTP-blocking Effect of Ethanol

クロシンが活性成分であることが明らかとなったので、食品としてのサフランに新しい機能が加わったことになる。

6-1-3. クロシンのその他の作用 アポトーシスを指標としてその阻害や促進作用を示す物質を探し当てようとする研究例が多くなっている。筆者らも神経細胞のアポトーシスを阻害する成分を探している。アポトーシスは多くの関連酵素群が絡んでいるが、最終的にはカスパーゼ3がアポトーシスを惹起させる。

PC-12 細胞へ TNF- α を添加すれば明らかに caspase ファミリーの活性が上昇しアポトーシスが起るが、TNF- α と同時にクロシンを 0.1, 1, 10 μ M 添加すると濃度依存的に caspase 活性が低下することを見出した。引き続きクロシンを添加して関連遺伝子の発現を検討したところ、アポトーシス抑制因子である Bcl-X_L, Bcl-2 の発現は用量依存的に上昇した。⁷⁸⁾

一方、Bax, Bcl-X_s, LICE 等アポトーシス促進因子はいずれも用量依存的に低下することが明らかとなった。このことから以下の作用メカニズムが明らかとなる。Bcl-2 がミトコンドリアから分泌する cytochrome c 量を低下させることによりカスパーゼ3活性が低下し、したがってアポトーシスを回避できる。また、クロシンが TNF- α により誘導される Bcl-X_s, LICE の発現を抑制し、サイトカインにより減弱された Bcl-X_L 発現量を還元することによりアポトーシスが抑制される。

Ceramide は sphingomieline から sphingomielinase により分解され生じる。Ceramide はカスパーゼ3を活性化することによりアポトーシスを惹起する。ところが glutathione が sphingomielinase のインヒビターであるので、ceramide 量と glutathione 量に与えるクロシンの作用を検討した。Figure 23 は ceramide 蓄積量 ceramide 蓄積量が濃度依存的に低下した。この要因を解明する目的で、glutathione 量を測定したところ濃度依存的な glutathione 量の増加が認められた。これらの結果から、クロシンの抗アポトーシス活性は当初予想した通り、内在性 glutathione 量が増加することにより、sphingomielinase 活性を阻害してアポトーシスを阻害することが明らかとなった。⁷⁹⁾

クロシンは抗酸化作用も強いことが明らかとなっ

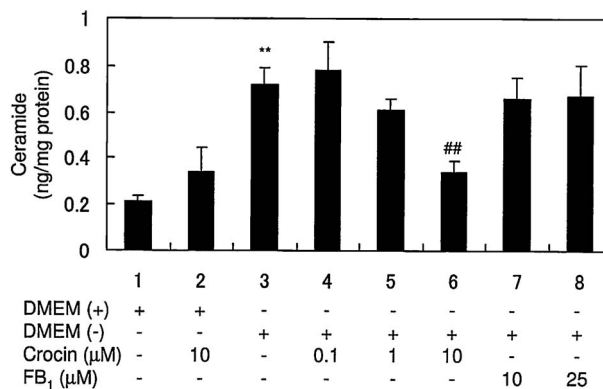


Fig. 23. Effect of Crocin or FB1 on Ceramide Accumulation in Serum/glucose-deprived PC-12 Cells

た。脂質の酸化度を検討した結果クロシンは α -tocopherol よりも抗酸化作用が強いことが判明した。また、SOD の活性化も α -tocopherol に比べて強力であることが明らかとなった。以上のことからクロシンの抗酸化力によって脳神経細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。^{80,81)}

以上から、クロシンは数少ない脳神経細胞保護化合物と言える。

中国ではクロシンを狭心症の医薬品として開発し、2006年1月に上市した。また、眼科領域でも目の血流改善薬として用いられていると聞いている。高齢者に多い疾患に有効な成分を含んでいるサフランは、高齢時代に突入した日本においてもその威力を発揮するものと期待される。

6-2. 金線蓮 金線連 (*Anoectochilus formosanus*) はラン科に属する多年生草本で、台湾では標高 500–1800 m の産地に自生している (Fig. 24)。日本の南西諸島南部の亜熱帯の林下にも自生しており、日本名はキバナシュシュランであるが、日本では薬用にはされていない。台湾では生の全草 4–40 g を一日量として古くから滋養強壯、小児の發育不良、結核、肝炎、腎炎、発熱などの疾患の治療に用いられてきた。また、蛇にかまれたときの解毒にも使用され、烏参、薬虎、薬王等の呼称があり多彩な薬効を持つ貴重な生薬である。

近年、糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満などの生活習慣病が大きな社会問題となってきている。特に高脂血症は、今日の診療において遭遇する最も頻度の高い疾患の1つであり、冠動脈疾患を始めとする動脈硬化症の危険因子として注目されている。世界



Fig. 24. Photo of *Anoectochilus formosanus* HAYATA

一の長寿国である日本は欧米に比べ冠動脈疾患の発症率が低いことで有名で、その原因は遺伝的素因のほかに日本人の食生活によるところが大きいと考えられている。1970年代初めの報告では、日本人は欧米人に比べ脂肪摂取量が少なく、血清コレステロール値が非常に低値であるとされていた。脂肪摂取量は高脂血症発症に正の相関を有することが疫学調査から明らかとなっているが、高度経済成長後、日本人の栄養事情が大きく変化し、1日の脂肪摂取量は1955年の21gから1990年には58gにまで上昇した。これを反映して日本人の血清コレステロール値の上昇が進んでいる。このため医療費もまた増加の途を辿っており、治療もさることながら予防が重要であるとの社会認識が高まってきており、代替医療の重要性が叫ばれるようになってきた。このような状況の中で金線蓮が生活習慣病の予防や治療へ応用されるようになり、その需要が急増している。このため、大量採取が行われたため天然資源が激減しており、代替生薬の開発及びバイオによる大量増殖法の確立が切望されるに至った。われわれは、組織培養による効率的な大量増殖法の確立を行い、その培養植物を用いて動物試験や臨床試験を行って金線蓮の薬効を検証した。また、代替生薬 (*Goo-*

dyera schlechtendaliana) についてもその薬理作用を検討した。いずれの生薬にも肝障害抑制活性、脂質代謝改善作用等の薬効が確かめられたので両種の活性成分の検索を行い、kinsenoside とその光学異性体やその関連化合物、またフラボノイド配糖体を活性成分として特定するに至った。

6-2-1. 金線蓮の培養^{82,83)} 前述のごとく金線蓮の天然資源が枯渇しているので大量培養系の確立が必要となった。このため最初に完熟種子を培地で無菌発芽させ、植物体が得られたら植物ホルモン添加培地にて多芽体 (multiple shoot) を得、このものの形態培養を行い大量に増殖した。小さな multiple shoot を液体培地で継代培養を行って通常の大サイズの植物を得た。以下が培養の詳細である。

種子の発芽：金線蓮の完熟種子を0.05%のTween 20を含有する1%NaOCl含有溶液で15分間滅菌後、さらに70%エタノールで30秒間滅菌を行い、最後に滅菌水で水洗した。滅菌種子はリッター当たり2gのペプトン、1mg/lのベンジルアデニン (BA) を添加した1/2Murasige-Skoog (MS) 培地へ置床し、25°C、1500ルクス照射、16時間日長で30日培養を行って発芽させた。発芽した固体をさらに6-8mmの大きさになるまで培養を行った。

