

Title	ライフサイエンスを指向した植物エキスライブラリーの構築とその活用についての研究
Author(s)	河上, 仁美
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82191
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

ライフサイエンスを指向した
植物エキスライブラリーの構築と
その活用についての研究

薬学研究科 創成薬学専攻

薬用植物資源学分野

河上 仁美

略語一覽

略語	英語名
EU	Endotoxin unit
LPS	Lipopolysaccharide
LAL	Limulus ameocyte lysate
HA	Hyaluronic acid
HAase	Hyaluronidase
IC ₅₀	50% Inhibition Concentration
TLC	Thin-layer chromatography
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRESIMS	High-resolution-electron-spray mass spectrometry
UV	Ultraviolet
CD	Circular dichroism
NMR	Nuclear magnetic resonance
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
COSY	Correlated spectrometry
NOESY	Nuclear Over Hauser effect

目次

序論.....	1
本論	
第 1 章 植物エキスライブラリーにおける植物採取及びエキス作製	3
第 2 章 食経験・食薬区分情報の付加.....	17
第 3 章 エンドトキシン活性情報の付加.....	22
第 1 部 小括	49
第 2 部 植物エキスライブラリーのスクリーニングへの応用	
第 1 章 スクリーニング系の構築	51
第 2 章 ライブラリーエキスを用いた HAase 阻害活性スクリーニング	60
第 3 章 シダ植物に着目した HAase 阻害活性成分探索	71
第 4 章 単離化合物の酵素阻害活性について	111
第 2 部 小括	119
総括.....	122
謝辞.....	127
スペクトル値.....	128
引用文献	137
付録.....	147

序論

天然由来の化合物を使用した、医薬をはじめとした様々な分野におけるスクリーニングに現在関心が集まっている。天然物は骨格の多様性に非常に富んでおり、合成することの困難な化合物も数多く存在している。Newman らの報告によれば 1981 年から 2006 年の間に薬剤開発のソースまたはリード化合物となった化合物のうち、半数以上が天然物由来または天然物誘導体であり、天然物は薬剤開発の大きな足掛かりとなることが示されている[1]。また、化学系情報検索ツールである Scifinder 上で 1988 年から 2020 年間に出版された論文を検索すると、'natural products' 及び 'screening' を含むものは 2000 年代から急激に増え始め、2020 年までに合計約 23,000 本が投稿されている。これらのことは天然物への関心の高さを表すものであると同時に、スクリーニングで使用するライブラリーの重要性も増していると考えられる。

スクリーニングで使用するライブラリーは単一の化合物からなる化合物ライブラリーと抽出液等混合物を含むライブラリーに大別される。現在国内には東京大学[2]、理化学研究所[3]、バイオ産業情報化コンソーシアム[4]等の天然由来化合物を含む大規模な化合物・抽出物ライブラリーが存在している。筆者が所属する国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センターでは、2013 年より日本国内の野生植物を主な原料としたエキスライブラリーの構築を開始した。現在までに 14,000 点を超えるサンプルを作製しており、国内に存在する植物エキスライブラリーとしては最大級の規模である[5]。ライブラリーを構成している植物エキスは分画せずに使用しているため、多成分系であることが一つの大きな特徴となっている。活性成分を単離する作業は必要になるものの、エキス中に未知の化合物が含まれている可能性があること、エキス自体を利用することも可能であるといった非常にユニークなライブラリーとなっている。

人類は天然物の宝庫である植物から多大な恩恵を受けてきた。現在、地球上には維管束植物だけでも 23 万種以上[6]が生育しているとされるが、生物多様性条約等の観点から海外産資源の入手・利用は困難になりつつある。一方日本国内には 7,500 種の植物[7]が生育しているとされているが、現在でも新種の植物が発見され続けている

ことから実際の数はいくつかが予想される。日本国内種の植物の中には現在未活用の種も多くあり、これらは非常に魅力的な天然資源であると言える。

本エキスライブラリーは現在、大学、研究所、企業等な機関におけるスクリーニングに活用されており、その分野も創薬(抗菌、抗ウイルス、神経保護作用等)、食品(抗酸化、抗菌等)、化粧品、動物用薬品関連分野等多岐にわたっている。そして抗 C 型肝炎ウイルス活性化化合物の探索や、変形性膝関節症に対する活性物質の探索等の分野においてその成果が報告がされている[8, 9]。

本論文は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センターにて実施している、薬用植物スクリーニングプロジェクトにおけるエキスライブラリーの構築からスクリーニングへの応用までをまとめたものである。以下に概略を述べる。

第 1 部ではエキスライブラリーの構築について述べる。すなわち第 1 節ではサンプル植物の採取及びエキスの作製とライブラリーの全体像について、第 2 章及び 3 章ではそれぞれエキスに対する食薬区分・食経験情報、エンドトキシン活性情報の付加について述べる。

サンプルに対する情報付加はエキスライブラリー構築において、サンプルの作製と同様に重要な項目である。これはエキス数が増えるにつれて、スクリーニングを実施するユーザー側の作業負担も増加するため、サンプルの取捨選択のための情報量を増やす必要があるためである。当センターではこの他に、ライブラリーエキスに対し細胞毒性試験や LC-MS 情報など蓄積も実施している。

第 2 部ではエキスライブラリーを活用したスクリーニングについて述べる。指標としてヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼに対する阻害活性を用い、シダ植物エキスに対してスクリーニングを実施した。ヒアルロニダーゼは炎症やアレルギー反応にも関与しているとされ、その阻害剤にはアレルギーへの阻害活性が期待される。スクリーニングの結果、ヒアルロニダーゼ阻害活性の認められたシダ植物エキスに対して成分探索を実施し、新規を含む化合物を単離した。単離した化合物及びその関連化合物はヒアルロニダーゼに対する酵素阻害活性及び阻害形式を検討した。

本論

第 1 部 植物エキスをライブラリー構築

第 1 章 植物エキスをライブラリーにおける植物採取及びエキス作製

背景と目的

第 1 部第 1 章では植物エキスをライブラリーの原料となる植物の採取、およびエキスの作製、構築したライブラリーの全体像の解析について述べる。

原料となる植物の選定はライブラリーの方向性を決める重要な作業である。国内採取の原料植物は薬用非薬用にかかわらず幅広く使用し、生薬や一部海外産植物エキスも使用している。ただし天然資源の保全の観点より、希少植物の採取はなるべく避け、各地方でよく見られる植物を中心に採取している。また原料植物採取の特徴的な点として、以下の 2 点が挙げられる。

1 点目はシダ植物の採取に力を入れている点である。シダ植物は被子植物よりも進化の前段階にあり、pterodin 類、acylphloroglucinol 類を始め (Fig.1-1-1) 被子植物には見られない化合物を含む傾向があるとされ[10]、スクリーニングによる研究開発に適した植物種である。日本は温暖湿潤な気候で国土の大きさに対するシダ植物の種類は海外と比較しても非常に多い。しかしシダ植物は花をつけず、種間雑種を作りやすいという特徴があるため、種同定が極めて困難な場合がある。そのため、研究対象として積極的に用いられてこなかったという歴史がある。

2 点目は同一種を繰り返しサンプリングしている点である。植物は採取した地域、時期等によって成分に変異が生じる。例として Table 1-1-1 に日本各地で採取したアオツヅラフジの葉由来のエキスの一酸化窒素産生抑制試験の結果を示す。同じ植物の部位由来のエキスであっても NO 産生抑制率は 19.1~62.2%と幅広い値を示し、エキス成分の変動の関与が示唆された[11]。

なお、上記 2 点に加え原料植物の種同定は非常に重要なステップであるため、特に慎重に行っている。野外での採取では各地域における植物の専門家に同行していただき、植物の種同定を行っている。また標本作製を行い、採取地での判断が困難な場合は後日再度の鑑定を行っており、細心の注意を払っている。

また、抽出溶媒の種類により抽出エキスの含有成分は大きく変わることが知られている。エーテル類、アセトン、アルコール類、水の順に極性の低い化合物が抽出される[12]。メタノールは極性の高い有機溶媒で、植物を始め粗抽出物を得る溶媒として非常によく使われており、低～高極性の広範囲の化合物を抽出することが可能である。更に加温して使用することにより化合物の溶解性はさらに高めることができる。このため、本ライブラリーではメタノールを使用した加熱還流抽出法を用いた。メタノールを用いて抽出される植物成分として脂質、テルペノイド類、アルカロイド、フラボノイド、配糖体、タンニン、糖類などが挙げられる。一方揮発性の高いモノテルペンなどの低分子量化合物、*isothiocyanate* などの含硫化合物、油脂類は揮発・酸化・分解する場合があります、多糖類や塩類等の抽出の難しい化合物もある[12-14]。

このように採集、抽出した植物エキ斯拉イブラリーについて、その全体像をつかむため、ライブラリー構成植物の内訳や多様度について検討を行った。単一化合物のライブラリーで用いる物理化学的な指標による検討は、混合物である植物エキスの場合には適応は難しい。そこで原料とした植物の分類学的な切り口に着目し、その多様度について検討を行った。

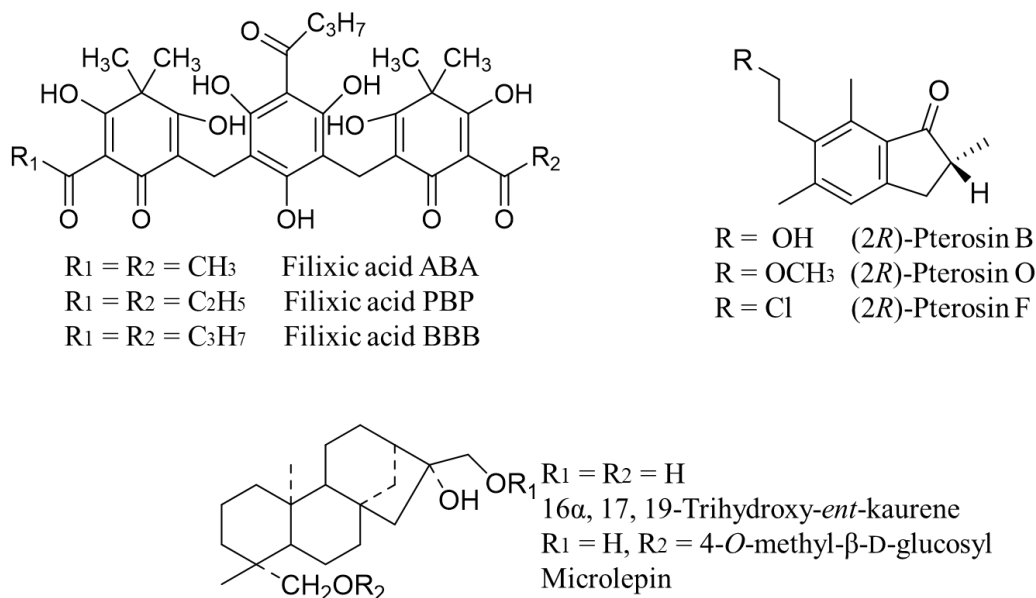


Fig. 1-1-1 Examples components isolated from ferns

Table 1-1-1. Ratio of NO production inhibition and cell viability with leaf extract of *Cocculus trilobus* (Thunb.) DC [11]

No.	採集地点	都道府県	RAW264.7生存率(%) (100 µg/mL)	NO産生阻害率(%) (100 µg/mL)
1	ひたちなか市	茨城県	48.8	62.2
2	石岡市	茨城県	102.6	23.8
3	桜川市	茨城県	31.9	63.1
4	桜川市	茨城県	92.2	35.0
5	桜川市	茨城県	102.9	26.0
6	桜川市	茨城県	101.8	19.1
8	つくば市	茨城県	102.8	48.0
9	君津市	千葉県	105.5	19.2
10	中種子町	鹿児島県	102.8	59.2

淵野裕之ら. 薬用植物スクリーニングプロジェクトにおける植物エキスイブラリーの基盤構築とその多様性について, 日本生薬学会 64 回年会, 千葉, 2017 年 9 月 より転載

実験方法

植物の採集方法

エキス原料となる植物の野外採取時には採取日時及び GPS データを控え、再度の採取への体制を整えた。採種植物の同定は確実に言い、その場での同定ができない場合は後日専門家に鑑定を依頼した。また、研究所内にて栽培している薬用植物についても積極的に採取した。

生薬及び海外産植物エキスについて

生薬については当センターでコレクションしているモデル生薬(99 種類 1,106 点)を使用した(Table 1-1-2 参照)。海外産植物エキスはソロモン諸島および高知県立牧野植物園寄託分ミャンマー由来植物エキス(合計約 1,000 点)を使用した。

ライブラリーエキスサンプルの作製方法

野外等で採集した植物サンプルは水洗後、部位ごとの成分差を考慮して分離し 40 °C 96 時間の風乾の後、ミルで粉碎した。粉末サンプル 5 g にメタノール(MeOH) 50 mL 加えマントルヒーターで沸点付近にて 2 時間還流抽出し、濾過し抽出液を得た。ろ液はロータリーエバポレーターにて濃縮乾固し、抽出物を得た。抽出物は DMSO に 40 mg/mL の濃度で溶解させ、フィルターろ過後にクライオチューブにて -20 °C で保管し、ストックソリューションとした。

エキスサンプルの情報管理

全てのサンプルの採取及び作製したエキスの抽出情報はサンプル固有の番号(MPR 番号)で管理した。エキスサンプルの管理及び標本の管理は薬用植物資源研究センター 筑波研究部にて実施した。

エキスサンプルの分譲体制

分注機は Freedom EVO (Tecan, Mannedorf, Switzerland) を、保管システムとして STX1000 (Liconic, Mauren, Liechtenstein) を使用した。DMSO 溶解エキスは 96 ウェルまたは 384 ウェルプレートに分注した状態でユーザーへ分譲するシステムをとってい

る。

サンプルの採取からエキスの分譲までの流れは Fig.1-1-2 及び参考資料(p.8)を参照。

Table 1-1-2. List of crude drugs used in the extract library

イレイセン	ゴシュユ	タイソウ	ボクソク	クジン
エンゴサク	ゴミシ	タクシャ	ボタンピ	ケツメイシ
オウギ	サイコ	チモ	マオウ	コウブシ
オウゴン	サイシン	チョウトウコウ	マシニン	サンキライ
オウバク	サンシシ	チョレイ	モクツウ	ジコッピ
オウレン	サンシュユ	チンピ	モッコウ	シツリシ
オンジ	サンショウ	テンマ	ヤクモソウ	ジャショウシ
カッコン	サンソウニン	トウキ	ヨクイニン	ジンギョウ
カンキョウ	サンヤク	トウニン	リュウガンニク	ゼンコ
カンゾウ	ジオウ	ドクカツ	リュウタン	チクセツニンジン
キキョウ	シコン	ニンジン	レンギョウ	テンモンドウ
キクカ	シャクヤク	バクモンドウ	アカメガシワ	トウガシ
キジツ	シャゼンシ	ハッカ	インチンコウ	トウヒ
キョウカツ	ショウキョウ	ハンゲ	ウイキョウ	ニンドウ
キョウニン	ショウマ	ビヤクシ	ウヤク	バイモ
ケイガイ	シンイ	ビヤクジュツ	オウセイ	ヘンズ
ケイヒ	センキョウ	ブクリョウ	カゴソウ	シゴカ
コウジン	ソウジュツ	ブシ	カシュウ	エゾウコギ
コウボク	ソヨウ	ボウイ	カッコウ	
ゴシツ	ダイオウ	ボウフウ	クコシ	

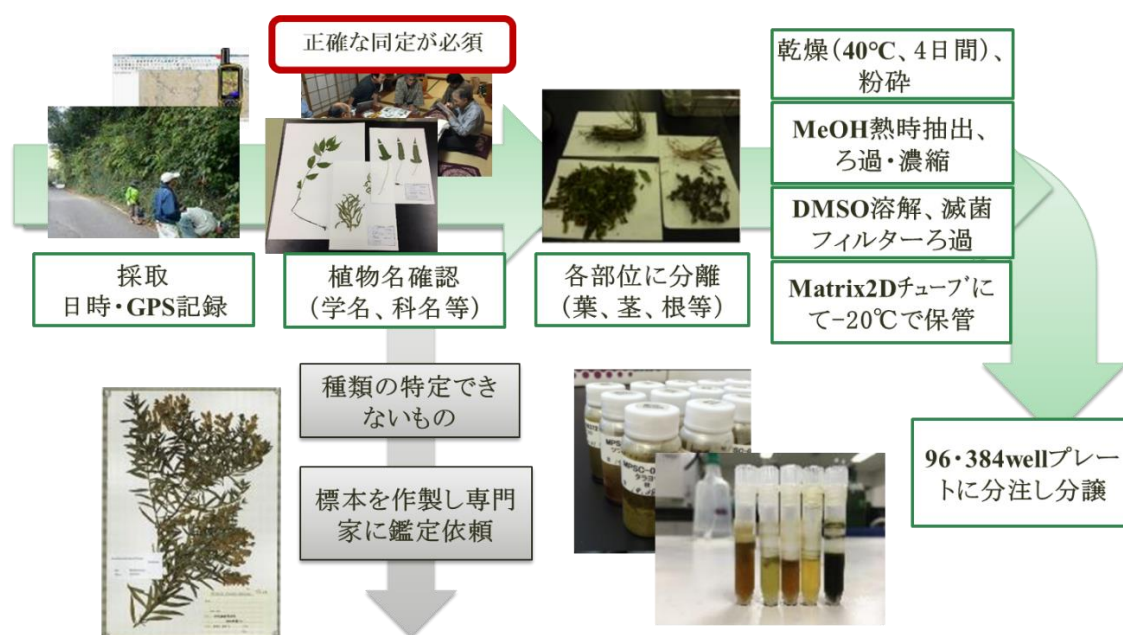


Fig. 1-1-2 Flowchart of library samples from preparation to distribution

参考資料(ライブラリー作製の様子)