初代培養：発芽固体は0.3mg/l BA及び0.03mg/l α -ナフタレン酸 (NAA) 1/2 MS液体培地で1時間に30回、2-1項と同様な条件下で2ヵ月間浸透培養を行った。さらにホルモン無添加の1/2 MS液体培地で同様な条件下4ヵ月間静置培養を行い高さ15cm程度、1本当たり新鮮重2.8-3.3gの再分化植物を得て収穫した (Fig. 25)。

6-2-2. 培養金線蓮粗エキスの肝細胞とモデル動物による評価⁸⁴⁾ CCl₄処理初代肝細胞のLDH, GOT, GPT値と肥満モデルマウスを指標に評価を行った。

6-2-2-1. CCl₄処理初代肝細胞のLDH, GOT, GPT値 マウスの摘出肝臓から酵素処理して肝細胞を得た。肝細胞を24時間前培養し、5mMのCCl₄含有培養液に移して1時間培養後、細胞を集めLDH, GOT, GPT値を測定した。マウス肝細胞をCCl₄含有培養液で処理し金線蓮粗エキスの効果をLDH, GOT, GPTの測定値により評価した。コントロール群に比べCCl₄処理細胞は高値を示し



Fig. 25. Plantlet Formation of *Anoectochilus formosanus* HAYATA *In vitro*

た。これに比べて金線蓮粗エキスを添加した細胞の LDH, GOT, GPT 値は明らかに用量依存的に低下することから、金線蓮は肝細胞庇護作用を有することが明らかとなった。

6-2-2-2. 肥満モデルマウス 4 週齢 ICR 雌マウスにオウロチオグルコース 500 mg/kg を静注し、フルクトース 20% とコーンオイル 10% を添加した高脂肪食を与えて肥満モデルマウスを作成した。本モデルマウスへ金線蓮粗エキス 0.5% 添加食餌を 8 週間与え、体重の変動、麻酔下でラットの肝臓を摘出し、肝重量、脂肪組織重量を測定した。

ノーマルマウス、モデルマウス、金線蓮粗エキス投与群の摂食量を比較したところ 3 者にはほとんど変動は認められなかった。

肥満モデルマウスでは急速な体重増加が認められたが、金線蓮粗エキス添加食餌群では明らかな低下作用が認められた。

次に肝重量及び脂肪組織重量に与える効果を検討した。肝重量の変動は少ないものの、金線蓮粗エキス添加群では明らかな脂肪組織重量低下が認められた (Fig. 26)。

一方、肝臓と血清中の中性脂肪を測定した結果、コントロール群では中性脂肪が増加しているが、金線蓮粗エキス添加群では明らかに中性脂肪低下作用が認められた。

6-2-3. 高脂血症に対する培養金線蓮の臨床試験⁸⁵⁻⁸⁷⁾ 日本動脈硬化学会は、本邦における高脂血症の診断基準を、血清 TC 値 220 mg/dl 以上又は血清 TG 値 150 mg/dl 以上とすることを提案してい

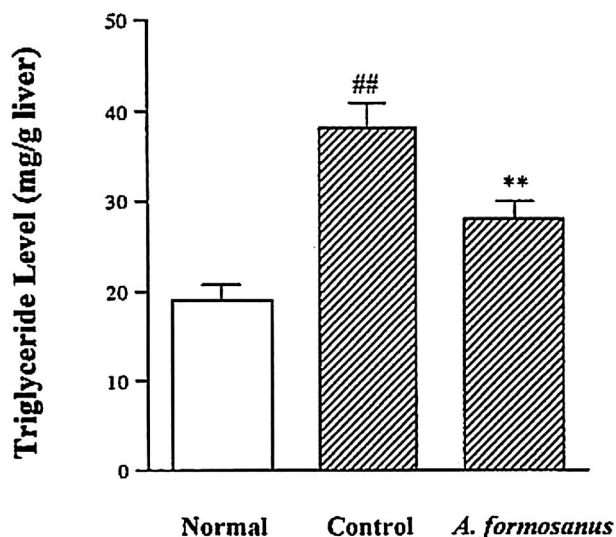


Fig. 26. Effect of *Anoectochilus formosanus* Extract on Triglyceride Level in the Liver of Mice

^{##} $p < 0.01$ significantly different from the normal group, ^{**} $p < 0.01$ significantly different from the control group.

る。この異常はリポタンパクレベルでは、VLDL, LDL, IDL (intermediate density lipoprotein), CM, CM レムナントのいずれかが増加した状態である。つまり、高脂血症は高リポタンパク血症と考えられる。原発性高脂血症を除いて、続発性 (二次性) 高脂血症における LDL 及び VLDL の増加は、肥満、糖尿病、甲状腺機能低下症、及びネフローゼ症候群などで起こる。金線蓮を高脂血症患者及び正常者に投与し、高脂血症に対する効果を理学的及び血液生化学的に検討し、その脂質代謝の改善作用について検討した。

患者と投与方法：1996 年 9 月から 1997 年 9 月の 12 ヶ月間、医療機関への通院及び入院のないボランティア 56 例 (男性 38 例、女性 18 例、年齢 18-67 歳、平均 33.9 歳) を対象とした。

金線蓮投与前の血清中性脂肪 (TG) 値及び血清総コレステロール (TC) 値がそれぞれ 30-150 mg/dl 及び 120-220 mg/l を正常群 36 例、TG 値が異常値 (TG 値 151 mg/dl 以上) の高 TG 血症群 14 例、TG 値が異常値 (TC 値 221 mg/dl 以上) の高 TC 血症群 11 例、そして高 TG 血症及び高 TC 血症の合併を認める高 TG・TC 血症群 5 例の 4 群に分類して、金線蓮を 6 ヶ月間投与した。

なお、この 6 ヶ月間の投与終了後、上記対象者の内、継続してさらに 6 ヶ月間の計 12 ヶ月間投与し

たのは、正常群 21 例、高 TG 血症群 7 例、高 TC 血症群 11 例、そして、高 TG・TC 血症群 5 例であった。

1 回 1200 mg (4 錠) を 1 日 3 回、原則として食前又は食間に 6 ヶ月間又は 12 ヶ月間、経口投与した。

臨床用サンプルの作成は以下の通り行った。

(1) 金線蓮の新鮮植物全草を熱風乾燥(60°C)後、粉碎し細末とした。

(2) 金線蓮粉末 (37.5 mg), コーンスターチ (139.5 mg), アゼセル (114.6 mg), グアガム (2.4 mg), 及びシュガーエステル (6.0 mg) を混合、錠剤化し、セラック (3.0 mg) を表面にコーティングした (1 錠 300 mg)。

検査項目は以下の通りである。

身体測定：身長 (m), 体重 (kg), Body mass index (BMI) (体重/身長², kg/m²), 体脂肪率 (バイオインピーダンス法, タニタ社製体重計付体脂肪率計を使用) (%)。