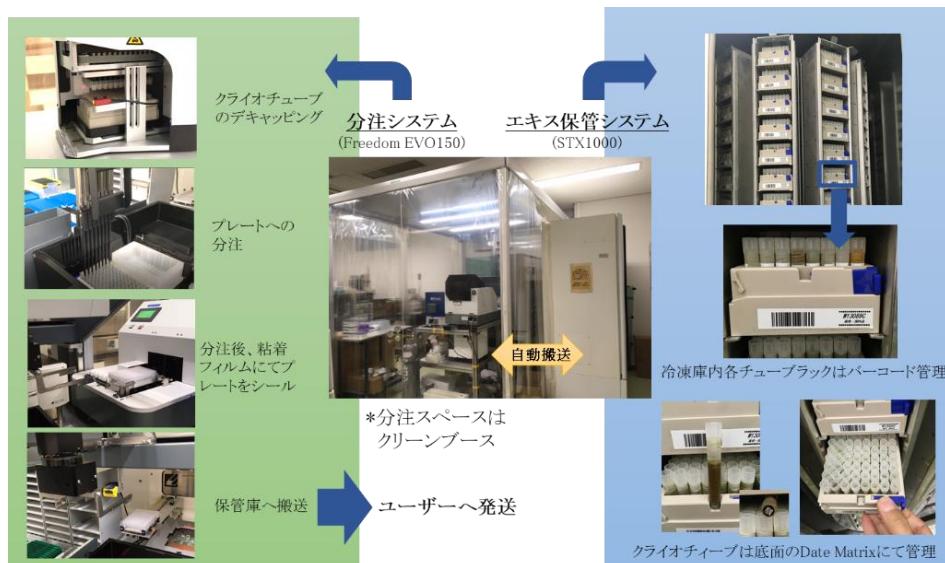
①植物採取から植物サンプルの調製までの様子



②エキス抽出から DMSO 溶解までの様子



③分注からサンプル発送までの流れ



採取植物の多様度の評価

多様度の評価は、Simpson の多様度指数及び分類学的多様度 (Δ^*) の 2 種を用い、Fig.1-1-3 の計算方法により算出した[15-17]。指数の算出において部位分けによる植物種の重複はカウントせず、複数の基原植物を含む生薬(例:カンゾウにおけるウラルカンゾウとスペインカンゾウ)については 1 種類のみを基原植物を使用した場合として計算した。被子植物の分類体系は新エングララーを採用した(分類学的距離については Fig. 1-1-4 を参照)。

Simpsonの多様度指数

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2 = 1 - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i}{N}\right)^2$$

S : 全種数
 n_i : i 番目の種のサンプル数
 N : 全サンプル数

➤ D が1に近いほど多様性が大きい

分類学的多様度(Δ^*)

$$\Delta^* = \sum_{i=1}^S \sum_{j>i}^S \omega_{ij} \cdot n_i \cdot n_j / \sum_{i=1}^S \sum_{j=1}^S n_i \cdot n_j$$

S : 全種数
 ω_{ij} : i 番種と j 番種の分類学的距離
 L : 使用した分類階層数
 (ここでは種から門までの6階層を使用)

$i \geq j \quad 0 \leq \Delta^* \leq L - 1$

➤ Δ^* が $L-1$ に近い程(ここでは5に近い程) 多様性が大きい

Fig. 1-1-3 Calculation methods of diversity index

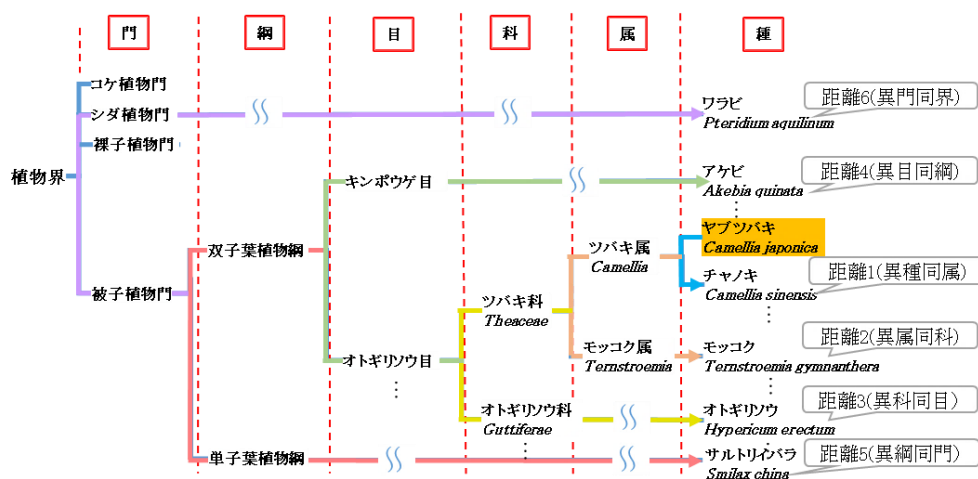


Fig.1-1-4 Calculation method of taxonomic distance based on *Camellia japonica*

(ヤブツバキを基準の種 (i 番目の種) とした場合、他の全てのサンプルに対し上の様に分類学的距離を算出する。同じ種の比較であれば距離は 0 となる。同じ種数でも分類学的距離が離れている植物との比較の場合、数値は大きくなる。)

結果及び考察

植物の採集地、植物種について

野外における採取は 2013 年から 2020 年 10 月までに Fig. 1-1-5 の都道府県にて実施し、合計 5,999 点(種数として 2,419 種)採集した。シダ植物については 2020 年 10 月現在までに 226 種採取した。日本国内には 724 種(亜種・変種を含む)のシダ植物が生育しているとされており[18]、これまでに採取した種は国内に生育する種類の 31.2%にあたる。採取は山地(低山～高山)、平地(市街地、草原、休耕田、沼地、河川敷)、海岸等採取可能な様々な場所で通年を通じて実施した。地域を特色づける植物のみではなく、アカメガシワやオオバコ、ジウモンジシダ等日本各地で生育している植物についても各地で積極的に採取し、ライブラリーのベースとなる普通種の網羅にも努めた。



Fig. 1-1-5 Map of collection points in Japan (2013 – Oct. 2020)

The prefectures colored in black indicate the prefectures where the plants were collected.

次に野外採集品 5,999 点の採取地別数を Table 1-1-3 及び Fig. 1-1-6 に示す。関東地域のサンプル数が一番多く全体の約 36%を占め、次に九州地方と北海道地方がそれぞれ約 17%を占めるという結果になった。これは北海道、関東、九州エリアはそれぞれ研究部の所在地であるためである。今後は関西地域や中国地域でのサンプリングが必要になると考えられる。

Table 1-1-3. Number of field collected samples by region

Area	Number
Hokkaido	969
Tohoku	373
Kanto	2,203
Koshinetsu	367
Tokai	140
Hokuriku	193
Kansai	0
Chugoku	0
Shikoku	703
Kyusyu and Okinawa	1,051
Total	5,999

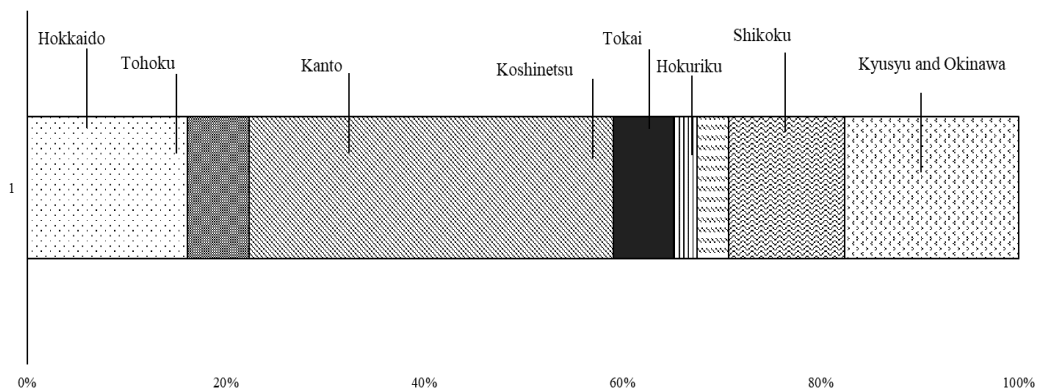


Fig.1-1-6 Percentage of field collected samples by region

植物エキスの作製数

Fig. 1-1-7 に 2013 年から 2020 年 10 月までに作製したエキス数を示す。現在までに作製したエキス数は合計 12,573 点となった(寄託分等のエキス等を含めると合計 14,649 点)。なおエキスの作製は現在も継続している。

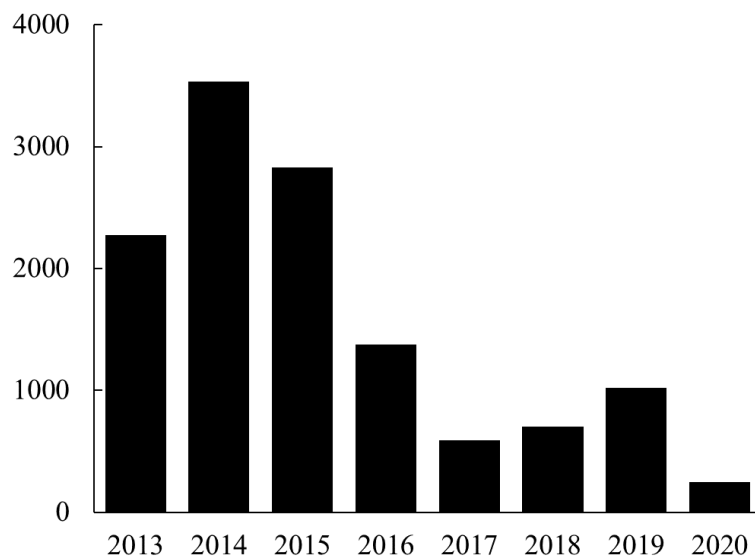


Fig. 1-1-7 Number of library samples extracted per year (2013 – Oct. 2020)

ライブラリーを構成する植物種の多様度について

エキサンプル 14,541 点の入手経路による分類を Fig. 1-1-8 に示す。調査の結果野外採取品が約 60%を占め、続いて研究所栽培品が 20%、生薬が 11%、海外産植物が 7%となった。

次に野外採取品、栽培品、生薬における大まかな植物分類を Fig. 1-1-9 に示す。いずれも双子葉植物が 80%以上を占めており、単子葉植物と合わせた被子植物の割合は野外採取品で 85%、栽培品と生薬に至っては 90%以上であった。裸子植物やシダ植物は被子植物と比較すると世界で生育している種数は 10 分の 1 以下であり [19]、ライブラリーのサンプルの割合はこの状態を反映したものと言える。また、野生品、栽培品、生薬の 3 カテゴリーにおける上位 10 科にはキク科やマメ科等の植物が多いことも特徴的であった (Table 1-1-4 参照)。これもキク科やマメ科は該当する種の数が多い事 [19]、また薬用として使用されている種の割合が他の科よりも多いこと [19] が影響していると考えられた。

野外採取品、栽培品、生薬の 3 カテゴリーのサンプルの多様度について Simpson の多様度指数及び分類学的多様度 (Δ^*) による算出結果を Table 1-1-5 に示す。比較したサンプル数は野生品 3,956 点、栽培品 1,480 点、生薬 1,541 点であった (いずれも部位分けによる種の重複はカウントせず、採取地及び採取時期による種の重複はカウントしている)。

指標として使用している Simpson の多様度指数は D の値が 1 に近いほど、分類学的多様度は Δ^* の値が 5 に近いほど多様度が高いことを示す。検証の結果、3 つの群とも分類学的には高い多様度を持つことが示された。Simpson の多様度指数は確率論を用い、ランダムに選択した 2 つの種が異なる確率をベースにしているため全ての種の扱いが均等となるが、分類学的多様度では分類学的距離の概念が導入されており、分類学的に遠い植物同士の方が多様度が高いと判断されることが最大の違いである。分類学的距離 1 から 6 までの内訳では、いずれの群も距離 4 の割合が多く 50% を超えた。距離 4 は被子植物間の距離 (異目同綱、Fig.1-1-4 参照) に相当し、いずれのグループも被子植物の割合が非常に多いことが判明していることからこの結果が得られたものと考えられた。また野外採取品は他 2 カテゴリーと比較して距離 6 が占める割合が多い傾向にあった。これは被子植物、裸子植物、シダ植物のレベルでの違い

に該当する距離である。野外採取品が被子植物以外の植物群が 10%以上を占めている事などが影響しているものと考えられた。

サンプルを構成する植物の多様度は非常に高いことが今回の検証で判明したことから、今後は異なる科の植物間及び採取条件の異なる同一種間のエキス成分の差異についても検証する必要があると考えられる。

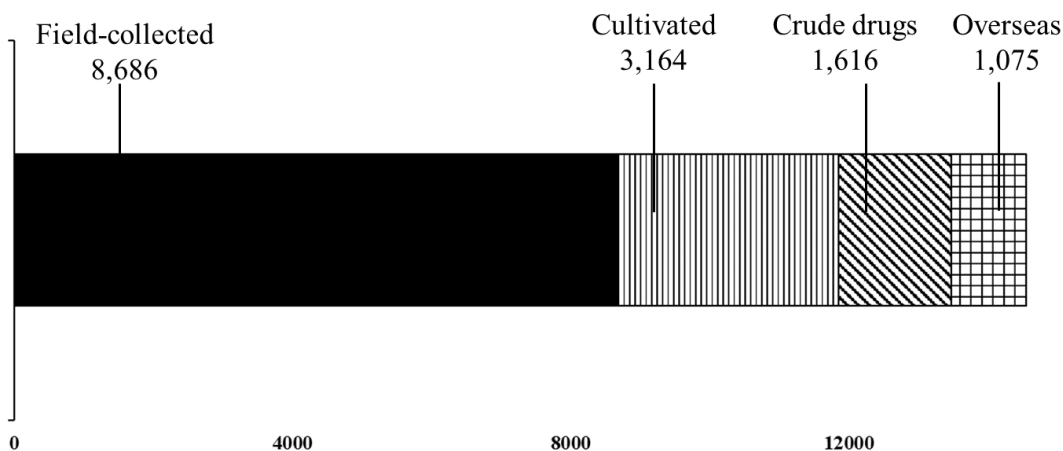


Fig. 1-1-8 Categorization of raw material of plant extract library

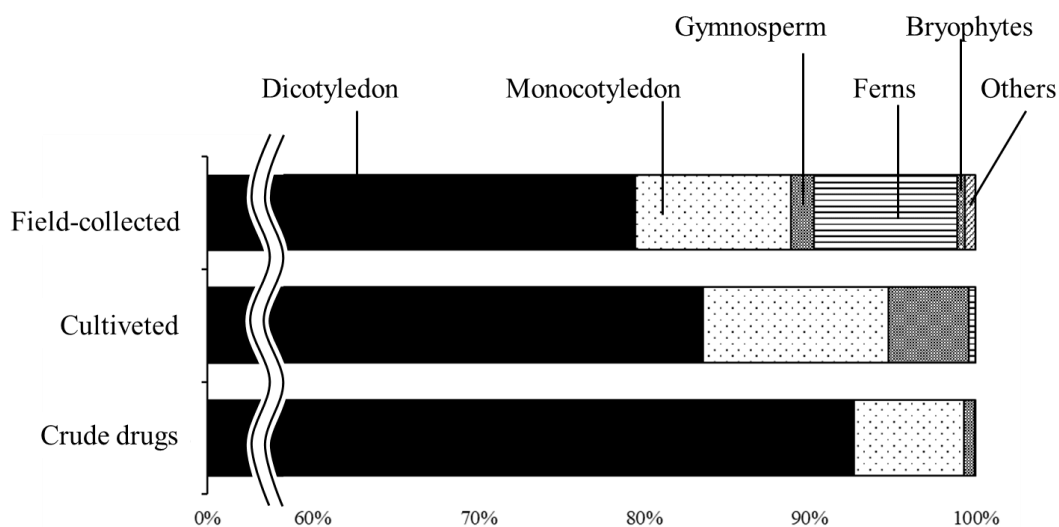


Fig. 1-1-9 Classification of raw material plants that constitute the extract library

Table 1-1-4. Top 10 plants families of wild products, cultivated products, and crude drugs in the extract library

Rank	Field-collected	Cultivated plants	Crude drugs	Total
1	Compositae	Rosaceae	Rutaceae	Compositae
2	Rosaceae	Legminosa	Labiatae	Rosaceae
3	Liliaceae	Compositae	Legminosae	Legminosae
4	Legminosae	Liliaceae	Umbelliferae	Liliaceae
5	Caprifoliaceae	Zingiberaceae	Araliaceae	Rutaceae
6	Saxifragaceae	Rutaceae	Compositae	Caprifoliaceae
7	Dropretericeae	Oleaceae	Magnoliaceae	Labiatae
8	Lauraceae	Caprifoliaceae	Liliaceae	Umbelliferae
9	Ranunculaceae	Magnoliaceae	Ranunculaceae	Lauraceae
10	Labiatae	Labiatae	Zingiberaceae	Ranunculaceae
Total number of families	210	161	91	255

Table 1-1-5. Result of calculation of diversity index in plant extract library

Category	Number of Samples	Number of samples excluding duplicates	Simpson's diversity index <i>D</i>	Taxonomic distinctness						
				Ave	percentage of each distance (%)					
				Δ^*	1	2	3	4	5	6
Field-collected	3956	1803	0.999	4.58	0.2	1.6	3.1	54.9	15.5	24.7
Cultivated	1480	904	0.998	4.33	0.3	1.9	3.2	59.7	26.8	8.1
Crude drug	1540	242	0.988	4.24	0.2	2.1	3.1	66.1	25.1	3.4

第2章 食経験・食薬区分情報の付加

背景と目的

新規の植物素材を商品開発等へ応用する場合、ターゲット植物の使用経験情報は非常に有用な情報となりうる。特に全くの新規の植物原料を使用する場合、成分分析はもちろん様々な安全性試験が必要になるため、何かしらの活用の歴史を持つことは非常に大きなアドバンテージといえる。その中でも食経験及び食薬区分の情報は植物の選定を行う上で基本的な情報とすることができる。

食品と医薬品はそれぞれ「食品衛生法」、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(薬機法)」で規制されている。この両者の区分が食薬区分であり、個々の区分例については厚生労働省から情報が通知されている。この区分には、「専医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト(専医)」[20]、「医薬品的効能効果を標榜しない限り医薬品と判断しない成分本質(原材料)リスト(非医)」[20]の2種がある(Fig. 1-2-1)。「専医」に該当する製品は医薬品としての許可を取得しない限り流通させることはできず、「非医」の品目は医薬品としての効能効果や用法用量を標榜しない限りは食品扱いとすることができるため、流通に際し特に許可等が必要としない。

ここでは前章で構築したエキスライブラリーに対し、食薬区分情報及び食経験情報の付加を実施した。

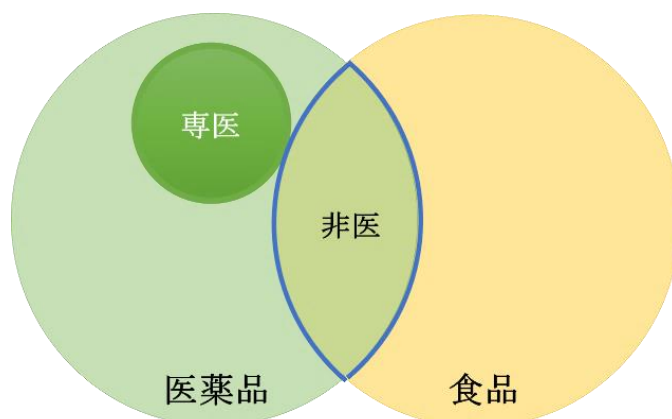


Fig.1-2-1 Image of the borderline of pharmaceuticals to non-pharmaceuticals

実験方法

植物エキ斯拉イブラリー13,457点について、食薬区分情報及び食経験情報の付加を下記のとおり実施した。

食薬区分情報

食薬区分情報は厚生労働省から通知されている、「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」[20]及び「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質(原材料)リスト」[20](共に令和2年7月9日改正版)を元とし、Yリスト[21]及び各種書籍[22, 23]を参考に各原料植物の学名をエキ斯拉イブラリー原料植物の学名と照合した。

食薬区分は当該植物の部位単位で規制を設けているため、複数の部位を混合して抽出したエキスの場合、より重い規制区分に合わせて分類した。例えば非医と専医の両区分を含む植物サンプルエキスの場合、より規制の厳しい専医とした。

食経験情報

食経験は各種書籍[24-31]を参考に情報収集を行った。加食・非食部位の違いや採取時期によって実際の可食・不食の判断は大きく異なるが、今回は植物種ごとの食経験情報の有無の調査のみを実施した。食用に伴う安全性等(摂食可能量)の情報は加味していない。また、今回使用した書籍からは食用の記載は見られなかったが、明らかに食歴のある植物(例:アボカド、アラビアコーヒーなど)については食歴有とした。逆に経口摂取が予想される品目であっても薬用使用のみが確認された生薬(ブシ等)については、食経験無とした。

モモを例にした食経験・食薬区分の関係性を Fig. 1-2-2 に示す。

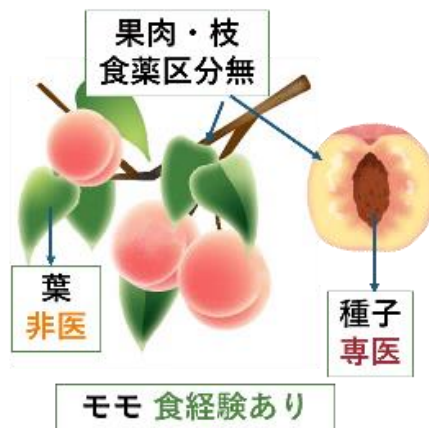


Fig. 1-2-2 Example image of the borderline of pharmaceuticals to non-pharmaceuticals in plant extract library

結果及び考察

ライブラリーエキス 13,738 点における原料植物の食薬区分への該当状況を Fig. 1-2-3 に示す。調査の結果専医に該当するものが 10.8%(1,481 点)、非医に該当するものが 16.4%(2,248 点)となった。専医は国内流通生薬が 7 割を占め、非医は野外採取品が半数を、次いで栽培品と生薬がそれぞれ 4 分の 1 を占めた。なお、ライブラリーは漢方処方で使用される生薬や野外採取品を中心としているため、海外産ハーブの該当品はほぼ確認されなかった。次に食経験と食薬区分との重複状況について Fig. 1-2-4 に示す。食経験の確認されたサンプルは全体の 39.2%(5,391 点)であった。食経験の確認されたもの、されなかったものの区分の中で更に食薬区分の該当状況を確認したところ、どちらの区分にも該当しないものがそれぞれ全体の 6 割を超えた。食経験有の区分では非医の割合が 30%近くを占め、カンゾウやケイヒ、ショウキョウといった専医に該当しない生薬の多くがこの区分に該当していた。

今回の調査の結果、食経験及び食薬区分情報が確認されなかった植物エキスが約半数を占めた。厚生労働省から公表されている専医及び非医の情報は各都道府県から問い合わせのあったものを中心に例示されている情報であり、非常にマイナーな植物種については問い合わせ自体がされていない可能性が高いことが考えられた。ま

た、専医及び非医のみの該当となった植物にも別文献では食経験の記載があるものが多数含まれていたことから、食経験情報を持つ植物の割合はさらに増えることが予想された。食薬区分の情報は 2020 年 7 月現在の情報をもとにしているが、今後改正があり次第適宜変更していく予定である。

今回食経験の情報収集にあたり、植物については安全性についての考慮は行っていない。しかし、食用とされている植物原料の中にも注意が必要な事例がいくつか挙げられる。例えば 2003 年アマメシバの粉末・錠剤などの販売が禁止されたが[32]、もとは野菜として一般に食されていたものの摂食方法が大きく変わったことにより閉塞性細気管支炎による健康被害が生じたものである。他にもビワやウメの種子等は食品やサプリメントとして販売されている事例があるものの、アミグダリンなど青酸配糖体を含むことから流通や摂食には注意喚起が出されている[33]。食経験があるという点ではどちらも同じであるが、このようなケースの情報の取り扱いについても今後考慮する必要があると考えられた。

食薬区分や食経験に基づいたサンプルの分譲依頼件数は年々増えつつあり、ユーザーに高い関心があることが伺える。特に食経験については非常に関心が高く、2019 年度は約半数が 2020 年はほぼ全件が食経験に基づいた分譲となっていた。そのためエキスの偏った消費が生じつつあり、サンプルの安定分譲が難しくなっている側面もあることから、サンプルの管理方法についても今後検討する必要があると認められた。

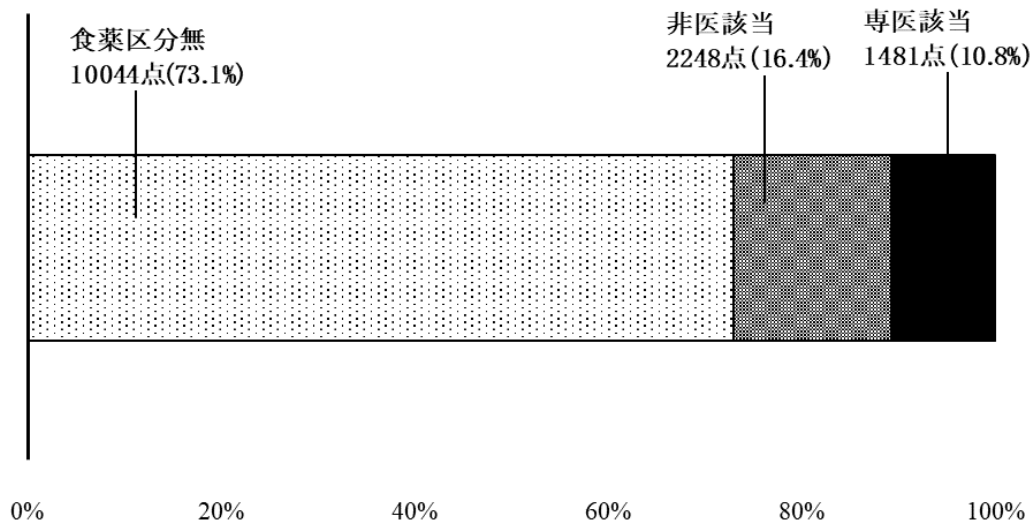


Fig. 1-2-3 Ratio of the borderline of pharmaceuticals to non-pharmaceuticals in Japan of plant extract library

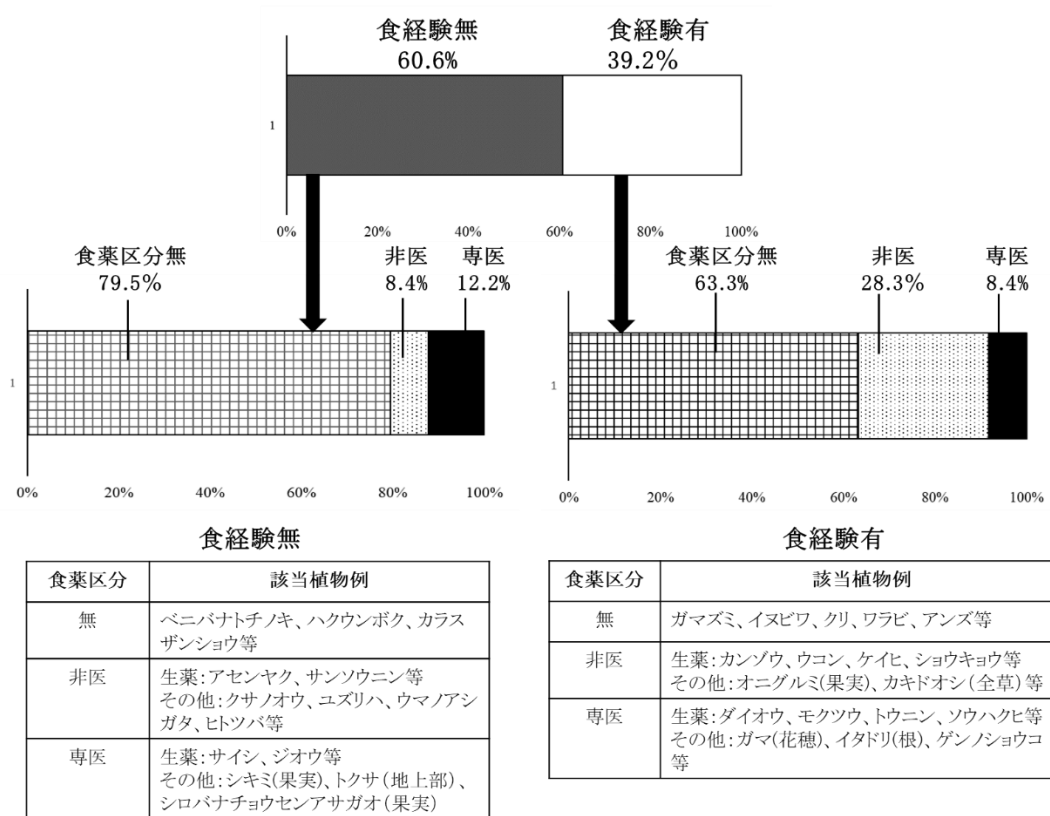


Fig. 1-2-4 Relationship of food experiment and the borderline of pharmaceuticals to non-pharmaceuticals

第3章 エンドトキシン活性情報の付加

背景と目的

第1章にて述べたようにライブラリーに使用している植物エキスは多成分系であり、その中には採取から抽出に至る環境由来の成分も含まれている。そのような抽出時の非意図的混入物質の一つにエンドトキシンが挙げられる。エンドトキシンはグラム陰性菌の菌体表面に由来する分子量約数百万のリポ多糖 (LPS、Fig. 1-3-1) で、溶液中ではミセルの形態で存在している [34]。

エンドトキシンの影響は生体への発熱作用に留まらず、各種免疫細胞の活性化やサイトカインの産生、遺伝子発現の促進等多彩な作用が報告されている [35]。そのため近年では低エンドトキシン含量の培地や試薬類が使用され、実験系におけるエンドトキシン汚染を回避する傾向が強くなっている。しかし、実験環境を清浄にしても供使されるサンプルが高度なエンドトキシン汚染を受けている場合、実験系の結果に影響を及ぼす恐れがある。Kirikae らは市販のエンドトキシンが混入した血清を使用して J774.1 細胞を培養した結果、エンドトキシン添加に対する腫瘍壊死因子の産生量が減少することを報告している [36]。また、Gao らはヒートショックプロテイン 60 及び 70 のマウスマクロファージにおける炎症性サイトカイン産生の誘導作用は、エンドトキシンの混入が原因であることを報告している [37]。このような例もあることから、サンプルのエンドトキシンによる汚染度を把握することは、正しい研究結果の担保にもつながると考えられる。そして植物エキスライブラリーの付加情報として品質向上への一助となることが考えられる。

しかし、野外採取の植物由来のエキスのエンドトキシンによる汚染度についての報告はなく、その実態は不明である。そこで第3章では、以下の項目を実施した。

①植物エキスライブラリー中のエンドトキシン活性の測定

エンドトキシンはあらゆる環境に存在することが報告されているが [38-40]、原料となる植物の部位を考慮すると土壌細菌に由来する汚染の度合いが大きいと考えられる。そこで第1章で構築した植物エキスライブラリーのサンプルの中から特に地下部を使用したエキスを対象としてその汚染実態を調査した。

②エンドトキシン測定に影響を与える植物エキス成分の探索

エンドトキシン測定法には現在広く使用されている *Limulus Amebocyte Lysate* 法 (LAL 法) 他、エンドトキシン・アクティビティ・アッセイやファージレセプターを用いたりガンドアッセイなどが挙げられるが、血液検体に限った方法であったりその特異性等に LAL 法と比較して制限がある[35]。そこで、本研究では LAL 法の中でも高感度で多検体を測定できるマイクロプレートリーダーを使用した比色法を使用した。

カブトガニの血球抽出物を使用した LAL 法は、操作が簡便で広い測定レンジを持つことから汎用されている。しかし LAL 法は酵素反応を利用した方法であることからサンプル溶液の pH、共存イオン、プロテアーゼ、抗生物質、着色などの影響を受ける場合が知られている[35]。今回多くの植物エキスにおいて、測定時の反応曲線の形状の異常や回収率の異常値が認められたことから、植物中に広く分布している成分であるポリフェノール化合物に着目し、LAL 法への影響を検討した。ポリフェノール化合物は分子内にフェノール性水酸基を複数持つ化合物の総称であるが、酵素やタンパク質に吸着し活性に影響を与えることが知られている[41, 42]。しかしポリフェノール化合物は種類が非常に多いことから、今回は基本となる低分子ポリフェノール化合物についてその影響を検討した。