血液生化学検査 (空腹時)：AST, ALT, アルカリフォスファターゼ (ALP), γ -GTP, コリンエステラーゼ (ChE), クレアチニンフォスフォキナーゼ (CPK) (以上単位 IU/l), TG, TC, HDL コレステロール (HDL-C), β リポタンパク分画定量 LDL (low density lipoprotein), VLDL (very low density lipoprotein), カイロミクロン (CM), アポタ

ンパク (Apo A-I, Apo B, Apo E), 血糖, 尿酸 (UA), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cr) (以上単位 mg/l), HbA1c (%) を測定した。これら測定値より, アポタンパク比 (Apo B/Apo A-I) 及び動脈硬化指数 (A.I.) ((TC-HDL-C)/HDL-C) を計算した。

以上の検査結果は以下の通りである。

(1) 正常群 (Table 4) 金線蓮 6 ヶ月投与例 (例数 36 例) ではいずれの検査項目においても有意な変動は認められなかったが, 12 ヶ月投与例 (例数 21 例) では, VLDL 値及び ApoE 値が, 投与前それぞれ 129.9 \pm 53.5 mg/dl, 5.1 \pm 1.4 mg/dl で, 投与後それぞれ 85.8 \pm 36.5 mg/dl, 4.2 \pm 0.9 mg/dl と有意な低下が認められた ($p<0.01$)。

(2) 高 TG 血症群 (Table 5) 金線蓮 6 ヶ月投与例 (例数 14 例) ではいずれの検査項目においても有意な変動は認められなかった。

金線蓮 12 ヶ月投与例 (例数 7 例) では, TC 値, VLDL 値及び ApoE 値が, 投与前それぞれ 223.7 \pm 56.2 mg/dl, 329.0 \pm 77.7 mg/dl, 及び 7.3 \pm 2.0 mg/dl で, 投与後それぞれ 202.4 \pm 47.6 mg/dl, 165.0 \pm 37.4 mg/dl, 及び 5.8 \pm 1.2 mg/dl と有意な低下が認められた ($p<0.05$)。

(3) 高 TC 血症群 (Table 6) 金線蓮 6 ヶ月投与 (例数 11 例) では, AST 値及び ALT 値が, 投与前 27.6 \pm 10.0 IU/l 及び 35.3 \pm 19.6 IU/l で, 投与

Table 4. Effect of *Anoectochilus formosanus* on Lipid-metabolism in Normal Health Subjects

| | | 0 month | 6 months | 6 months | 12 months |
|------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | | (36 volunteers) | | (21 volunteers) | |
| BMI | (kg/m ²) | 23.9 \pm 3.2 | 23.9 \pm 3.1 | 23.7 \pm 3.1 | 23.8 \pm 3.3 |
| Percent body fat | (%) | 28.1 \pm 4.6 | 29.4 \pm 4.1 | 28.5 \pm 4.4 | 28.2 \pm 3.9 |
| TG | (mg/dl) | 90.1 \pm 30.7 | 95.7 \pm 41.4 | 93.9 \pm 27.0 | 80.7 \pm 25.9 |
| TC | (mg/dl) | 177.9 \pm 31.4 | 183.7 \pm 33.0 | 189.3 \pm 25.3 | 178.3 \pm 28.8 |
| HDL-C | (mg/dl) | 58.8 \pm 13.2 | 54.5 \pm 10.1 | 60.2 \pm 15.1 | 54.7 \pm 11.9 |
| LDL | (mg/dl) | 100.1 \pm 26.2 | 109.3 \pm 26.9 | 106.3 \pm 21.9 | 107.4 \pm 26.9 |
| VLDL | (mg/dl) | 124.9 \pm 56.4 | 129.6 \pm 61.8 | 129.9 \pm 53.5 | 85.8 \pm 36.5** |
| Apo A-I | (mg/dl) | 147.6 \pm 20.7 | 149.3 \pm 21.8 | 148.8 \pm 22.2 | 147.1 \pm 27.6 |
| Apo B | (mg/dl) | 58.8 \pm 13.2 | 79.9 \pm 21.5 | 85.2 \pm 17.0 | 93.5 \pm 36.3 |
| Apo E | (mg/dl) | 5.1 \pm 1.6 | 5.1 \pm 1.3 | 5.1 \pm 1.4 | 4.2 \pm 0.9* |
| AST | (IU/l) | 16.3 \pm 5.5 | 16.9 \pm 6.2 | 17.7 \pm 6.5 | 18.2 \pm 6.3 |
| ALT | (IU/l) | 17.7 \pm 10.5 | 18.5 \pm 11.7 | 19.1 \pm 12.2 | 18.9 \pm 10.3 |
| ALP | (IU/l) | 162.6 \pm 53.2 | 160.4 \pm 43.0 | 165.2 \pm 63.9 | 159.0 \pm 58.8 |
| γ -GPT | (IU/l) | 30.8 \pm 34.2 | 31.8 \pm 37.6 | 27.5 \pm 19.5 | 31.5 \pm 34.0 |

Values are presented as mean \pm S.D. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ Significantly different to those before treatment.

Table 5. Effect of *Anoectochilus formosanus* on Lipid-metabolism in High-triglyceride Subjects

| | | 0 month | 6 months | 6 months | 12 months |
|------------------|----------------------|-----------------|------------|----------------|--------------|
| | | (14 volunteers) | | (7 volunteers) | |
| BMI | (kg/m ²) | 25.6±4.2 | 25.5±4.4 | 25.4±1.8 | 25.3±2.3 |
| Percent body fat | (%) | 26.8±7.2 | 27.8±8.1 | 26.7±6.6 | 26.7±9.2 |
| TG | (mg/dl) | 242.4±77.6 | 204.3±48.2 | 207.6±38.1 | 159.3±34.7 |
| TC | (mg/dl) | 208.2±50.4 | 203.9±36.4 | 223.7±56.2 | 202.4±47.6* |
| HDL-C | (mg/dl) | 45.9±10.5 | 44.0±11.5 | 49.9±9.3 | 47.7±10.2 |
| LDL | (mg/dl) | 115.6±46.0 | 119.0±33.2 | 132.2±48.8 | 122.9±45.3 |
| VLDL | (mg/dl) | 323.2±87.3 | 321.7±82.7 | 329.0±77.7 | 165.0±37.4** |
| Apo A-I | (mg/dl) | 141.6±29.0 | 140.0±23.7 | 146.1±21.2 | 158.6±33.6 |
| Apo B | (mg/dl) | 104.6±24.6 | 102.4±24.4 | 108.1±29.9 | 99.9±53.9 |
| Apo E | (mg/dl) | 7.2±2.3 | 6.9±1.4 | 7.3±2.0 | 5.8±1.2* |
| AST | (IU/l) | 24.6±10.6 | 21.6±6.7 | 23.4±12.9 | 19.4±6.5 |
| ALT | (IU/l) | 31.7±19.5 | 27.6±18.4 | 27.9±20.6 | 22.0±10.5 |
| ALP | (IU/l) | 204.2±50.3 | 198.3±54.6 | 198.0±59.8 | 203.1±77.9 |
| γ-GPT | (IU/l) | 62.1±65.2 | 52.9±43.1 | 56.1±74.1 | 55.4±61.2 |

Values are presented as mean±S.D. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ Significantly different to those before treatment.