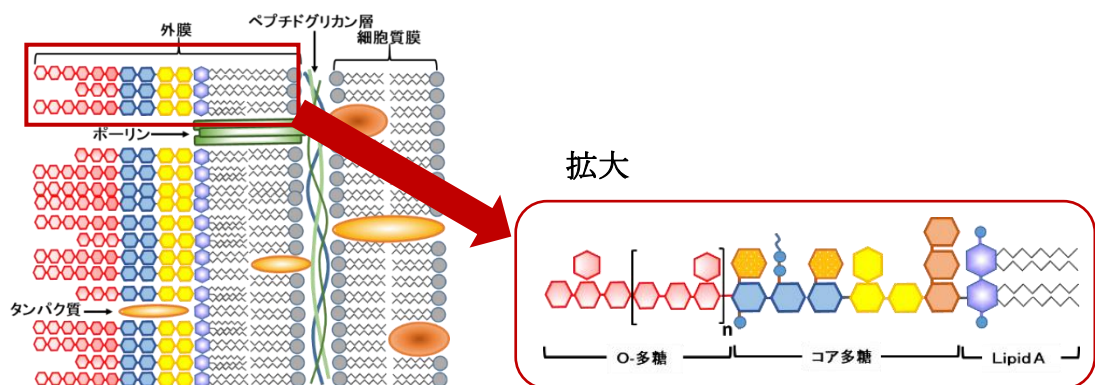


Fig. 1-3-1 Structure of endotoxin

実験方法

ライブラリーエキス中のエンドトキシン活性の測定方法

エンドトキシンの活性測定はリムスカラーKY テストワコー(富士フィルム和光純薬、大阪)を用いて、キットの指示に従い実施した。第 1 部で作製した DMSO エキスは注射用水(大塚製薬工場、東京)で 100 倍希釈して測定に使用した。96 ウェルマイクロプレートに希釈済み DMSO エキス 50 μ L、溶解済みライセート試薬 50 μ L を添加し、37 $^{\circ}$ Cにおける 405 nm の吸光度を測定した。解析ソフトは Toximaster[®]QC7 MPR(富士フィルム和光純薬、大阪)を、プレートリーダーは Sunrise Thermo (Tecan, Mannedorf, Switzerland)をそれぞれ用いた。植物エキス中には多数の反応干渉因子が存在することが予想されることから、測定は反応干渉因子試験(回収率の測定)を同時に実施し、結果が 50~200%のかつ反応曲線の形状がシグモイド型と認められた場合を適合とした(Fig. 1-3-2 参照)。回収率は以下の計算式で求め、反応干渉因子試験時の control standard endotoxin 添加による spiked 濃度は 0.05 EU/mL (EU: Endotoxin unit)とした。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{[(\text{spiked サンプルのエンドトキシン活性}) - (\text{non-spiked サンプルのエンドトキシン活性})]}{0.05}$$

測定結果は DMSO エキス原液中の濃度に換算した(EU/mL)。ブランクとして植物サンプルを用いずに作製したサンプルの活性を測定したところ、検出限界以下であった(DMSO 溶液中換算で<0.05 EU/mL)。

ポリフェノール化合物による LAL 法への影響について

ポリフェノール化合物 16 点 (Fig. 1-3-3 参照) は、DMSO に溶解させたものを注射用水で希釈し、1, 10, 100 μM としたものを測定用サンプルとして使用した (DMSO 終濃度は全て 1% とした。)。試験は①反応干渉因子試験、②化合物中のエンドトキシン活性を減弱させる目的でポリミキシン B (終濃度 0.01%) を使用した条件の 2 種で実施した。なお、ポリミキシン B の濃度を高くすると測定の途中でポリミキシン B 由来とみられる吸光度の変化が見られたことから、0.01% 条件で実施した。回収率の測定はライブラリーエキスの場合と同様の方法で測定した。

なお、各化合物の入手先は以下のとおりである。

- gallic acid (1), methyl gallate (2), ellagic acid (4), chlorogenic acid (8), rosmarinic acid (9), hesperetin (10): 富士フィルム和光純薬、大阪
- vanillic acid (3), *trans-p*-coumaric acid (5), *trans*-caffeic acid (6), naringenin (11), rutin (13), genistein (14), and puerarin (15): 東京化成、東京
- ferulic acid (7): LKT Laboratories, St. Paul, Minnesota, USA
- quercetin (12): Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA
- (+)-catechin hydrate (16): Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

PVPP 中からのエンドトキシンの除去

エキスからポリフェノール化合物を除去する際のエンドトキシンの混入を減らすため、事前にポリビニルピロリドン (PVPP) 中のエンドトキンの分解を実施した。エンドトキシンの分解法は Niwa らの方法[43]を参考に以下のように実施した。PVPP (Polyclar VT、富士フィルム和光純薬 大阪) 40 mg をエッペンチューブにとり、0.1 M NaOH 95% エタノール (EtOH) 溶液を添加して 24 時間 30 $^{\circ}\text{C}$ で保管した。洗浄液を遠心分離して除去し、注射用水で PVPP を複数回洗浄して使用した。

植物エキス中からのポリフェノール化合物の除去

前述の方法にて洗浄済の PVPP に DMSO エキス及び注射用水を添加し、5 °C の水浴中で 30 分静置した。遠心した上清をエンドトキシン測定用のサンプルとして使用した。

総フェノール量の測定

総フェノール量の測定は Fujita らの方法[44]を参照して行った。96 ウェルマイクロプレートに希釈済み DMSO サンプル及び 10 倍希釈した Folin-Ciocalteu 溶液(富士フィルム和光純薬、大阪)を 100 μ L ずつ加えて 3 分静置した。10% Na_2CO_3 溶液 100 μ L を添加し 1 時間静置後 700 nm における吸光度を測定した。gallic acid を基準物質とし、結果は乾燥エキス 1 mg 当たりの含量($\mu\text{g-GA}/\text{mg-Ext}$)で表記した。プレートリーダーは Synergy H1 microplate reader (BioTek Instruments, Inc. Vermont, USA)を使用した。

エキス抽出時使用溶媒によるエンドトキシン活性への影響の検討

O55: B5 の LPS (*Escherichia coli* 由来, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 0.5 ng/mL の水及び MeOH 懸濁液を、2 時間室温で静置したものと沸点付近で還流加熱したものとを調製した。2 時間後各サンプルのエンドトキシン活性を測定した。

統計処理について

植物エキス中のエンドトキシン活性測定は $n=2$ で実施し、他の項目は $n=3$ で試験を実施した。データの統計処理は Microsoft® Excel® 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA)を用いて実施した。

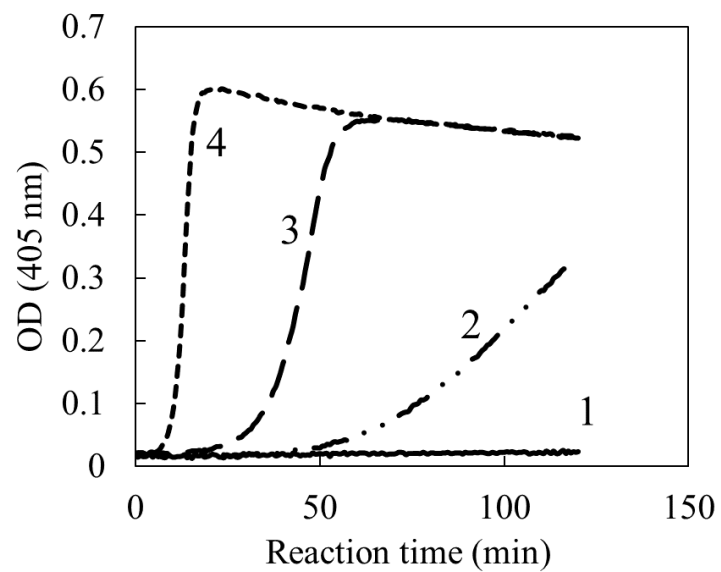


Fig. 1-3-2 Reaction Courses of Limulus Amoebocyte Lysate Tests in the Presence of Endotoxin. 1, negative control; 2, 0.005 EU/mL; 3, 0.05 EU/mL; and 4, 5 EU/mL

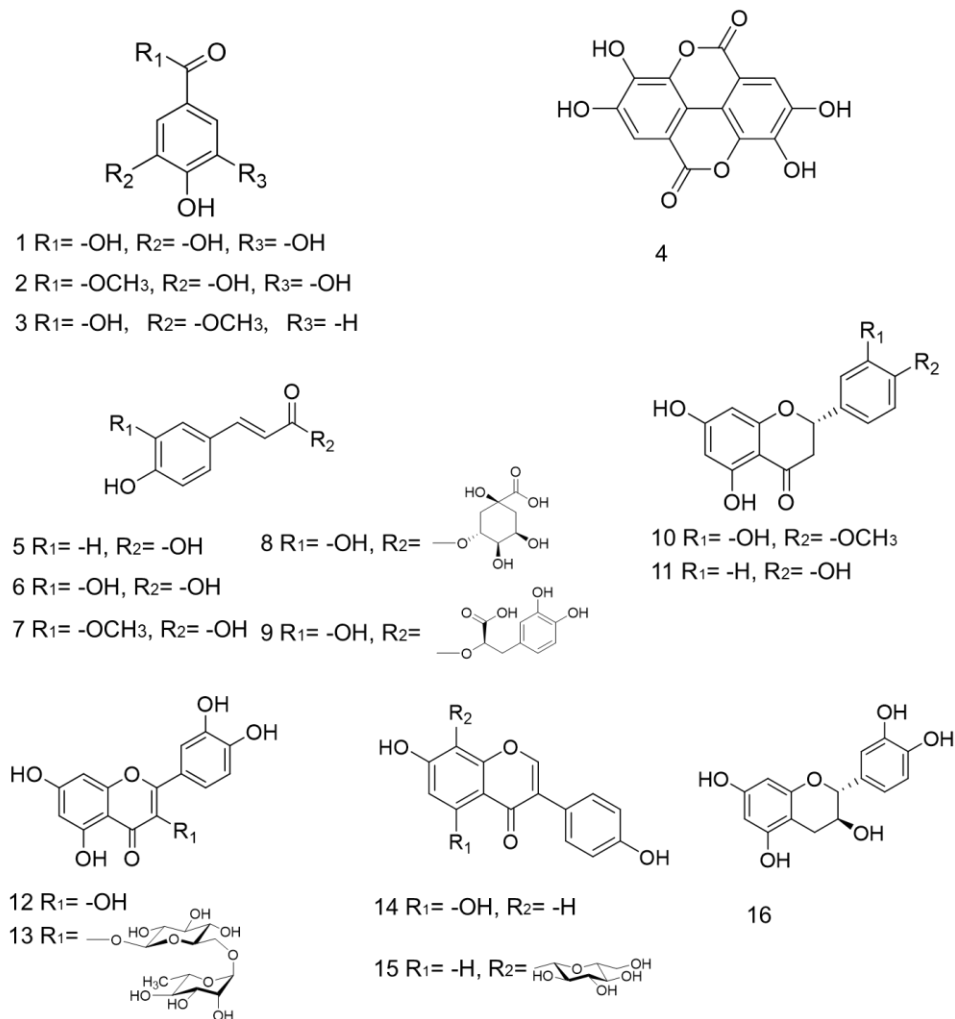


Fig. 1-3-3 Structures of polyphenols

結果及び考察

DMSO エキス中のエンドトキシン活性について

地下部を含む植物由来エキスのエンドトキシン活性の測定結果を Table 1-3-1 に示す。測定を実施した野外採取品 288 点の内、全体の 48.3%にあたる 139 点からエンドトキシンが検出されたのに対し、生薬由来のサンプルは 4.0%にあたる 5 点のみからの検出に留まった。これは両者のエキス作成までの処理の差に由来するものと考えられた。生薬は収穫から流通までに皮取り等の加工調整のプロセスを経ている[45]。一方、ライブラリーサンプルは現在採取後に水洗等の処理は行うものの、取り切れていない汚れに由来するエンドトキシンが混入していたと考えられることから、今後のサンプル調製において、枯死した部分の除去やサンプルの洗浄方法の工夫が必要であると考

えられた。

LAL 法による測定が可能だったエキスの結果を Table 1-3-2 及び 1-3-3 に示す(表中の MPR 番号はエキスサンプルの固有番号を示す)。野外採取品のエンドトキシン活性は、サンプルにより非常にばらつきの大きい結果となった。エンドトキシンが検出された植物エキスは小型の草本類[MPR-0269 *Chrysosplenium grayanum* (ネコノメソウ), MPR-0288 *Cymbidium goeringii* (シュンラン) 等]、地下部の構造の複雑なシダ植物[MPR-0259 *Hymenophyllum barbatum* (コウヤコケシノブ), MPR-0260 *Lemmaphyllum microphyllum* (マメヅタ) 等]などが多かった。一部の活性の高いサンプルでは 50 EU/mL を超えるものも認められた。また、同じ植物種のエキスでも MPR-0022 及び 0317 *Achyranthes bidentata* var. *japonica* (ヒカゲイノコヅチ) や MPR-0221 及び 0327 *Papaver dubium* (ナガミヒナゲシ) のように測定できたものとできなかったものがある場合があり、含有成分の差異が影響している可能性が示された。

生薬抽出物中のエンドトキシン活性については、Inagawa らは 62 種の生薬の熱水抽出物よりその全てから[46]、Hsu らは 35 点の生薬の冷水抽出物よりその約 20%から[47]エンドトキシンを検出したことを報告している。彼らの結果と比較して、我々の生薬エキスからのエンドトキシン検出数は明らかに少ないことが判明した。理由の一つとしてエキスの調製法の違いが考えられた。我々のライブラリーエキスは熱 MeOH 抽出後、乾固、DMSO への再溶解、凍結・解凍といくつかの段階を踏んでおり、含有されていたエンドトキシンが分解・変性する可能性が考えられた。

また、使用した溶媒の違いについて、O55:B5 の 0.5 ng/mL の水及び MeOH 懸濁液を用意し、それぞれ 2 時間室温にて静置、マントルヒーターで 2 時間穏やかに加熱した場合の活性の変化を検討した。その結果、水については室温静置 2 時間後にエンドトキシン活性が検出され、加熱したサンプルも定量限界以下ではあるものの活性が検出された。一方、MeOH は加熱の有無にかかわらず 2 時間後にエンドトキシン活性は検出されなかった。エンドトキシンの活性は溶液中での加熱に対し不安定であることが報告されている[35]ことから、エキス抽出時における加熱処理により、エンドトキシンの活性が低下した可能性が考えられた。また MeOH の場合加熱をしなくても活性が消失したことから、有機溶媒との接触により、活性が変化した可能性も考えられた。

検出されたエンドトキシン活性による細胞影響について

エンドトキシンが細胞に対して影響を及ぼす濃度は、対象となる細胞等の種類によって大きな開きがある。例えば、Guo らはエンドトキシン 10 ng/mL 以上の濃度で MC3T3-E1 細胞の生存率が低下すること[48]、Zhang らはトロンビン存在下条件における血小板凝集が 100,000 ng/mL 以上のエンドトキシン存在下で起こることを報告している[49]。他にも線維芽細胞[50]、NK 細胞等[36, 51, 52]に対する影響が報告されている。エンドトキシンは由来となる菌の種類によってその比活性が大きく異なることが知られており[32]、濃度と活性を単純比較することは難しい。そこで、一般的に使用されているエンドトキシンの重量と活性の換算係数 $1 \text{ ng} = 5\sim 10 \text{ EU/mL}$ [53]を使用すると、Guo らの値は 50~100 EU/mL に、Zhang らの値は 500,000~1,000,000 EU/mL となり、いずれの場合もライブラリーで検出された活性よりも高い活性となった。また、エキスサンプルは希釈して使用することを考慮すると、細胞等に対する影響は更に少なくなることが予想された。ただし、一部のサンプルでは 50 EU/mL を超える高い活性が検出されたことから、エンドトキシン活性情報はエキスの品質情報として今後も蓄積していくことが望ましいと考えられた。

DMSO エキス中の反応干渉因子について

LAL 法は高い感度と測定範囲の広さから広く用いられているエンドトキシン測定法であるが、セリンプロテアーゼを介した酵素反応を利用しているため[35]、様々な影響因子が存在する。因子として界面活性剤[54]、Fe 等の金属イオン[55]、硫酸ゲンタマイシン等の抗生物質[56]、プロテアーゼ及びその阻害剤などが知られているが、測定時の対処として統一的な方法はなく、サンプルの希釈等都度の対応となっているのが現状である。

今回、全体の 150 点以上の DMSO サンプルで回収率の過不足及び反応曲線の形状異常が認められたことから (Table 1-3-1, 4, 5 参照)、実際に測定時に不具合の認められた植物エキスを使用してエキス中の LAL 試験に対する影響因子の検討を実施した。