Table 6. Effect of *Anoectochilus formosanus* on Lipid-metabolism in High-cholesterol Subjects

| | | 0 month | 6 months | 12 months |
|------------------|----------------------|-----------------|-------------|--------------|
| | | (11 volunteers) | | |
| BMI | (kg/m ²) | 25.8±2.7 | 25.6±3.1 | 25.6±3.0 |
| Percent body fat | (%) | 25.6±5.3 | 26.6±5.8 | 25.4±5.0 |
| TG | (mg/dl) | 227.0±54.7 | 166.6±46.6 | 143.7±50.3** |
| TC | (mg/dl) | 248.5±24.2 | 239.9±18.5 | 235.8±25.7 |
| HDL-C | (mg/dl) | 53.9±12.5 | 50.3±13.0 | 53.1±14.8 |
| LDL | (mg/dl) | 156.3±36.5 | 155.2±24.8 | 160.3±33.8 |
| VLDL | (mg/dl) | 289.9±126.3 | 282.0±132.6 | 150.0±53.4* |
| Apo A-I | (mg/dl) | 153.2±31.2 | 146.0±27.1 | 156.6±39.5 |
| Apo B | (mg/dl) | 125.2±14.5 | 120.0±20.5 | 128.0±56.3 |
| Apo E | (mg/dl) | 7.2±2.9 | 6.9±1.5 | 5.9±1.5* |
| AST | (IU/l) | 27.6±10.0 | 21.3±6.8* | 24.9±9.5 |
| ALT | (IU/l) | 35.3±19.6 | 27.3±14.4* | 35.6±18.4 |
| ALP | (IU/l) | 208.6±53.8 | 207.0±48.4 | 211.7±56.5 |
| γ-GPT | (IU/l) | 84.9±71.0 | 71.5±61.8 | 78.4±89.3 |

Values are presented as mean±S.D. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ Significantly different compared to those before treatment.

後それぞれ 21.3 ± 6.8 IU/l 及び 27.3 ± 14.4 IU/l と有意な低下が認められた ($p<0.05$).

金線蓮 12 カ月投与 (例数 11 例) では、6 カ月投与では認められなかった。VLDL 値の、投与前 289.9 ± 126.3 mg/dl で投与後 150.0 ± 53.4 mg/dl と有意な低下が認められた ($p<0.05$)。一方、6 カ月投与で認められた AST 値及び ALT 値の低下は、12 カ月投与後には、投与前値とほぼ等しい値とな

った。

(4) 高 TG・TC 血症群 (Table 7) 金線蓮 6 カ月投与 (例数 5 例) では、TC 値、LDL 値、AST 値、及び ALT 値が、投与前 265.4 ± 23.5 mg/dl, 171.0 ± 22.7 mg/dl, 30.6 ± 13.5 IU/l 及び 40.0 ± 27.5 IU/l で、投与後それぞれ 238.2 ± 27.0 mg/dl, 152.0 ± 25.7 mg/dl, 23.2 ± 8.0 IU/l 及び 29.2 ± 19.6 IU/l と有意な低下が認められた ($p<0.05$)。

Table 7. Effect of *Anoectochilus formosanus* on Lipid-metabolism in High-triglyceride•Cholesterol Subjects

| | | 0 month | 6 months | 12 months |
|-------------------|----------------------|----------------|-------------|--------------|
| | | (5 volunteers) | | |
| BMI | (kg/m ²) | 25.2±2.2 | 24.7±2.1 | 23.7±1.5 |
| Percent body fat | (%) | 25.0±5.0 | 25.4±5.5 | 22.6±5.9 |
| TG | (mg/dl) | 209.0±46.7 | 186.8±43.9 | 160.8±42.1 |
| TC | (mg/dl) | 265.4±23.5 | 238.2±27.0* | 237.5±22.5* |
| HDL-C | (mg/dl) | 52.6±10.2 | 48.8±10.4 | 53.0±10.5 |
| LDL | (mg/dl) | 171.0±22.7 | 152.0±25.7* | 143.5±39.1* |
| VLDL | (mg/dl) | 323.8±103.2 | 363.0±118.4 | 170.3±28.1** |
| Apo A-I | (mg/dl) | 154.2±20.9 | 145.8±24.9 | 171.3±39.8 |
| Apo B | (mg/dl) | 130.2±13.4 | 118.6±23.9 | 107.5±74.6 |
| Apo E | (mg/dl) | 7.6±2.2 | 7.6±1.5 | 6.4±1.1 |
| AST | (IU/l) | 30.6±13.5 | 23.2±8.0* | 22.3±7.3* |
| ALT | (IU/l) | 40.0±27.5 | 29.2±19.6* | 23.0±14.2* |
| ALP | (IU/l) | 210.8±69.2 | 203.2±48.9 | 199.0±61.5 |
| γ-GPT | (IU/l) | 96.2±93.7 | 71.6±57.3 | 70.8±81.8 |
| Glucose | (mg/dl) | 100.8±13.4 | 101.4±21.2 | 89.7±7.5 |
| HbA _{1c} | (%) | 5.7±0.8 | 5.7±0.6 | 5.3±0.3 |

Values are presented as mean±S.D. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ Significantly different compared to those before treatment.

金線蓮 12 ヶ月投与（例数 5 例）では、TC 値、LDL 値、AST 値、及び ALT 値は 6 ヶ月投与後とほぼ等しい値を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。血糖値及び HbA_{1c} 値の若干の低下を認めたが統計学的な有意差は認められなかった。

以上の結果を総合すると、金線蓮による高脂血症への効果として、TC 値、VLDL 値、LDL 値、及び Apo E 値の有意な低下を認め、金線蓮による脂質代謝の改善が示された。高脂血症管理の主目的は冠動脈疾患の予防とその治療にあり、TC 値を 1% 低下させることで冠動脈疾患を 2% 予防でき、さらに冠動脈病変も改善し、したがって、金線蓮投与により冠動脈疾患の発症を予防する可能性が示唆された。

脂肪摂取量とともに炭水化物、タンパク質なども含めた食事摂取量が多くなり肥満となった場合、軽度又は中程度の血清トランスアミナーゼ上昇を示す脂肪肝をもたらすことはよく知られている。われわれは多数例による疫学的研究から、高 TG 血症と脂肪肝及び肥満との間に高い相関を確認している。本研究において対象が少数ながらも、ALT 値異常群では、ALT 値正常群に比較して、BMI 値、HbA_{1c}、及び UA 値が有意に高値であり、さらに

ChE 値も有意により高値であることから、前者には肥満傾向があり、耐糖能異常の存在やタンパク過摂取が疑われ、これらを素因とした脂肪肝の存在が強く疑われる。金線蓮による脂質代謝の改善作用において興味深いことは、その投与期間を通して肥満、脂肪率、及び UA 値の有意な改善は認めないにも関わらず、投与 6 ヶ月に AST 及び ALT 値の低下を認めたことである。また、70% が肝臓で合成され、VLDL の構成成分としてその代謝に関与している Apo E 値の低下も同時に認めている。これは金線蓮投与により、肝機能が改善され、徐々に脂質代謝の改善作用が現れてきたと推察される。このことは *in vitro* 実験においても明らかになった点であり、脂肪肝の改善作用が強く支持される結果となった。