植物エキスは多成分系であり幅広い極性の化合物を含むが、広く分布している成

分の一群としてポリフェノール化合物があげられる。ポリフェノール化合物はフェノール性水酸基を持つ様々な骨格を持つ化合物群であるが、catechin や gallic acid 等の重合体はタンニンと呼ばれ、タンパク質との相互作用も強い。タンニンを含むポリフェノール化合物は様々な酵素に影響を及ぼすことが知られている[57, 58]。

正常な測定が実施できなかった DMSO サンプルは①反応曲線が蛇行するもの、②反応曲線の形状はシグモイド型に近いものの、回収率が許容値範囲外であるものの二つに大別された。今回使用サンプルとして、ワレモコウ(バラ科 *Sanguisorba officinalis*)、メマツヨイグサ(アカバナ科 *Oenothera biennis*)、エゾミソハギ(ミソハギ科 *Lythrum salicaria*)の3点の植物エキスをを使用した。この内ワレモコウ及びエゾミソハギは①に、メマツヨイグサは②のグループに該当する。また、ミソハギ科及びアカバナ科はポリフェノール化合物含有量の多い科であること[59-62]、ワレモコウは複数のサンプルで同様の現象が見られたことから、この3種を次の実験のサンプルとして選択した。

植物エキスを無処理、PVPP 処理、ポリミキシン B 添加条件でそれぞれ LAL 試験を実施した場合の反応曲線を Fig. 1-3-4 に示す。

LAL とエンドトキシンとの正常な反応曲線は、Fig. 1-3-2 に示すように反応開始初期にラグを持つシグモイド型となる。3 種のエキスとも反応開始直後から吸光度の変化が見られた(Fig. 1-3-4 参照)。さらにワレモコウ及びエゾミソハギの場合、反応曲線はいずれも蛇行した形状となった。(Fig. 1-3-4A1, C1)。メマツヨイグサもシグモイド型に近い反応曲線に近い形状となるが、その回収率は 285%であり、サンプルを希釈しても変化は見られなかった(結果非掲載)。3 種の植物エキスにおけるポリミキシン B の添加は3種のエキスとも反応に影響を与えなかった。(Fig. 1-3-4A2, B2, C2)。ポリミキシン B はエンドトキシンのリポド A 部分(Fig. 1-3-1 参照)に特異的に吸着し、失活させることが知られている[63, 64]。仮に植物エキスがエンドトキシンに対し影響を与えていた場合、ポリミキシン B を添加することで回収率や反応曲線の形状に変化が起こることが予想されるが、そのような結果は認められなかった。

なお他の影響因子として今回エンドトキシンの測定は比色法を用いることから、405 nm における吸光度の変化は測定値へ影響を与える可能性が考えられる。サンプルとして使用している DMSO エキスはそのほとんどが緑色から褐色を呈していた。しかし

注射用水で 100 倍希釈した状態の植物エキスは、測定の可不可に関わらず着色による問題は認められなかった。

次に 3 つの植物エキスに対して PVPP 処理を実施した結果、前述の反応開始直後の吸光度の変化は消失し、反応曲線はシグモイド型に変化した (Fig. 1-3-4A3, B3, C3)。それぞれの回収率も許容範囲内となった。3 種のエキスの PVPP 処理前及び後の総フェノール量の測定結果を Fig. 1-3-5 に示す。PVPP 処理の後、総フェノール量はいずれのエキスも処理前の約 10 分の 1 となった。このことから、エキス中のポリフェノール化合物が LAL 反応に対して影響を与えていたことが明らかとなった。

また、メマツヨイグサは他 2 種のエキスとは異なり、PVPP 処理をしたエキスのエンドトキシン活性が大幅に減少したことから、ポリフェノール化合物により測定値が本来よりも高く検出されていた可能性が考えられた。これらの結果から、ポリフェノール化合物の LAL への影響は植物種によって異なることを示すものといえる。

16 種のポリフェノール化合物の LAL への影響について

16 種のポリフェノール化合物を 1, 10, 100 μM 添加した条件で LAL 試験を実施した結果を Table 1-3-6 に示す。10 種の化合物で回収率の異常または反応曲線の変形が認められた。*trans*-caffeic acid (4), ferulic acid (6), chlorogenic acid (7), rosmarinic acid (8) は 100 μM 添加時に回収率の低下が認められた。chlorogenic acid (7) 及び rosmarinic acid (8) は 405 nm における吸光度の減少が認められ、LAL 添加時に反応液の色の青変が認められた。シロヨメナ (Table 1-3-2. MPR-0032, *Aster leiophyllus* Franch. et Sav. var. *leiophyllus*) のエキスを使用した際にも同様の溶液色の変化が認められたことから、これらの化合物の関与が考えられた。gallic acid (1), methyl gallate (2), rutin (12) についても 100 μM で反応曲線の変形が認められた。

一方で (+)-catechin (15)、flavanones [hesperetin (9) 及び naringenin (10)], *trans*-p-coumaric acid (4), vanillic acid (3)、puerarin (14) については 1~100 μM で影響は認められなかった。また、いずれの化合物も 1 μM で影響は認められなかった。

ellagic acid、quercetin にも回収率異常及び反応曲線の変形が認められたが、これらの化合物は水への溶解性が悪く、溶液中で沈殿を形成していた。沈殿の形成が LAL

反応系へ影響をおよぼしている可能性も考えられた。

今回 **caffeic acid** 誘導体や **gallic acid** 誘導体で阻害作用が確認されたことは非常に興味深いと言える。これらの化合物は重要な化合物群であり、キク科やシソ科ではポリフェノール化合物の主成分にもなっている場合もある[65]。今回ポリフェノール化合物の除去に使用したワレモコウには **gallic acid**、**catechin**、**ellagic acid** 等[66]が、メマツヨイグサには **gallic acid** [67]が、エゾミソハギには **gallic acid**、**caffeic acid** 誘導体、**chlorogenic acid** 等[68]が含まれていることが報告されており、阻害活性にも寄与していたことが考えられた。

植物エキス中にはこの他にも多くの異性体が存在しているため、実際にはそれらが相乗的に作用を示しているのではないかと考えられる。今回(+)-**catechin** は 100 μM で LAL 試験への影響は認められなかった。しかし、**catechin** 類の重合体であるタンニンは分子当たりの水酸基の数が多く、タンパク質との相互作用も強くなるため影響が出る可能性が高くなることが予想される。今後はさらに水酸基の多い重合体や複数化合物の存在条件下における影響の検討が課題である。

一連の結果より、化合物の中には回収率が許容範囲内であっても実際には反応曲線に大きな乱れが生じている場合もあることから、エンドトキシン測定の際には両者の確認が必要であると言える。

Table 1-3-1. Plant extract samples subjected to the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL)
Test for endotoxin detection

Endotoxin activity (EU/mL)	Samples	
	Field-collected	Crude drugs
<0.05	149	121 (12) ^{a)}
0.05~0.25	36	3 (3)
0.25~0.50	16	0
0.50~2.50	42	1 (1)
2.50~5.00	15	1 (1)
>5.00	30	0
Total LAL tests that were possible	288	126 (12)
Total samples with endotoxin activity >0.05 EU/mL (endotoxin detected)	139	5
Rate of endotoxin detection (%)	48.3	4.0
Total LAL tests that were not possible	155	(24)

^{a)} Numbers in parentheses indicate the number of kinds of crude drugs

Table 1-3-2. Plant extract samples for which the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Test was possible (Field collected)

Sample no.	Scientific name (和名)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site	Endotoxin activity (EU/mL)
MPR-0001	<i>Selaginella remotifolia</i> Spring (ク ラマゴケ)	Selaginellaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0002	<i>Botrychium virginianum</i> (L.) Sw. (ナツノハナワラビ)	Ophioglossaceae	R	Hokkaido	<0.05
MPR-0003	<i>Diplazium glaucum</i> (Houtt.) Nakai (ウラジロ)	Gleicheniaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0004	<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C.Presl (タマシダ)	Davalliaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0005	<i>Adiantum pedatum</i> L. (クジャクシダ)	Pteridaceae	W	Nagano	<0.05
MPR-0006	<i>Coniogramme japonica</i> (Thunb.) Diels (イワガネソウ)	Pteridaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0007	<i>Odontosoria chinensis</i> (L.) J.Sm. (ホラシノブ)	Pteridaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0008	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn subsp. <i>japonicum</i> (Nakai) Á. et D.Löve (ワラビ)	Pteridaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0009	<i>Asplenium ritoense</i> Hayata (コウザキシダ)	Aspleniaceae	U	Shizuoka	<0.05
MPR-0010	<i>Polystichum tripterum</i> (Kunze) C.Presl (ジュウモンジシダ)	Dryopteridaceae	U	Ehime	<0.05
MPR-0011	<i>Thelypteris acuminata</i> (Houtt.) C.V.Morton (ホシダ)	Dryopteridaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0012	<i>Thelypteris angustifrons</i> (Miq.) Ching (コハシゴシダ)	Dryopteridaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0013	<i>Thelypteris glanduligera</i> (Kunze) Ching (ハシゴシダ)	Dryopteridaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0014	<i>Elatostema involucreatum</i> Franch. et Sav. (ウワバミソウ)	Urticaceae	W	Ibaraki	<0.05
MPR-0015	<i>Elatostema involucreatum</i> Franch. et Sav. (ウワバミソウ)	Urticaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0016	<i>Rheum rhabarbarum</i> L. (マルバダイオウ)	Polygonaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0017	<i>Phytolacca japonica</i> Makino (マルミノヤマゴボウ)	Phytolaccaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0018	<i>Arenaria serpyllifolia</i> L. (ノミノツツリ)	Caryophyllaceae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0019	<i>Dianthus japonicus</i> Thunb. (ハマナデシコ)	Caryophyllaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0020	<i>Dianthus japonicus</i> Thunb. (ハマナデシコ)	Caryophyllaceae	W	Kochi	<0.05
MPR-0021	<i>Chenopodium album</i> L. (シロザ)	Chenopodiaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0022	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume var. <i>fauriei</i> (H.Lév. et Vaniot) (ヒナタイノコヅチ)	Amaranthaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0023	<i>Aquilegia buergeriana</i> Siebold et Zucc. var. <i>buergeriana</i> (ヤマオダマキ)	Ranunculaceae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0024	<i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Wormsk. ex Turcz. (サラシナショウマ)	Ranunculaceae	U	Gunma	<0.05
MPR-0025	<i>Ranunculus japonicus</i> Thunb. (ウマノアシガタ)	Ranunculaceae	W	Nagano	<0.05
MPR-0026	<i>Epimedium sempervirens</i> Nakai ex F.Maek. (トキワイカリソウ)	Berberidaceae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0027	<i>Podophyllum peltatum</i> L. (ポドフィラム)	Berberidaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0028	<i>Podophyllum peltatum</i> L. (ポドフィラム)	Berberidaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0029	<i>Paeonia japonica</i> (Makino) Miyabe et Takeda (ヤマシャクヤク)	Paeoniaceae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0030	<i>Chelidonium majus</i> L. subsp. <i>asiaticum</i> H.Hara (クサノオウ)	Papaveraceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0031	<i>Chelidonium majus</i> L. subsp. <i>asiaticum</i> H.Hara (クサノオウ)	Papaveraceae	W	Saitama	<0.05
MPR-0032	<i>Corydalis incisa</i> (Thunb.) Pers. (ムラサキゲマン)	Papaveraceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0033	<i>Eschscholzia californica</i> Cham. (ハナビシソウ)	Papaveraceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0034	<i>Macleaya cordata</i> (Willd.) R.Br. (タケニグサ)	Papaveraceae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0035	<i>Arabis nipponica</i> (Franch. et Sav.) H.Boissieu (ヤマハタザオ)	Cruciferae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0036	<i>Arabis stelleri</i> DC. var. <i>japonica</i> (A.Gray) F.Schmidt (ハマハタザオ)	Cruciferae	R	Hokkaido	<0.05
MPR-0037	<i>Cardamine leucantha</i> (Tausch) O.E.Schulz (コンロンソウ)	Cruciferae	W	Kochi	<0.05
MPR-0038	<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>hortensis</i> Backer f. <i>raphanistroides</i> Makino (ハマダイコン)	Cruciferae	R	Ehime	<0.05
MPR-0039	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge (ツルマンネングサ)	Crassulaceae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0040	<i>Sedum tricarpum</i> Makino (タカネマンネングサ)	Crassulaceae	W	Kochi	<0.05
MPR-0041	<i>Hydrangea bifida</i> (Maxim.) Y.De Smet et Granados (ギンバイソウ)	Saxifragaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0042	<i>Rubus parvifolius</i> L. (ナワシロイチゴ)	Rosaceae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0043	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi (クズ)	Leguminosae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0044	<i>Euphorbia atoto</i> G.Forst. (ハマタイゲキ)	Euphorbiaceae	R	Okinawa	<0.05
MPR-0045	<i>Euphorbia hirta</i> L. (シマニシキソウ)	Euphorbiaceae	R	Kagoshima	<0.05
MPR-0046	<i>Mercurialis leiocarpa</i> Siebold et Zucc. (ヤマアイ)	Euphorbiaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0047	<i>Mercurialis leiocarpa</i> Siebold et Zucc. (ヤマアイ)	Euphorbiaceae	W	Kochi	<0.05
MPR-0048	<i>Theligonum japonicum</i> Okubo et Makino (ヤマトグサ)	Theligonaceae	W	Kochi	<0.05
MPR-0049	<i>Panax japonicus</i> (T.Nees) C.A.Mey. (トチバニンジン)	Araliaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0050	<i>Angelica decursiva</i> (Miq.) Franch. et Sav. (ノダケ)	Umbelliferae	U	Yamanashi	<0.05
MPR-0051	<i>Angelica decursiva</i> (Miq.) Franch. et Sav. (ノダケ)	Umbelliferae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0052	<i>Angelica pubescens</i> Maxim. (シシウド)	Umbelliferae	U	Yamanashi	<0.05

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-2. (continued)