肝臓は外因性及び内因性脂質代謝において重要な器官とされるが、われわれが調査した範囲で、高脂血症や動脈硬化疾患と肝障害との相関について、多集団を用いた疫学的調査の報告はない。金線蓮による肝障害の改善の機序は不明で、さらなる研究が必要であろう。

以上より、金線蓮は高コレステロール血症などの脂質代謝の改善効果を認め、その効果において肝障

害の改善を介している可能性が強く示唆された。なお、副作用を危惧していたが、金線蓮投与中及び終了後、体調不良、消化器症状や神経症状などを認めず、トランスアミナーゼ値、CPK 値、及び UA 値などの上昇も認めなかった。また、内服し難いという訴えもなかったことから安全性の高い生薬であることが明らかとなった。

6-2-4. 金線蓮の成分探索^{82,83)}

6-2-4-1. シリカゲルカラムによる精製 乾燥培養金線蓮をメタノールで抽出し、抽出エキスに水を加えてクロロフォルムで抽出し、水層はさらに *n*-ブタノールで抽出した。

なお各フラクションの四塩化炭素処理初代肝細胞による活性を指標として精製を行い、活性フラクションは *n*-ブタノール層及び水層であることが明らかとなった。

そこで *n*-ブタノール層と水層を順層シリカゲルカラムに付し CH₃Cl-MeOH-H₂O (6:4:1) 混合溶媒で順次溶出し精製した。さらにプレパラティブ TLC で分離化合物 **1** から **11** を単離した。それぞれの化合物についての各種スペクトルデータの比較から、化合物 **7** を除いては以下の通りの既知物質であった。Glucose, sucrose, 3-(*R*)-3-β-D-glucopyranosyloxybutanolide (**1**), 3-(*R*)-3-β-D-glucopyranosyloxy-4-hydroxybutanoic acid (**2**), 1-*O*-isopropyl-β-D-glucopyranoside (**4**), (*R*)-(+)-3,4-dihydroxybutanoic acid γ-lactone (**5**), 4-(β-D-glucopyranosyloxy)

benzyl alcohol (**6**), (6*R*, 9*S*)-9-hydroxy-megastigma-4,7-dien-3-one-9-*O*-β-D-glucopyranoside (**7**), corchionoside C (**8**), 3-(*R*)-3-β-D-glucopyranosyloxy-4-hydroxybutanoic acid methylester (**11**)。化合物 **3** は EI-MS, ¹H 及び ¹³C-NMR から 2-(β-D-glucopyranosyloxymethyl)-5-ydroxymethylfuran と決定した (Fig. 27)。

化合物 **1** は既に金線蓮から単離構造決定されている kinsenoside である。文献によれば⁸⁸⁾ 今回の kinsenoside の収量に比べて低く、また今回も kinsenoside のラクトン環が開いたカルボン酸タイプの化合物 **2** やこのメチルエステルである化合物 **11** が単離されたことから、精製中に kinsenoside から生じたものと推測された。

6-2-4-2. 精製法の改良⁸⁹⁾ 金線蓮の MeOH 抽出エキスを前項同様分配し、*n*-ブタノール層と水層画分を逆層の ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN) カラムにより、H₂O で溶出しフラクション 1, 2 に分画した。フラクション 2 をシリカゲルカラムにより CH₃Cl-MeOH 混液で精製した結果、乾燥金線蓮 1 g から 180 mg の kinsenoside を単離することに成功した。このことから次のことが明らかとなった。従来 kinsenoside はシリカゲルカラムによりメタノール含有溶媒で精製が行われてきた。本法によると kinsenoside のラクトン環が開環し対応するメチルエステルが多量に精製し、生植物に存在する kinsenoside の量が極端に減少したものと推察できる。

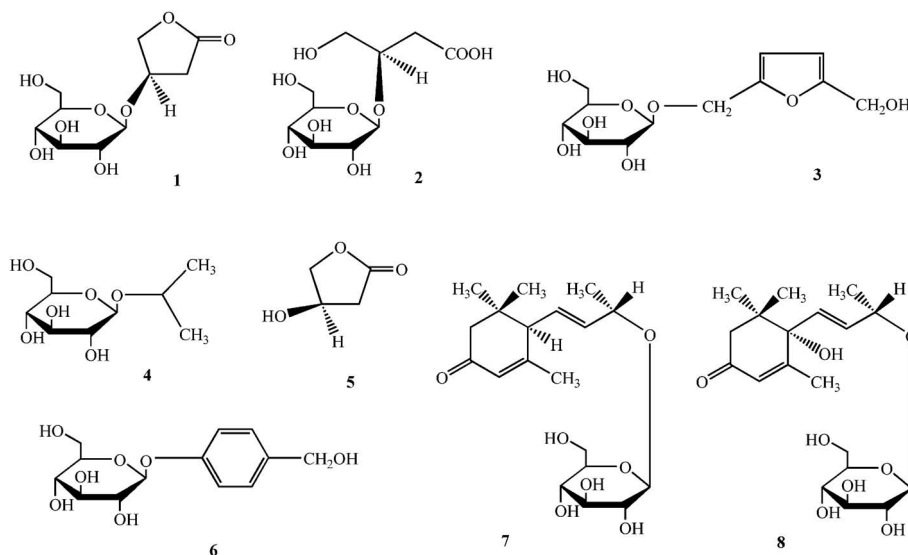


Fig. 27. Components of *Anoectochilus formosanus*

このことを証明するため kinsenoside メタノール溶液にシリカゲルを少量加えて放置することによりラクトン環が開環したメチルエステルを生成することを証明した。このことからシリカゲルが触媒となりラクトン環が開き、同時に多量のメタノールと反応してメチルエステルを生じることを明らかにした。

Kinsenoside と同様なラクトン環を有する天然物は多いので、活性成分を探索する場合、精製法に慎重な注意を払う必要があろう。

6-2-4-3. 金線蓮の代替品, *Goodyera schlechtendalians* REICHB. fil., *G. matsumurana* SCHLTR, *G. discolor* KER-GAW の成分探索^{90,91} 金線蓮の代替品として用いられている、近縁種の *G. schlechtendalians* Reichb. fil., *G. matsumurana* Schltr, *G. discolor* Ker-Gawl の3種について金線蓮同様に含有成分を精製単離した。その結果1種の主成分である化合物 **9** と少量の化合物 **10** を単離し、各種スペクトルにより構造決定した (Fig. 39)。化合物 **9** は kinsenoside の光学異性体で 3-(*S*)-3- β -D-glucopyranosyloxybutanolide (goodyeroside A と命名) と決定した。一方化合物 **10** はラクトン環が開いた 3-(*S*)-3- β -D-glucopyranosyloxy-4-hydroxybutanoic acid と決定した。Kinsenoside 同様、化合物 **9** のメタノール溶液と触媒量のシリカゲルを反応させるとメチルエステルが生じることから化合物 **10** は kinsenoside の異性体であることが明らかとなった (Fig. 28)。

6-2-4-4. Kinsenoside, Goodyeroside A の肝障害改善作用^{88,91,92} 6-2-2 項と同様なアッセイ法により金線蓮の各フラクションの四塩化炭素処理初代肝細胞による活性を指標として精製を行った結果、

活性フラクションは *n*-ブタノール層及び水層に集中していることから、その主成分 kinsenoside を単離精製することに成功した。また、前述の通り単離法を改善した結果高収率で kinsenoside を得たので肝障害改善作用を検討した。

Kinsenoside と goodyeroside A の肝細胞庇護作用を調べた結果が Table 8 である⁶。四塩化炭素を添加した肝細胞においては LDH, GOT, GPT 値がいずれも著しい上昇をみた。Kinsenoside と goodyeroside A はいずれもコントロール群に比べて LDH, GOT, GPT 値が用量依存的に低下した (Table 8)。このことから kinsenoside と goodyeroside A はいずれも肝細胞庇護作用を有することが明らかとなった。

次に高脂肪食ラットを用いて kinsenoside と goodyeroside A の脂質代謝に対する影響を調べた。その結果 goodyeroside A 処理区ではコントロール群と変異がないものの、kinsenoside 投与群では体重及び肝重量が明らかに減少した。一方、肝臓中の中性脂肪の量を測定した結果 kinsenoside 投与群においてのみ明らかな減少をみた。

また、アウロチオグルコースで誘発した肥満モデル

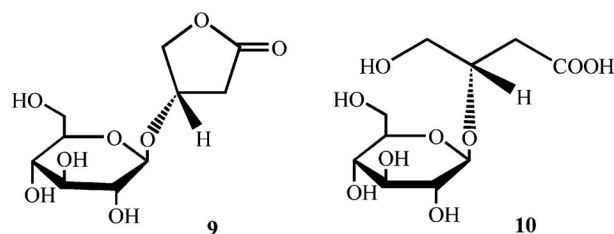


Fig. 28. Structures of Goodyeroside A and B from *Goodyera schlechtendalians*

Table 8. Hepatoprotective Activity of Kinsenoside (1) and Goodyeroside A (9) on CCl₄-induced Cytotoxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes

| Samples | Concentration (mg/ml) | LDH (units/ml) | GOT (units/ml) | GPT (units/ml) |
|---------|-----------------------|--------------------|------------------|----------------|
| Normal | 180.28 ± 6.62 | 58.20 ± 0.48 | 8.55 ± 0.48 | |
| Control | 1987.58 ± 44.36** | 519.40 ± 57.38** | 97.92 ± 4.81** | |
| 1 | 0.1 | 1395.78 ± 162.01** | 223.57 ± 32.25** | 79.30 ± 8.31 |
| | 1.0 | 1327.15 ± 112.27** | 215.55 ± 23.26** | 76.63 ± 6.67 |
| | 10.0 | 1285.40 ± 118.19** | 195.18 ± 31.54** | 68.45 ± 13.23* |
| 2 | 0.1 | 1663.30 ± 85.63** | 297.60 ± 29.44** | 88.18 ± 4.98 |
| | 1.0 | 1228.38 ± 153.39** | 209.23 ± 24.78** | 72.43 ± 6.78* |
| | 10.0 | 1175.45 ± 110.25** | 200.30 ± 24.68** | 70.40 ± 6.82* |

** $p < 0.01$ vs. Normal group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control group.

Table 9. Anticonvulsant Effect of Goodyerin on Picrotoxin (5 mg/kg *i.p.*) Induced Seizure in Rats

| | Onset (min) | % of control | Duration (s) | % of control |
|--------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| Control | 17.74±0.75 | | 17.27±1.35 | |
| Goodyerin 25 mg/kg | 20.78±1.01 ^{a)} | 117 | 12.70±1.36 ^{a)} | 61 |
| Goodyerin 55 mg/kg | NC | | NC | |

a) $p < 0.05$ vs. Control group. NC: no convulsions.

ルマウスを用いて kinsenoside と goodyeroside A の影響を調査した結果、kinsenoside には高脂肪食ラット同様に、体重と肝重量の低下及び子宮周辺の脂肪重量低下が認められた。一方、肝臓中の中性脂肪量を測定した結果コントロール群に比べ中性脂肪量の低下が認められ、用量依存的に低下した。

以上の結果を組織学的に調査したのが Fig. 29 である。Kinsenoside 投与により明らかに脂肪細胞が用量依存的に減少していることが伺える。

脂質代謝に関しては kinsenoside のみが活性を示し、異性体の goodyeroside A はなんら効果を示さなかった。このことから金線蓮の代替品として *Goodyera* 属植物が利用されているが、資質代謝に関しては全く効果がないものと推察される。Goodyeroside と kinsenoside は光学異性体で、それぞれ *Goodyera* 属と *Anoectochilus* 属植物から単離しており、植物学的にも興味を持たれると同時に、構造活性相関も大いに興味を持たれるところである。Kinsenoside と異性体の goodyeroside は肝障害細胞試験において活性が認められたので、臨床的にも肝障害改善作用を示すものと期待している。今後作用メカニズムの全容を解明し、肝障害改善薬の開発に資する必要がある。

6-2-5. *Goodyera* 属植物のフラボノイド成分とその特異な薬理活性^{90,93)} *Anoectochilus* 属植物には見い出せなかった goodyerin は *Goodyera* species から単離構造決定したフラボノイドの C-C 配糖体である。本化合物は Table 9 にみられるように強い抗痙攣作用が認められた。なお、行動薬理学的に運動量と睡眠増強作用も調査したが本稿では割愛する。詳細は論文 92 に記載しているので参照されたい。

ラン科植物にはセッコク、オオバナセッコク、シラン、テンマ等が薬用として用いられるが、薬用としての数はそう多くはない。今回金線蓮 (*Anoec-*

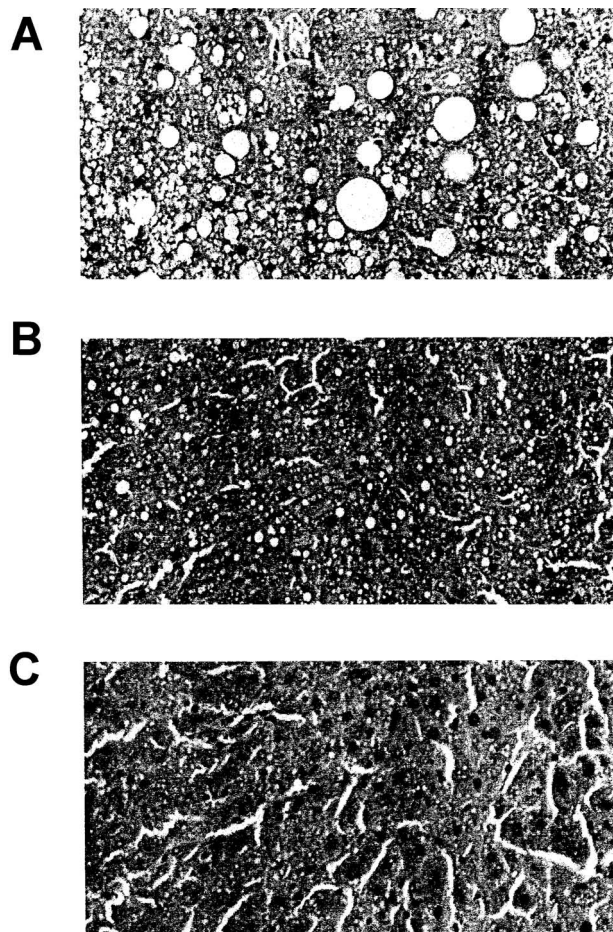


Fig. 29. Photomicrographs of Histopathological Changes Showing Effect of Kinsenoside in the Liver of Aurothiogluucose-induced Obese Mice after 6 Weeks