Sample no.	Scientific name (和名)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site	Endotoxin activity (EU/mL)
MPR-0053	<i>Coelopleurum gmelinii</i> (DC.) Ledeb. (エゾノシシウド)	Umbelliferae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0054	<i>Glehnia littoralis</i> F.Schmidt ex Miq. (ハマボウフウ)	Umbelliferae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0055	<i>Torilis scabra</i> (Thunb.) DC. (オヤブジラミ)	Umbelliferae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0056	<i>Monotropastrum humile</i> (D.Don) H.Hara (ギンリョウソウ)	Pyrolaceae	W	Kochi	<0.05
MPR-0057	<i>Lysimachia mauritiana</i> Lam. (ハマボッス)	Primulaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0058	<i>Lysimachia mauritiana</i> Lam. (ハマボッス)	Primulaceae	W	Kochi	<0.05
MPR-0059	<i>Amsonia elliptica</i> (Thunb.) Roem. et Schult. (チョウジソウ)	Apocynaceae	R and S	Ibaraki	<0.05
MPR-0060	<i>Vinca major</i> L. (ツルニチニチソウ)	Apocynaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0061	<i>Cynanchum caudatum</i> (Miq.) Maxim. (イケマ)	Asclepiadaceae	R	Yamanashi	<0.05
MPR-0062	<i>Calystegia hederacea</i> Wall. (コヒルガオ)	Convolvulaceae	R and S	Ibaraki	<0.05
MPR-0063	<i>Anchusa azurea</i> Mill. (ウシノシタグサ)	Boraginaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0064	<i>Bothriospermum zeylanicum</i> (J.Jacq.) Druce (ハナイバナ)	Boraginaceae	W	Saitama	<0.05
MPR-0065	<i>Mertensia maritima</i> (L.) Gray subsp. <i>asiatica</i> Takeda (ハマペンケイソウ)	Boraginaceae	R and S	Hokkaido	<0.05
MPR-0066	<i>Clinopodium gracile</i> (Benth.) Kuntze (トウバナ)	Labiatae	W	Ibaraki	<0.05
MPR-0067	<i>Galeopsis bifida</i> Boenn. (チシマオドリコソウ)	Labiatae	W	Hokkaido	<0.05
MPR-0068	<i>Glechoma hederacea</i> L. subsp. <i>grandis</i> (A.Gray) H.Hara (カキドオシ)	Labiatae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0069	<i>Lamium album</i> L. var. <i>barbatum</i> (Siebold et Zucc.) Franch. et Sav. (オドリコソウ)	Labiatae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0070	<i>Lamium album</i> L. var. <i>barbatum</i> (Siebold et Zucc.) Franch. et Sav. (オドリコソウ)	Labiatae	R and S	Ibaraki	<0.05
MPR-0071	<i>Perilla citriodora</i> (Makino) Nakai (レモンエゴマ)	Labiatae	R	Kagoshima	<0.05
MPR-0072	<i>Prunella vulgaris</i> L. subsp. <i>asiatica</i> (Nakai) H.Hara (ウツボグサ)	Labiatae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0073	<i>Salvia glabrescens</i> (Franch. et Sav.) Makino (アキギリ)	Labiatae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0074	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge (タンジン)	Labiatae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0075	<i>Salvia nipponica</i> Miq. (キバナアキギリ)	Labiatae	W	Ehime	<0.05
MPR-0076	<i>Cymbalaria muralis</i> G.Gaertn., B.Mey. et Scherb. (ツタバウンラン)	Scrophulariaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0077	<i>Veronicastrum japonicum</i> (Nakai) T.Yamaz. var. <i>japonicum</i> (クガイソウ)	Scrophulariaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0078	<i>Codonacanthus pauciflorus</i> (Nees) Nees (アリモリソウ)	Acanthaceae	R	Okinawa	<0.05
MPR-0079	<i>Justicia procumbens</i> L. var. <i>procumbens</i> (キツネノマゴ)	Acanthaceae	R	Kagoshima	<0.05
MPR-0080	<i>Justicia procumbens</i> L. var. <i>procumbens</i> (キツネノマゴ)	Acanthaceae	W	Chiba	<0.05
MPR-0081	<i>Orobancha minor</i> Sm. (ヤセウツボ)	Orobanchaceae	W	Saitama	<0.05
MPR-0082	<i>Phryma esquirolii</i> H.Lév. (ハエドクソウ)	Phrymaceae	W	Nagano	<0.05
MPR-0083	<i>Plantago asiatica</i> L. (オオバコ)	Plantaginaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0084	<i>Plantago camtschatica</i> Cham. ex Link (エゾオオバコ)	Plantaginaceae	R	Hokkaido	<0.05
MPR-0085	<i>Plantago virginica</i> L. (ツボミオオバコ)	Plantaginaceae	W	Ibaraki	<0.05
MPR-0086	<i>Patrinia scabiosifolia</i> Link (オミナエシ)	Valerianaceae	U	Yamanashi	<0.05
MPR-0087	<i>Patrinia scabiosifolia</i> Link (オミナエシ)	Valerianaceae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0088	<i>Valerianella locusta</i> (L.) Laterr. (ノヂシャ)	Valerianaceae	W	Nagano	<0.05
MPR-0089	<i>Adenophora stricta</i> Miq. (マルバノニンジン)	Campanulaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0090	<i>Codonopsis lanceolata</i> (Siebold et Zucc.) Trautv. (ツルニンジン)	Campanulaceae	U	Ishikawa	<0.05
MPR-0091	<i>Lobelia sessilifolia</i> Lamb. (サワギキョウ)	Campanulaceae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0092	<i>Peracarpa carnosae</i> (Wall.) Hook.f. et Thomson (タニギキョウ)	Campanulaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0093	<i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A.DC. (キキョウ)	Campanulaceae	R	Yamanashi	<0.05
MPR-0094	<i>Adenocaulon himalaicum</i> Edgew. (ノブキ)	Compositae	U	Tokyo	<0.05
MPR-0095	<i>Adenocaulon himalaicum</i> Edgew. (ノブキ)	Compositae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0096	<i>Adenocaulon himalaicum</i> Edgew. (ノブキ)	Compositae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0097	<i>Artemisia japonica</i> Thunb. (オトコヨモギ)	Compositae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0098	<i>Artemisia japonica</i> Thunb. (オトコヨモギ)	Compositae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0099	<i>Artemisia stelleriana</i> Besser (シロヨモギ)	Compositae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0100	<i>Aster savatieri</i> Makino var. <i>pygmaeus</i> Makino (シユンジュギク)	Compositae	W	Kochi	<0.05
MPR-0101	<i>Chrysanthemum japonense</i> (Makino) Nakai (ノジギク)	Compositae	W	Kochi	<0.05
MPR-0102	<i>Cichorium intybus</i> L. (キクニガナ)	Compositae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0103	<i>Crepidiastrum keiskeanum</i> (Maxim.) Nakai (アゼトウナ)	Compositae	W	Kochi	<0.05

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-2. (continued)

Sample no.	Scientific name (和名)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site	Endotoxin activity (EU/mL)
MPR-0104	<i>Eupatorium makinoi</i> T.Kawahara et Yahara (ヒヨドリバナ)	Compositae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0105	<i>Hypochaeris radicata</i> L. (ブタナ)	Compositae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0106	<i>Hypochaeris radicata</i> L. (ブタナ)	Compositae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0107	<i>Inula salicina</i> L. var. <i>asiatica</i> Kitam. (カセンソウ)	Compositae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0108	<i>Picris hieracioides</i> L. subsp. <i>japonica</i> (Thunb.) Krylov (コウゾリナ)	Compositae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0109	<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill (オニノゲシ)	Compositae	R	Ibaraki	<0.05
MPR-0110	<i>Synurus excelsus</i> (Makino) Kitam. (ハバヤマボクチ)	Compositae	R	Yamanashi	<0.05
MPR-0111	<i>Xanthium strumarium</i> L. subsp. <i>sibiricum</i> (Patrin ex Widder) Greuter (オナモミ)	Compositae	R and S	Ibaraki	<0.05
MPR-0112	<i>Allium pseudojaponicum</i> Makino (タマムラサキ)	Liliaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0113	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge (ハナスゲ)	Liliaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0114	<i>Barnardia japonica</i> (Thunb.) Schult. et Schult.f. (ツルボ)	Liliaceae	U	Okinawa	<0.05
MPR-0115	<i>Cardiocrinum cordatum</i> (Thunb.) Makino (ウバユリ)	Liliaceae	U	Yamanashi	<0.05
MPR-0116	<i>Chionographis japonica</i> Maxim. (シライトソウ)	Liliaceae	W	Kochi	<0.05
MPR-0117	<i>Colchicum autumnale</i> L. (イヌサフラン)	Liliaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0118	<i>Dianella ensifolia</i> (L.) DC. (キキョウラン)	Liliaceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0119	<i>Disporum sessile</i> D.Don ex Schult. et Schult.f. var. <i>sessile</i> (ホウチャクソウ)	Liliaceae	W	Yamanashi	<0.05
MPR-0120	<i>Disporum sessile</i> D.Don ex Schult. et Schult.f. var. <i>sessile</i> (ホウチャクソウ)	Liliaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0121	<i>Disporum sessile</i> D.Don ex Schult. et Schult.f. var. <i>sessile</i> (ホウチャクソウ)	Liliaceae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0122	<i>Disporum smilacinum</i> A.Gray (チゴユリ)	Liliaceae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0123	<i>Hosta sieboldii</i> (Paxton) J.W.Ingram var. <i>rectifolia</i> (Nakai) H.Hara (タチギボウシ)	Liliaceae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0124	<i>Maianthemum japonicum</i> (A.Gray) LaFrankie (ユキザサ)	Liliaceae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0125	<i>Maianthemum japonicum</i> (A.Gray) LaFrankie (ユキザサ)	Liliaceae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0126	<i>Polygonatum falcatum</i> A.Gray (ナルコユリ)	Liliaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0127	<i>Polygonatum macranthum</i> (Maxim.) Koidz. (オオナルコユリ)	Liliaceae	U	Ishikawa	<0.05
MPR-0128	<i>Polygonatum odoratum</i> (Mill.) Druce var. <i>maximowiczii</i> (F.Schmidt) Koidz. (オオアマドコロ)	Liliaceae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0129	<i>Polygonatum odoratum</i> (Mill.) Druce var. <i>pluriflorum</i> (Miq.) Ohwi (アマドコロ)	Liliaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0130	<i>Smilax china</i> L. (サルトリイバラ)	Liliaceae	U	Ishikawa	<0.05
MPR-0131	<i>Smilax nipponica</i> Miq. (タチシオデ)	Liliaceae	W	Ishikawa	<0.05
MPR-0132	<i>Croomia kinoshitae</i> Kadota (シコクナベワリ)	Stemonaceae	W	Ehime	<0.05
MPR-0133	<i>Iris germanica</i> L. 'Florentina' (ニオイイリス)	Iridaceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0134	<i>Juncus decipiens</i> (Buchenau) Nakai (イグサ)	Juncaceae	U	Yamanashi	<0.05
MPR-0135	<i>Chloris gayana</i> Kunth (アフリカヒゲシバ)	Gramineae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0136	<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) P.Beauv. var. <i>crus-galli</i> (イヌビエ)	Gramineae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0137	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Raeusch. var. <i>koenigii</i> (Retz.) Pilg. (チガヤ)	Gramineae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0138	<i>Lolium arundinaceum</i> (Schreb.) Darbysh. (オニウシノケグサ)	Gramineae	W	Ehime	<0.05
MPR-0139	<i>Melica nutans</i> L. (コメガヤ)	Gramineae	W	Kochi	<0.05
MPR-0140	<i>Paspalum distichum</i> L. var. <i>distichum</i> (キシユウスズメノヒエ)	Gramineae	W	Ehime	<0.05
MPR-0141	<i>Polygonum fugax</i> Nees ex Steud. (ヒエガエリ)	Gramineae	W	Ehime	<0.05
MPR-0142	<i>Alocasia odorum</i> (G.Lodd.) Spach (クワズイモ)	Araceae	U	Kagoshima	<0.05
MPR-0143	<i>Arisaema japonicum</i> Blume (マムシグサ)	Araceae	U	Ibaraki	<0.05
MPR-0144	<i>Arisaema peninsulae</i> Nakai (コウライテンナンショウ)	Araceae	U	Hokkaido	<0.05
MPR-0145	<i>Carex satsumensis</i> Franch. et Sav. (アブラシバ)	Cyperaceae	W	Nagano	<0.05
MPR-0146	<i>Canna edulis</i> Ker Gawl. (シヨクヨウカンナ)	Cannaceae	U	Okinawa	<0.05
MPR-0147	<i>Curcuma phaeocaulis</i> Valetton (ガジュツ)	Zingiberaceae	Rh	Kagoshima	<0.05
MPR-0148	<i>Curcuma longa</i> L. (ウコン)	Zingiberaceae	Rh	Kagoshima	<0.05
MPR-0149	<i>Gastrodia elata</i> Blume (オニノヤガラ)	Orchidaceae	U	Hokkaido	<0.05

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-2. (continued)

Sample no.	Scientific name (和名)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site	Endotoxin activity (EU/mL)
MPR-0150	<i>Microlepia strigosa</i> (Thunb.) C.Presl (イシカグマ)	Pteridaceae	U	Kagoshima	0.15
MPR-0151	<i>Pteris cretica</i> L. (オオバノイノモトソウ)	Pteridaceae	W	Ehime	0.22
MPR-0152	<i>Leptochilus wrightii</i> (Hook.) X.C.Zhang (ヤリノホクリハラン)	Polypodiaceae	U	Kagoshima	0.07
MPR-0153	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume var. <i>japonica</i> Miq. (イノコヅチ)	Amaranthaceae	R	Ibaraki	0.24
MPR-0154	<i>Aconitum grossedentatum</i> (Nakai) Nakai var. <i>sikokianum</i> (Nakai) Nakai ex Tamura et Namba (シコクブシ)	Ranunculaceae	U	Kochi	0.14
MPR-0155	<i>Chloranthus serratus</i> (Thunb.) Roem. et Schult. (フタリシズカ)	Chloranthaceae	W	Ehime	0.12
MPR-0156	<i>Chloranthus serratus</i> (Thunb.) Roem. et Schult. (フタリシズカ)	Chloranthaceae	U	Yamanashi	0.13
MPR-0157	<i>Corydalis pallida</i> (Thunb.) Pers. var. <i>pallida</i> (フウロケマン)	Papaveraceae	W	Ehime	0.17
MPR-0158	<i>Macleaya cordata</i> (Willd.) R.Br. (タケニグサ)	Papaveraceae	U	Ibaraki	0.15
MPR-0159	<i>Agrimonia nipponica</i> Koidz. (ヒメキンミズヒキ)	Rosaceae	U	Ibaraki	0.06
MPR-0160	<i>Indigofera trifoliata</i> L. (ミツバノコマツナギ)	Leguminosae	U	Okinawa	0.13
MPR-0161	<i>Medicago polymorpha</i> L. (ウマゴヤシ)	Leguminosae	W	Ehime	0.11
MPR-0162	<i>Skimmia japonica</i> Thunb. var. <i>intermedia</i> Komatsu f. <i>repens</i> (Nakai) Ohwi (ツルシキミ)	Rutaceae	R and S	Hokkaido	0.12
MPR-0163	<i>Impatiens textorii</i> Miq. (ツリフネソウ)	Balsaminaceae	R	Yamanashi	0.22
MPR-0164	<i>Cryptotaenia canadensis</i> (L.) DC. subsp. <i>japonica</i> (Hassk.) Hand.-Mazz. (ミツバ)	Umbelliferae	U	Ibaraki	0.45
MPR-0165	<i>Sanicula chinensis</i> Bunge (ウマノミツバ)	Umbelliferae	U	Yamanashi	0.16
MPR-0166	<i>Ophiorrhiza kuroiwae</i> Makino (リュウキュウイナモリ)	Rubiaceae	R and S	Okinawa	0.09
MPR-0167	<i>Trigonotis brevipes</i> (Maxim.) Maxim. (ミズタバコ)	Boraginaceae	W	Ehime	0.53
MPR-0168	<i>Ajuga japonica</i> Miq. (オウギカズラ)	Labiatae	W	Kochi	0.15
MPR-0169	<i>Plantago virginica</i> L. (ツボミオオバコ)	Plantaginaceae	R	Ibaraki	0.06
MPR-0170	<i>Adenocaulon himalaicum</i> Edgew. (ノブキ)	Compositae	R	Nagano	0.06
MPR-0171	<i>Eupatorium glehnii</i> F.Schmidt ex Trautv. (ヨツバヒヨドリ)	Compositae	U	Hokkaido	0.09
MPR-0172	<i>Farfugium japonicum</i> (L.) Kitam. (ツワブキ)	Compositae	W	Chiba	0.08
MPR-0173	<i>Lactuca indica</i> L. (アキノノゲシ)	Compositae	R	Ehime	0.19
MPR-0174	<i>Nemosencio nikoensis</i> (Miq.) B.Nord. (サワギク)	Compositae	W	Ehime	0.81
MPR-0175	<i>Pilosella aurantiaca</i> (L.) F.Schultz et Sch.Bip. (コウリンタンポポ)	Compositae	R	Hokkaido	0.09
MPR-0176	<i>Senecio pseudoarnica</i> Less. (エゾオグルマ)	Compositae	R	Hokkaido	0.12
MPR-0177	<i>Senecio pseudoarnica</i> Less. (エゾオグルマ)	Compositae	R	Hokkaido	0.19
MPR-0178	<i>Taimingasa yatabei</i> (Matsum. et Koidz.) C.Ren et Q.E.Yang var. <i>occidentalis</i> (F. Maek. ex Kitam.) C.Ren et Q.E.Yang (ニシノヤマタイミンガサ)	Compositae	W	Kochi	0.05
MPR-0179	<i>Tricyrtis hirta</i> (Thunb.) Hook. (ホトトギス)	Liliaceae	U	Shizuoka	0.07
MPR-0180	<i>Iris tectorum</i> Maxim. (イチハツ)	Iridaceae	U	Ibaraki	0.07
MPR-0181	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Raeusch. var. <i>koenigii</i> (Retz.) Pilg. (チガヤ)	Gramineae	U	Ibaraki	0.05
MPR-0182	<i>Oplismenus undulatifolius</i> (Ard.) Roem. et Schult. (チヂミザサ)	Gramineae	U	Yamanashi	0.35
MPR-0183	<i>Saccharum officinarum</i> L. (サトウキビ)	Gramineae	U	Kagoshima	0.11
MPR-0184	<i>Bolboschoenus koshevnikovii</i> (Litv. ex Zinger) A.E.Kozhev. (コウキヤガラ)	Cyperaceae	W	Ehime	0.11
MPR-0185	<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Rchb.f. (シラン)	Orchidaceae	U	Ibaraki	0.07
MPR-0186	<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C.Presl (タマシダ)	Davalliaceae	W	Kochi	0.26
MPR-0187	<i>Asplenium wrightii</i> D.C.Eaton ex Hook. (クルマシダ)	Aspleniaceae	U	Kochi	0.36
MPR-0188	<i>Neolepisorus ensatus</i> (Thunb.) Ching (クリハラン)	Polypodiaceae	U	Shizuoka	0.39
MPR-0189	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk (タクシヤ)	Alismataceae	U	Ibaraki	0.40
MPR-0190	<i>Sesuvium portulacastrum</i> (L.) L. (ミルスベリヒユ)	Aizoaceae	R and S	Okinawa	0.26
MPR-0191	<i>Thalictrum minus</i> L. var. <i>hypoleucum</i> (Siebold et Zucc.) Miq. (アキカラマツ)	Ranunculaceae	U	Yamanashi	0.36
MPR-0192	<i>Aconitum grossedentatum</i> (Nakai) Nakai var. <i>sikokianum</i> (Nakai) Nakai ex Tamura et Namba (シコクブシ)	Ranunculaceae	U	Ehime	0.37
MPR-0193	<i>Saxifraga fortunei</i> Hook.f. var. <i>obtusocuneata</i> (Makino) Nakai (ウチワダイモンジソウ)	Saxifragaceae	W	Kochi	0.48
MPR-0194	<i>Empetrum nigrum</i> L. var. <i>japonicum</i> K. Koch (ガンコウラン)	Empetraceae	U	Hokkaido	0.41
MPR-0195	<i>Lysimachia mauritiana</i> Lam. (ハマボッス)	Primulaceae	R	Okinawa	0.38
MPR-0196	<i>Isodon japonicus</i> (Burm.f.) H.Hara (ヒキオコシ)	Labiatae	U	Yamanashi	0.29
MPR-0197	<i>Siphonostegia chinensis</i> Benth. ex Hook. et Arn. (ヒキヨモギ)	Scrophulariaceae	U	Yamanashi	0.46