A: Control Group; B: 0.1% Kinsenoside Group; C: 0.2% Kinsenoside Group

tochilus formosanus) と代替生薬 (*Goodyera schlechtendaliana*) について成分探索とそれらの薬理作用を解明することに成功した。また、生薬全般に言えることであるが環境の激変、気候の変動、採取による生薬資源の枯渇問題は深刻を極めており、甘草、麻黄は最たるものであろう。金線蓮についても例外ではない。そこでまず大量培養法を確立し、それを用いて活性成分を探索することを行った。ま

た、活性成分探索方法も最新の注意を払う必要が有る。生薬の修治による二次変化はよく知られているが、本稿で紹介したようにシリカゲルが触媒となり開環したり、エステル化が起きたりし、本来の活性に変動が生じることも少なくないものと推測される。

謝辞 本研究は九州大学大学院薬学研究院森元聡助教授、田中宏幸助教授、田浦太志助手を中心に遂行されたものでここに深く感謝致します。また、大麻研究、モノクローナル抗体関連研究、サフラン、金線蓮等の活性成分研究に関する共同研究を遂行頂いた関係各位にこの場をお借りして深謝致します。また、献身的に研究をサポート頂いた大学院生、学部学生諸氏に厚くお礼申し上げます。なお、本稿はアジアコアプログラムの研究・教育の一環として執筆したもので、学術振興会へ深謝致します。

REFERENCES

- 1) Hatano K., Shoyama Y., Nishioka I., *Plant Cell Rep.*, **6**, 446–448 (1987).
- 2) Hatano K., Shoyama Y., Nishioka I., *Planta Med.*, **54**, 152–155 (1988).
- 3) Yamada Y., Shoyama Y., Nishioka I., *Shoyakugaku Zasshi*, **45**, 289–292 (1991).
- 4) Shoyama Y., Nishioka I., Hatano K., *Biotechnol. Agric. Forestry*, **15**, 58–72 (1991).
- 5) Shoyama Y., Nagano M., Nishioka I., *Planta Med.*, **48**, 124–128 (1983).
- 6) Matsumoto M., Shoyama Y., Nishioka I., Iwai H., Wakimoto S., *Plant Cell Rep.*, **7**, 636–638 (1989).
- 7) Matsumoto M., Shoyama Y., Nishioka I., *Phytochemistry*, **28**, 2331–2332 (1989).
- 8) Shoyama Y., Tareno R., Nishioka I., *Shoyakugaku Zasshi*, **41**, 313–317 (1987).
- 9) Hatano K., Shoyama Y., Nishioka I., *Planta Med.*, **56**, 131–132 (1990).
- 10) Shoyama Y., Hatano K., Nishioka I., *Planta Med.*, **48**, 14–16 (1983).
- 11) Shoyama Y., Hatano K., Nishioka I., *Planta Med.*, **47**, 103–105 (1983).
- 12) Hatano K., Shoyama Y., Nishioka I., *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 188–192 (1986).
- 13) Hatano K., Shoyama Y., Nishioka I., *Shoyakugaku Zasshi*, **45**, 203–205 (1991).
- 14) Shoyama Y., Nishioka I., Hatano K., *Biotechnol. Agric. Forestry*, **19**, 464–480 (1992).
- 15) Shoyama Y., Nishioka I., Fujioka N., Kohida H., Yamasaki K., *Shoyakugaku Zasshi*, **41**, 333–337 (1987).
- 16) Shoyama Y., Kamura K., Nishioka I., *Planta Med.*, **54**, 155–156 (1988).
- 17) Shoyama Y., Matsushita H., Zhu X. X., Kishira H., *Biotechnol. Agric. Forestry*, **31**, 333–356 (1995).
- 18) Shoyama Y., Zhu X. X., Nakai R., Shiraiishi S., *Plant Cell Rep.*, **16**, 450–453 (1997).
- 19) Yamada Y., Shoyama Y., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 204–206 (1991).
- 20) Shoyama Y., Fukada T., Tanaka T., Kusai A., Nojima K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1051–1053 (1993).
- 21) Shoyama Y., Sakata R., Isobe R., Murakami H., Kusai A., Nojima K., *Org. Mass Spectra*, **28**, 987–988 (1993).
- 22) Goto Y., Shima Y., Morimoto S., Shoyama Y., Murakami H., Kusai A., Nojima K., *Org. Mass Spectra*, **29**, 668–671 (1994).
- 23) Sakata R., Shoyama Y., Murakami H., *Cytotechnology*, **16**, 101–108 (1994).
- 24) Tanaka H., Goto Y., Shoyama Y., *Immunoassay*, **17**, 321–342 (1996).
- 25) Shoyama Y., Fukada T., Murakami H., *Cytotechnology*, **19**, 55–61 (1996).
- 26) Shiyama M., Shoyama Y., Murakami H., Shinohara H., *Cytotechnology*, **18**, 153–158 (1996).
- 27) Tanaka H., Fukuda N., Shoyama Y., *Cytotechnology*, **29**, 115–120 (1999).
- 28) Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y., *Cytotechnology*, **34**, 197–204 (2000).
- 29) Morinaga O., Tanaka H., Shoyama Y., *J. Chromatogr. B.*, **830**, 100–104 (2006).
- 30) Tanaka H., Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1391–1393 (1998).
- 31) Xuan L., Tanaka H., Xu Y., Shoyama Y., *Cytotechnology*, **29**, 65–70 (1999).
- 32) Morinaga O., Tanaka H., Shoyama Y., *Analyst*, **125**, 1109–1113 (2000).
- 33) Morinaga O., Nakajima S., Tanaka H., Shoyama Y., *Analyst*, **126**, 1372–1376 (2001).
- 34) Zhu S., Shimokawa S., Tanaka H., Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 66–71 (2004).
- 35) Kim J. S., Tanaka H., Shoyama Y., *Analyst*,