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-2. (continued)

Sample no.	Scientific name (和名)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site	Endotoxin activity (EU/mL)
MPR-0198	<i>Plantago asiatica</i> L. (オオバコ)	Plantaginaceae	U	Hokkaido	0.30
MPR-0199	<i>Adenocaulon himalaicum</i> Edgew. (ノブキ)	Compositae	R	Yamanashi	0.37
MPR-0200	<i>Youngia japonica</i> (L.) DC. (オニタビラコ)	Compositae	R	Ibaraki	0.42
MPR-0201	<i>Thuarea involuta</i> (G.Forst.) R.Br. ex Sm. (クロイワザサ)	Gramineae	U	Kagoshima	0.42
MPR-0202	<i>Cheilanthes argentea</i> (S.G.Gmel.) Kunze (ヒメウラジロ)	Pteridaceae	W	Kochi	0.81
MPR-0203	<i>Monachosorum maximowiczii</i> (Baker) Hayata (フジシダ)	Pteridaceae	W	Kochi	0.67
MPR-0204	<i>Pteris cretica</i> L. (オオバノイノモトソウ)	Pteridaceae	U	Shizuoka	1.34
MPR-0205	<i>Diplazium hachijoense</i> Nakai (シロヤマシダ)	Dryopteridaceae	U	Kagoshima	1.11
MPR-0206	<i>Leptochilus neopothifolius</i> Nakaike (オオイワヒトデ)	Polypodiaceae	U	Kagoshima	0.72
MPR-0207	<i>Pyrrosia lingua</i> (Thunb.) Farw. (ヒトツバ)	Polypodiaceae	U	Chiba	2.28
MPR-0208	<i>Elatostema involucratum</i> Franch. et Sav. (ウワバミソウ)	Urticaceae	W	Ehime	0.77
MPR-0209	<i>Rumex acetosa</i> L. (スイバ)	Polygonaceae	U	Ibaraki	2.20
MPR-0210	<i>Stellaria sessiliflora</i> Y.Yabe (ミヤマハコベ)	Caryophyllaceae	W	Nagano	0.99
MPR-0211	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume var. <i>fauriei</i> (H.Lév. et Vaniot) (ヒナタイノコツチ)	Amaranthaceae	R	Ibaraki	0.54
MPR-0212	<i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Wormsk. ex Turcz. (サラシナシヨウマ)	Ranunculaceae	U	Yamanashi	0.95
MPR-0213	<i>Clematis stans</i> Siebold et Zucc. (クサボタン)	Ranunculaceae	U	Yamanashi	0.92
MPR-0214	<i>Ranunculus japonicus</i> Thunb. (ウマノアシガタ)	Ranunculaceae	R	Ibaraki	2.92
MPR-0215	<i>Ranunculus silerifolius</i> H.Lév. var. <i>glaber</i> (H.Boissieu) Tamura (キツネノボタン)	Ranunculaceae	W	Ehime	1.33
MPR-0216	<i>Ranunculus silerifolius</i> H.Lév. var. <i>glaber</i> (H.Boissieu) Tamura (キツネノボタン)	Ranunculaceae	R	Ibaraki	2.20
MPR-0217	<i>Caulophyllum robustum</i> Maxim. (ルイヨウボタン)	Berberidaceae	U	Yamanashi	0.55
MPR-0218	<i>Paeonia japonica</i> (Makino) Miyabe et Takeda (ヤマシヤクヤク)	Paeoniaceae	U	Kochi	0.51
MPR-0219	<i>Actinidia arguta</i> (Siebold et Zucc.) Planch. ex Miq. var. <i>arguta</i> (サルナシ)	Actinidiaceae	R	Yamanashi	0.72
MPR-0220	<i>Hypericum sikokumontanum</i> Makino (タカネオトギリ)	Guttiferae	W	Kochi	1.31
MPR-0221	<i>Papaver dubium</i> L. (ナガミヒナゲシ)	Papaveraceae	R	Ibaraki	2.17
MPR-0222	<i>Potentilla chinensis</i> Ser. (カワラサイコ)	Rosaceae	W	Nagano	0.72
MPR-0223	<i>Desmodium incanum</i> (Sw.) DC. (タチシバハギ)	Leguminosae	R and S	Okinawa	0.76
MPR-0224	<i>Oxalis articulata</i> Savigny (イモカタバミ)	Oxalidaceae	W	Ibaraki	0.09
MPR-0225	<i>Boeninghausenia albiflora</i> (Hook.) Rchb. ex Meisn. var. <i>japonica</i> (Nakai ex Makino et Nemoto) Suzuki (マツカゼソウ)	Rutaceae	R and S	Shizuoka	1.30
MPR-0226	<i>Viola shikokiana</i> Makino (シコクスミレ)	Violaceae	W	Kochi	1.08
MPR-0227	<i>Sanicula chinensis</i> Bunge (ウマノミツバ)	Umbelliferae	U	Yamanashi	0.64
MPR-0228	<i>Sanicula chinensis</i> Bunge (ウマノミツバ)	Umbelliferae	U	Hokkaido	0.77
MPR-0229	<i>Lysimachia mauritiana</i> Lam. (ハマボッス)	Primulaceae	R and S	Okinawa	0.80
MPR-0230	<i>Clinopodium coreanum</i> (H.Lév.) H.Hara subsp. <i>coreanum</i> (クルマバナ)	Labiatae	W	Ishikawa	0.57
MPR-0231	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt. (メハジキ)	Labiatae	R	Ibaraki	1.50
MPR-0232	<i>Orobancha minor</i> Sm. (ヤセウツボ)	Orobanchaceae	W	Ibaraki	0.05
MPR-0233	<i>Plantago asiatica</i> L. (オオバコ)	Plantaginaceae	R	Chiba	2.25
MPR-0234	<i>Campanula punctata</i> Lam. var. <i>hondoensis</i> (Kitam.) Ohwi (ヤマホタルブクロ)	Campanulaceae	U	Yamanashi	0.61
MPR-0235	<i>Aster iinumae</i> Kitam. (ユウガギク)	Compositae	U	Yamanashi	0.94
MPR-0236	<i>Aster leiophyllus</i> Franch. et Sav. var. <i>leiophyllus</i> (シロヨメナ)	Compositae	U	Yamanashi	0.58
MPR-0237	<i>Aster microcephalus</i> (Miq.) Franch. et Sav. var. <i>ovatus</i> (Franch. et Sav.) Soejima et Mot.Ito (ノコンギク)	Compositae	R and S	Yamanashi	1.06
MPR-0238	<i>Carpesium abrotanoides</i> L. (ヤブタバコ)	Compositae	R	Ibaraki	2.32
MPR-0239	<i>Chrysanthemum pacificum</i> Nakai (イソギク)	Compositae	U	Shizuoka	1.07
MPR-0240	<i>Serratula coronata</i> L. subsp. <i>insularis</i> (Ilijin) Kitam. (タムラソウ)	Compositae	U	Yamanashi	0.57
MPR-0241	<i>Disporum smilacinum</i> A.Gray (チゴユリ)	Liliaceae	W	Nagano	0.94
MPR-0242	<i>Disporum smilacinum</i> A.Gray (チゴユリ)	Liliaceae	R	Yamanashi	1.01
MPR-0243	<i>Oplismenus undulatifolius</i> (Ard.) Roem. et Schult. (チヂミザサ)	Gramineae	U	Yamanashi	0.83

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-2. (continued)

Sample no.	Scientific name (和名)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site	Endotoxin activity (EU/mL)
MPR-0244	<i>Bolbitis subcordata</i> (Copel.) Ching (ハツカシダ)	Dryopteridaceae	U	Kagoshima	4.94
MPR-0245	<i>Magnolia kobus</i> DC. (コブシ)	Magnoliaceae	R	Yamanashi	3.44
MPR-0246	<i>Thalictrum minus</i> L. var. <i>hypoleucum</i> (Siebold et Zucc.) Miq. (アキカラマツ)	Ranunculaceae	U	Yamanashi	4.34
MPR-0247	<i>Sedum japonicum</i> Siebold ex Miq. subsp. <i>oryzifolium</i> (Makino) H. Ohba var. <i>oryzifolium</i> (Makino) H. Ohba (タイトゴメ)	Crassulaceae	R	Kagoshima	3.06
MPR-0248	<i>Cryptotaenia canadensis</i> (L.) DC. subsp. <i>japonica</i> (Hassk.) Hand.-Mazz. (ミツバ)	Umbelliferae	U	Ibaraki	3.37
MPR-0249	<i>Cryptotaenia canadensis</i> (L.) DC. subsp. <i>japonica</i> (Hassk.) Hand.-Mazz. (ミツバ)	Umbelliferae	U	Yamanashi	3.54
MPR-0250	<i>Daucus carota</i> L. subsp. <i>carota</i> (ノラニンジン)	Umbelliferae	U	Hokkaido	2.60
MPR-0251	<i>Ajuga decumbens</i> Thunb. (キランソウ)	Labiatae	W	Ehime	1.70
MPR-0252	<i>Lycopus lucidus</i> Turcz. ex Benth. (シロネ)	Labiatae	U	Hokkaido	2.71
MPR-0253	<i>Valeriana flaccidissima</i> Maxim. (ツルカノコソウ)	Valerianaceae	W	Ehime	1.12
MPR-0254	<i>Ixeridium dentatum</i> (Thunb.) Tzvelev subsp. <i>nipponicum</i> (Nakai) Pak et Kawano var. <i>albiflorum</i> (Makino) Tzvelev f. <i>amplifolium</i> (Kitam.) H. Nakai et H. Hashi (ハナニガナ)	Compositae	R	Hokkaido	3.18
MPR-0255	<i>Cardiocrinum cordatum</i> (Thunb.) Makino (ウバユリ)	Liliaceae	U	Yamanashi	2.29
MPR-0256	<i>Lilium pensylvanicum</i> Ker Gawl. (エゾスカシユリ)	Liliaceae	U	Hokkaido	3.48
MPR-0257	<i>Reineckea carnea</i> (Andrews) Kunth (キチジョウソウ)	Liliaceae	U	Ibaraki	3.02
MPR-0258	<i>Cyperus flavidus</i> Retz. (アゼガヤツリ)	Cyperaceae	U	Kagoshima	4.28
MPR-0259	<i>Hymenophyllum barbatum</i> (Bosch) Baker (コウヤコケシノブ)	Hymenophyllaceae	W	Ehime	23.85
MPR-0260	<i>Lemmaphyllum microphyllum</i> C. Presl (マメヅタ)	Polypodiaceae	U	Chiba	5.96
MPR-0261	<i>Persicaria thunbergii</i> (Siebold et Zucc.) H. Gross (ミヅソバ)	Polygonaceae	U	Yamanashi	51.27
MPR-0262	<i>Dianthus japonicus</i> Thunb. (ハマナデシコ)	Caryophyllaceae	R	Ehime	5.29
MPR-0263	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. (チョウセンゴミシ)	Schisandraceae	R	Hokkaido	6.65
MPR-0264	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. (チョウセンゴミシ)	Schisandraceae	R	Yamanashi	9.08
MPR-0265	<i>Asarum caulescens</i> Maxim. (フタバアオイ)	Aristolochiaceae	W	Ehime	5.11
MPR-0266	<i>Corydalis incisa</i> (Thunb.) Pers. (ムラサキケマン)	Papaveraceae	R	Ibaraki	12.03
MPR-0267	<i>Eschscholzia californica</i> Cham. (ハナビシソウ)	Papaveraceae	R	Ibaraki	6.21
MPR-0268	<i>Sedum makinoi</i> Maxim. (マルバマンネングサ)	Crassulaceae	W	Kochi	5.59
MPR-0269	<i>Chrysosplenium grayanum</i> Maxim. (ネコノメソウ)	Saxifragaceae	W	Nagano	21.50
MPR-0270	<i>Chrysosplenium tosaense</i> (Makino) Makino ex Sutô (タチネコノメソウ)	Saxifragaceae	W	Ehime	6.26
MPR-0271	<i>Mitella furusei</i> Ohwi var. <i>furusei</i> (ミカワチャルメルソウ)	Saxifragaceae	W	Nagano	5.55
MPR-0272	<i>Mitella stylosa</i> H. Boissieu var. <i>makinoi</i> (H. Hara) Wakab. (シコクチャルメルソウ)	Saxifragaceae	W	Kochi	8.73
MPR-0273	<i>Lysimachia clethroides</i> Duby (オカトラノオ)	Primulaceae	R	Yamanashi	7.88
MPR-0274	<i>Clinopodium gracile</i> (Benth.) Kuntze (トウバナ)	Labiatae	W	Ishikawa	7.47
MPR-0275	<i>Clinopodium gracile</i> (Benth.) Kuntze (トウバナ)	Labiatae	W	Ehime	18.18
MPR-0276	<i>Isodon inflexus</i> (Thunb.) Kudô (ヤマハッカ)	Labiatae	U	Yamanashi	8.61
MPR-0277	<i>Digitalis purpurea</i> L. (ジギタリス)	Scrophulariaceae	R	Ibaraki	7.30
MPR-0278	<i>Anaphalis margaritacea</i> (L.) Benth. et Hook. f. var. <i>angustifolia</i> (Franch. et Sav.) Hayata (ホソバナ ヤマハハコ)	Compositae	W	Kochi	6.52
MPR-0279	<i>Anaphalis margaritacea</i> (L.) Benth. et Hook. f. var. <i>margaritacea</i> (ヤマハハコ)	Compositae	U	Hokkaido	8.35
MPR-0280	<i>Artemisia stelleriana</i> Besser (シロヨモギ)	Compositae	U	Hokkaido	6.99
MPR-0281	<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers. (ヒメジョオン)	Compositae	R	Nagano	55.44
MPR-0282	<i>Hemisteptia lyrata</i> (Bunge) Fisch. et C. A. Mey. (キツネアザミ)	Compositae	R	Ibaraki	5.96
MPR-0283	<i>Maianthemum dilatatum</i> (Alph. Wood) A. Nelson et J. F. Macbr. (マイヅルソウ)	Liliaceae	U	Hokkaido	7.53
MPR-0284	<i>Luzula plumosa</i> E. Mey. subsp. <i>plumosa</i> (ヌカボシソウ)	Juncaceae	W	Ehime	8.90
MPR-0285	<i>Commelina communis</i> L. (ツユクサ)	Commelinaceae	U	Ibaraki	11.19
MPR-0286	<i>Carex blepharicarpa</i> Franch. (ショウジョウソウ)	Cyperaceae	W	Kochi	16.22
MPR-0287	<i>Carex siderosticta</i> Hance (タガネソウ)	Cyperaceae	U	Yamanashi	11.39
MPR-0288	<i>Cymbidium goeringii</i> (Rchb. f.) Rchb. f. (シュンラン)	Orchidaceae	W	Nagano	15.74

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-3. Plant extract samples for which the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL)
Test was possible (Crude drugs)

English name (和名)	Family	Part ^{a)}	Sample number	Number of endotoxin detected sample	Endotoxin activity (EU/mL)
Achyranthes Root (牛膝)	Amaranthaceae	R	7	0	
Clematis Root (威靈仙)	Ranunculaceae	R	14	2	0.97, 3.64
Aconitie Root (附子)	Ranunculaceae	R	16	0	
Paony Root (芍藥)	Paeoniaceae	R	13	1	0.15
Ginseng (人參)	Araliaceae	R	12	0	
Japanese Angelica root (当歸)	Umbelliferae	R	13	0	
Lithospermum Root (紫根)	Boraginaceae	R	2	1	0.06
Rehmannia Root (地黃)	Scrophulariaceae	R	11	1	0.11
Platycodon Root (桔梗)	Campanulaceae	R	18	0	
Alisma Rhizome (沢瀉)	Alismataceae	Rh	6	0	
Anemarrhena Rhizome (知母)	Liliaceae	Rh	12	0	
Dioscorea Rhizome (山藥)	Dioscoreaceae	Rh	2	0	