- 129, 87–91 (2004).
- 36) Lu Z., Morinaga O., Tanaka H., Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 862–866 (2003).
- 37) Tanaka H., Putalun W., Tsuzaki C., Syoyama Y., *FEBS Lett.*, **404**, 279–282 (1997).
- 38) Shan S., Tanaka H., Shoyama, Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 221–223 (1999).
- 39) Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1157–1160 (2001).
- 40) Putalun W., Tanaka H., Yahara S., Lhieochaiphon S., Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 72–75 (2000).
- 41) Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y., *Analyst*, **125**, 1425–1429 (2000).
- 42) Shan S. J., Tanaka H., Shoyama Y., *Anal. Chem.*, **73**, 5784–5790 (2001).
- 43) Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y., *J. Nat. Prod.*, **63**, 283–285 (2000).
- 44) Putalun W., Taura F., Qing W., Matsushita H., Tanaka H., Shoyama Y., *Plant Cell Rep.*, **22**, 344–349 (2003).
- 45) Morinaga O., Zhu S., Tanaka H., Shoyama Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 687–692 (2006).
- 46) Putaeun W., Tanaka H., Shoyama Y., *Cytotechnology*, **31**, 151–156 (1999).
- 47) “Analysis of Natural Glycosides,” ed by Shoyama Y., Research Signpost, Kerala, 2007, pp. 144–145.
- 48) Putalun W., Morinaga O., Tanaka H., Shoyama Y., *Analysis*, **15**, 112–116 (2004).
- 49) Putalun W., Tanaka H., Shoyama Y., *Phytochem. Analysis*, **16**, 370–374 (2005).
- 50) Putalun W., Fukuda N., Tanaka H., Shoyama Y., *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1338–1341 (2004).
- 51) Shoyama Y., *Wakojunyakujiho*, **75**, 12–13 (2007).
- 52) Yamauchi T., Shoyama Y., Azuma T., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1075–1076 (1967).
- 53) Shoyama Y., Yagi M., Nishioka I., Yamauchi T., *Phytochemistry*, **14**, 2189–2192 (1975).
- 54) Shoyama Y., Hirano H., Nishioka I., *Phytochemistry*, **23**, 1909–1912 (1984).
- 55) Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. I., *Nature*, **346**, 561–564 (1990).
- 56) Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaar M., *Nature*, **365**, 61–65 (1993).
- 57) Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R., *Science*, **258**, 1946–1949 (1992).
- 58) Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89–97 (1995).
- 59) Taura F., Morimoto S., Shoyama Y., Mechoulam R., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9766–9767 (1995).
- 60) Taura F., Morimoto S., Shoyama Y., *J. Biol. Chem.*, **271**, 17411–17416 (1996).
- 61) Morimoto S., Komatsu K., Taura F., Shoyama Y., *J. Nat. Prod.*, **60**, 854–857 (1997).
- 62) Morimoto S., Komatsu K., Taura F., Shoyama Y., *Phytochemistry*, **49**, 1525–1529 (1998).
- 63) Sirikantaramas S., Morimoto S., Shoyama Y., Isikawa Y., Wada Y., Shoyama Y., Taura F., *J. Biol. Chem.*, **17**, 39767–39774 (2004).
- 64) Shoyama Y., Takeuchi A., Taura F., Tamada T., Adachi M., Kuroki R., Shoyama Y., Morimoto S., *Acta Crystallogr. F*, **61**, 799–801 (2005).
- 65) Sirikantaramas S., Taura F., Tanaka Y., Ishikawa Y., Morimoto S., Shoyama Y., *Plant Cell Physiol.*, **46**, 1578–1582 (2005).
- 66) Morimoto S., Tateishi N., Matsuda T., Tanaka H., Taura F., Furuya N., Matsuyama N., Shoyama Y., *J. Biol. Chem.*, **273**, 12606–12611 (1998).
- 67) Morimoto S., Tateishi N., Inuyama M., Taura F., Tanaka H., Shoyama Y., *J. Biol. Chem.*, **274**, 26192–26198 (1999).
- 68) Sasaki K., Taura F., Shoyama Y., Morimoto S., *J. Biol. Chem.*, **275**, 27466–27472 (2000).
- 69) Morimoto S., Suemori K., Moriwaki J., Taura F., Tanaka H., Aso M., Tanaka M., Suemune H., Shimohigashi Y., Shoyama Y., *J. Biol. Chem.*, **276**, 38179–38184 (2001).
- 70) Morimoto S., Suemori K., Taura F., Shoyama Y., *J. Nat. Prod.*, **66**, 987–989 (2003).
- 71) Zhang Y., Shoyama Y., Sugiura M., Saito H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 217–221 (1994).
- 72) Sugiura M., Saito H., Abe K., Shoyama Y., *Phytother. Res.*, **9**, 100–104 (1995).
- 73) Sugiura M., Shoyama Y., Zhang Y., Saito H.,

- Abe K., *Int. Acad. Biomed. Drug Res., Basel, Karger*, **11**, 270–276 (1996).
- 74) Sugiura M., Shoyama Y., Saito H., Abe K., *J. Pharmacol.*, **67**, 395–397 (1995).
- 75) Sugiura M., Shoyama Y., Saito H., Abe K., *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 703–707 (1994).
- 76) Abe K., Sugiura M., Shoyama Y., Saito H., *Brain Res.*, **787**, 132–138 (1998).
- 77) Abe K., Sugiura M., Yamaguchi S., Shoyama Y., Saito H., *Brain Res.*, **851**, 287–289 (1999).
- 78) Konoshima T., Takasaki M., Tokuda H., Morimoto S., Tanaka H., Kawata E., Xuan L. J., Saito H., Sugiura M., Molnar J., Shoyama Y., *Phytother. Res.*, **12**, 400–404 (1998).
- 79) Soeda S., Ochiai T., Paopong L., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H., *Life Sci.*, **69**, 2887–2898 (2001).
- 80) Ochiai T., Soeda S., Ohno S., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H., *Neurochem. Int.*, 321–330 (2004).
- 81) Ochiai T., Ohno S., Soeda S., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H., *Neurosci. Lett.*, **362**, 61–64 (2004).
- 82) Soeda S., Ochiai T., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H., *Nova Sci. Publishers, New York*, 139–156 (2005).
- 83) Du X. M., Yoshizawa T., Shoyama Y., *Phytochemistry*, **49**, 1925–1928 (1998).
- 84) Du X. M., Sun N. Y., Irino N., Shoyama Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1803–1804 (2000).
- 85) Du X. M., Sun N. Y., Hayashi J., Chen Y., Sugiura M., Shoyama Y., *Phytother. Res.*, **17**, 30–33 (2003).
- 86) Furusho T., Hayashi J., Kashiwagi S., Du X. M., Shoyama Y., *Rinsho to Kenkyu*, **76**, 206–211 (1999).
- 87) Du X. M., SUN N. Y., Furusho N., Hayashi J., Shoyama Y., *Am. J. Chin. Med.*, (2007) (in press).
- 88) Du X. M., Irino N., Hurusyo N., Hayashi J., Shoyama Y., *J. Nat. Med.*, (2007) (in press).
- 89) Du X. M., Sun N. Y., Tamura T., Mohri A., Sugiura M., Yoshizawa T., Irino N., Hayashi J., Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 65–69 (2001).
- 90) Du X. M., Sun N. Y., Shoyama Y., *Phytochemistry*, **53**, 997–1000 (2000).
- 91) Du X. M., Sun N. Y., Chen Y., Irino N., Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 731–734 (2000).
- 92) Du X. M., Sun N. Y., Takizawa N., Guo Y. T., Shoyama Y., *Phytother. Res.*, **16**, 261–263 (2002).