^{a)} R, root; Rh, rhizome

Table 1-3-4. Plant extract samples for which the *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL)
Test was not possible (Field collected)

Sample no.	Scientific name (和英)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site
MPR-0289	<i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trevis. (トウゲシバ)	Lycopodiaceae	W	Nagano
MPR-0290	<i>Lycopodium clavatum</i> L. var. <i>nipponicum</i> Nakai (ヒカゲノカズラ)	Lycopodiaceae	U	Hokkaido
MPR-0291	<i>Plagiogyria japonica</i> Nakai (キジノオシダ)	Plagiogyriaceae	U	Ibaraki
MPR-0292	<i>Asplenium ritoense</i> Hayata (コウザキシダ)	Aspleniaceae	W	Kochi
MPR-0293	<i>Asplenium scolopendrium</i> L. subsp. <i>japonicum</i> (Kom.) Rasbach, Reichst. et Viane (コタニワタリ)	Aspleniaceae	U	Hokkaido
MPR-0294	<i>Ctenitis subglandulosa</i> (Hance) Ching (カツモイノデ)	Dryopteridaceae	U	Kagoshima
MPR-0295	<i>Cyrtomium falcatum</i> (L.f.) C.Presl (オニヤブソテツ)	Dryopteridaceae	U	Kagoshima
MPR-0296	<i>Polystichum lepidocaulon</i> (Hook.) J.Sm. (オリヅルシダ)	Dryopteridaceae	U	Shizuoka
MPR-0297	<i>Cyrtomium fortunei</i> J.Sm. var. <i>fortunei</i> (ヤブソテツ)	Dryopteridaceae	U	Ibaraki
MPR-0298	<i>Lepisorus thunbergianus</i> (Kaulf.) Ching (ノキシノブ)	Polypodiaceae	U	Ibaraki
MPR-0299	<i>Juglans mandshurica</i> Maxim. var. <i>sachalinensis</i> (Komatsu) Kitam. (オニグルミ)	Juglandaceae	R	Yamanashi
MPR-0300	<i>Pellionia radicans</i> (Siebold et Zucc.) Wedd. var. <i>minima</i> (Makino) Hatus. (サンショウソウ)	Juglandaceae	W	Kochi
MPR-0301	<i>Laportea bulbifera</i> (Siebold et Zucc.) Wedd. (ムカゴイラクサ)	Urticaceae	W	Hokkaido
MPR-0302	<i>Balanophora fungosa</i> J.R. et G.Forst. (リュウキュウツツトリモチ)	Balanophoraceae	U	Okinawa
MPR-0303	<i>Fallopia japonica</i> (Houtt.) Ronse Decr. var. <i>japonica</i> (イタドリ)	Polygonaceae	U	Hokkaido
MPR-0304	<i>Fallopia sachalinensis</i> (F.Schmidt) Ronse Decr. (オオイトドリ)	Polygonaceae	U	Hokkaido
MPR-0305	<i>Persicaria debilis</i> (Meisn.) H.Gross ex W.T.Lee (ミヤマタニソバ)	Polygonaceae	R and S	Nagano
MPR-0306	<i>Persicaria filiformis</i> (Thunb.) Nakai ex W.T.Lee (ミズヒキ)	Polygonaceae	R	Yamanashi
MPR-0307	<i>Rheum palmatum</i> L. (ダイオウ)	Polygonaceae	Rh	Ibaraki
MPR-0308	<i>Rheum rhabarbarum</i> L. (カラダイオウ)	Polygonaceae	U	Ibaraki
MPR-0309	<i>Rheum rhabarbarum</i> L. (マルバダイオウ)	Polygonaceae	U	Ibaraki
MPR-0310	<i>Cerastium fischerianum</i> Ser. (オオバナノミミナグサ)	Caryophyllaceae	R	Hokkaido
MPR-0311	<i>Cerastium fontanum</i> Baumg. subsp. <i>vulgare</i> (Hartm.) Greuter et Burdet var. <i>angustifolium</i> (Franch.) H.Hara (ミミナグサ)	Caryophyllaceae	W	Ehime
MPR-0312	<i>Dianthus superbus</i> L. var. <i>longicalycinus</i> (Maxim.) F.N.Williams (カワラナデシコ)	Caryophyllaceae	R	Yamanashi
MPR-0313	<i>Stellaria uliginosa</i> Murray var. <i>undulata</i> (Thunb.) Fenzl (ノミノフスマ)	Caryophyllaceae	W	Ehime
MPR-0314	<i>Atriplex patens</i> (Litv.) Iljin (ソソバノハマアカザ)	Chenopodiaceae	W	Ehime
MPR-0315	<i>Chenopodium acuminatum</i> Willd. var. <i>vachelii</i> (Hook. et Arn.) Moq. (カワラアカザ)	Chenopodiaceae	W	Ibaraki
MPR-0316	<i>Suaeda maritima</i> (L.) Dumort. subsp. <i>asiatica</i> H.Hara (シマハママツナ)	Chenopodiaceae	U	Okinawa
MPR-0317	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume var. <i>japonica</i> Miq. (ヒカゲイノコズチ)	Amaranthaceae	R	Ibaraki
MPR-0318	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume var. <i>japonica</i> Miq. (ヒカゲイノコズチ)	Amaranthaceae	R	Yamanashi
MPR-0319	<i>Clematis stans</i> Siebold et Zucc. (クサボタン)	Ranunculaceae	R	Yamanashi
MPR-0320	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Baill. (ハンゲシヨウ)	Saururaceae	W	Ehime
MPR-0321	<i>Peperomia japonica</i> Makino (サダソウ)	Piperaceae	R and S	Kagoshima
MPR-0322	<i>Chloranthus quadrifolius</i> (A.Gray) H.Ohba et S.Akiyama (ヒトリシズカ)	Chloranthaceae	R	Yamanashi
MPR-0323	<i>Asarum caulescens</i> Maxim. (フタバアオイ)	Aristolochiaceae	W	Kochi
MPR-0324	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall. var. <i>trichocarpa</i> (Bunge) Stearn (シヤクヤク)	Paeoniaceae	R	Ibaraki
MPR-0325	<i>Hypericum perforatum</i> L. subsp. <i>Perforatum</i> (セイヨウオトギリソウ)	Guttiferae	U	Hokkaido
MPR-0326	<i>Triadenum japonicum</i> (Blume) Makino (ミズオトギリ)	Guttiferae	U	Hokkaido
MPR-0327	<i>Papaver dubium</i> L. (ナガミヒナゲシ)	Papaveraceae	R	Ibaraki
MPR-0328	<i>Papaver dubium</i> L. (ナガミヒナゲシ)	Papaveraceae	R	Ibaraki
MPR-0329	<i>Cardamine leucantha</i> (Tausch) O.E.Schulz (コンロンソウ)	Cruciferae	W	Ehime
MPR-0330	<i>Lepidium englerianum</i> (Muschler) Al-Shehbaz (ハマガラシ)	Cruciferae	R	Okinawa
MPR-0331	<i>Lepidium virginicum</i> L. (マメゲンバイナズナ)	Cruciferae	R	Saitama
MPR-0332	<i>Nasturtium officinale</i> R.Br. (オランダガラシ)	Cruciferae	W	Yamanashi
MPR-0333	<i>Sedum japonicum</i> Siebold ex Miq. subsp. <i>oryzifolium</i> (Makino) H.Ohba var. <i>oryzifolium</i> (Makino) H.Ohba (タイトゴメ)	Crassulaceae	R and S	Shizuoka
MPR-0334	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge (ツルマンネングサ)	Crassulaceae	W	Nagano
MPR-0335	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge (ツルマンネングサ)	Crassulaceae	W	Ibaraki
MPR-0336	<i>Astilbe japonica</i> (C.Morren et Decne.) A.Gray (アワモリシヨウマ)	Saxifragaceae	W	Kochi
MPR-0337	<i>Astilbe odontophylla</i> Miq. (トリアシシヨウマ)	Saxifragaceae	W	Ishikawa
MPR-0338	<i>Astilbe thunbergii</i> (Siebold et Zucc.) Miq. var. <i>thunbergii</i> (アカシヨウマ)	Saxifragaceae	U	Yamanashi

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-4. (continued)

Sample no.	Scientific name (和英)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site
MPR-0339	<i>Chrysosplenium fauriei</i> Franch. (ホクリクネコノメ)	Saxifragaceae	W	Nagano
MPR-0340	<i>Chrysosplenium tosaense</i> (Makino) Makino ex Sutô (タチネコノメソウ)	Saxifragaceae	W	Kochi
MPR-0341	<i>Mitella japonica</i> Maxim. (オオチャルメルソウ)	Saxifragaceae	W	Ehime
MPR-0342	<i>Mitella pauciflora</i> Rosend. (コチャルメルソウ)	Saxifragaceae	W	Kochi
MPR-0343	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb. var. <i>japonica</i> (Miq.) Nakai (キンミズヒキ)	Rosaceae	U	Ibaraki
MPR-0344	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb. var. <i>japonica</i> (Miq.) Nakai (キンミズヒキ)	Rosaceae	U	Yamanashi
MPR-0345	<i>Comarum palustre</i> L. (クロバナノウゲ)	Rosaceae	U	Hokkaido
MPR-0346	<i>Potentilla fragarioides</i> L. var. <i>major</i> Maxim. (キジムシロ)	Rosaceae	U	Yamanashi
MPR-0347	<i>Potentilla fragarioides</i> L. var. <i>major</i> Maxim. (キジムシロ)	Rosaceae	U	Yamanashi
MPR-0348	<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (ワレモコウ)	Rosaceae	U	Ibaraki
MPR-0349	<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (ワレモコウ)	Rosaceae	U	Ibaraki
MPR-0350	<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (ワレモコウ)	Rosaceae	U	Yamanashi
MPR-0351	<i>Sanguisorba tenuifolia</i> Fisch. ex Link (ナガボノシロワレモコウ)	Rosaceae	U	Hokkaido
MPR-0352	<i>Sanguisorba tenuifolia</i> Fisch. ex Link (ナガボノシロワレモコウ)	Rosaceae	U	Hokkaido
MPR-0353	<i>Chamaecrista nomame</i> (Makino) H. Ohashi (カワラケツメイ)	Leguminosae	R	Ibaraki
MPR-0354	<i>Lespedeza cuneata</i> (Dum.Cours.) G. Don (メドハギ)	Leguminosae	R	Yamanashi
MPR-0355	<i>Sophora flavescens</i> Aiton (クララ)	Leguminosae	R	Ibaraki
MPR-0356	<i>Geranium shikokianum</i> Matsum. var. <i>shikokianum</i> (シコクフウロ)	Geraniaceae	W	Kochi
MPR-0357	<i>Geranium wilfordii</i> Maxim. (ミツバフウロ)	Geraniaceae	R and S	Yamanashi
MPR-0358	<i>Euphorbia cyparissias</i> L. (マツバタイゲキ)	Euphorbiaceae	U	Ibaraki
MPR-0359	<i>Euphorbia lathyris</i> L. (ホルトソウ)	Euphorbiaceae	U	Ibaraki
MPR-0360	<i>Euphorbia nutans</i> Lag. (オオニシキソウ)	Euphorbiaceae	U	Nagano
MPR-0361	<i>Phyllanthus lepidocarpus</i> Siebold et Zucc. (コミカンソウ)	Euphorbiaceae	U	Ibaraki
MPR-0362	<i>Viola ovato-oblonga</i> (Miq.) Makino (ナガバナタチツボスミレ)	Violaceae	U	Kumamoto
MPR-0363	<i>Lythrum salicaria</i> L. (エゾミソハギ)	Lythraceae	R	Hokkaido
MPR-0364	<i>Circaea cordata</i> Royle (ウシタキノソウ)	Onagraceae	R	Yamanashi
MPR-0365	<i>Ludwigia ovalis</i> Miq. (ミズユキノシタ)	Onagraceae	W	Ehime
MPR-0366	<i>Oenothera biennis</i> L. (メマツヨイグサ)	Onagraceae	R	Hokkaido
MPR-0367	<i>Angelica shikokiana</i> Makino ex Y. Yabe (イヌトウキ)	Umbelliferae	U	Kochi
MPR-0368	<i>Cnidium japonicum</i> Miq. (ハマゼリ)	Umbelliferae	W	Ehime
MPR-0369	<i>Glehnia littoralis</i> F. Schmidt ex Miq. (ハマボウフウ)	Umbelliferae	U	Okinawa
MPR-0370	<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (ボウフウ)	Umbelliferae	U	Ibaraki
MPR-0371	<i>Torilis japonica</i> (Houtt.) DC. (ヤブジラミ)	Umbelliferae	U	Yamanashi
MPR-0372	<i>Ardisia japonica</i> (Thunb.) Blume (ヤブコウジ)	Myrsinaceae	U	Nagano
MPR-0373	<i>Lysimachia clethroides</i> Duby (オカトラノオ)	Primulaceae	U	Ibaraki
MPR-0374	<i>Lysimachia clethroides</i> Duby (オカトラノオ)	Primulaceae	U	Nagano
MPR-0375	<i>Lysimachia vulgaris</i> L. subsp. <i>davurica</i> (Ledeb.) Tatew. (クサレダマ)	Primulaceae	U	Yamanashi
MPR-0376	<i>Swertia bimaculata</i> (Siebold et Zucc.) Hook. f. et Thomson ex C. B. Clarke (アケボノソウ)	Gentianaceae	U	Ehime
MPR-0377	<i>Dammacanthus indicus</i> C. F. Gaertn. var. <i>indicus</i> (アリドオシ)	Rubiaceae	U	Shizuoka
MPR-0378	<i>Galium gracilens</i> (A. Gray) Makino (ヒメヨツバムグラ)	Rubiaceae	W	Ibaraki
MPR-0379	<i>Psychotria serpens</i> L. (シラタマカズラ)	Rubiaceae	R	Kagoshima
MPR-0380	<i>Rubia argyi</i> (H. Lévl. et Vaniot) H. Hara ex Lauener et D. K. Ferguson (アカネ)	Rubiaceae	R	Ibaraki
MPR-0381	<i>Lithospermum zollingeri</i> A. DC. (ホタルカズラ)	Boraginaceae	W	Kochi
MPR-0382	<i>Ajuga decumbens</i> Thunb. (キランソウ)	Labiatae	R	Ibaraki
MPR-0383	<i>Clinopodium micranthum</i> (Regel) H. Hara var. <i>sachalinense</i> (F. Schmidt) T. Yamaz. et Murata (ミヤマトウバナ)	Labiatae	R	Hokkaido
MPR-0384	<i>Comanthosphace japonica</i> (Miq.) S. Moore (テンニンソウ)	Labiatae	R	Yamanashi
MPR-0385	<i>Glechoma hederacea</i> L. subsp. <i>grandis</i> (A. Gray) H. Hara (カキドオシ)	Labiatae	W	Nagano
MPR-0386	<i>Isodon inflexus</i> (Thunb.) Kudô (ヤマハツカ)	Labiatae	U	Yamanashi
MPR-0387	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt. (メハジキ)	Labiatae	R	Ibaraki
MPR-0388	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt. (メハジキ)	Labiatae	R	Ibaraki
MPR-0389	<i>Salvia japonica</i> Thunb. (アキノタムラソウ)	Labiatae	R	Yamanashi
MPR-0390	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi (コガネバナ)	Labiatae	U	Ibaraki
MPR-0391	<i>Stachys aspera</i> Michx. var. <i>hispidula</i> (Regel) Vorosch. (イヌゴマ)	Labiatae	U	Yamanashi

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-4. (continued)

Sample no.	Scientific name (和英)	Family	Plant part ^{a)}	Collection site
MPR-0392	<i>Solanum carolinense</i> L. (ワルナスビ)	Solanaceae	U	Ibaraki
MPR-0393	<i>Lathraea japonica</i> Miq. (ヤマウツボ)	Scrophulariaceae	W	Kochi
MPR-0394	<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L. (オオカワヂシヤ)	Scrophulariaceae	U	Yamanashi
MPR-0395	<i>Proboscidea louisianica</i> (Mill.) Thell. (ツノゴマ)	Martyniaceae	U	Ibaraki
MPR-0396	<i>Phryma esquirolii</i> H.Lév. (ハエドクソウ)	Phrymaceae	R	Yamanashi
MPR-0397	<i>Phryma esquirolii</i> H.Lév. (ハエドクソウ)	Phrymaceae	R	Chiba
MPR-0398	<i>Adenophora triphylla</i> (Thunb.) A.DC. var. <i>japonica</i> (Regel) H.Hara (ツリガネニンジン)	Campanulaceae	U	Hokkaido
MPR-0399	<i>Adenophora triphylla</i> (Thunb.) A.DC. var. <i>japonica</i> (Regel) H.Hara (ツリガネニンジン)	Campanulaceae	U	Yamanashi
MPR-0400	<i>Aster leiophyllus</i> Franch. et Sav. var. <i>leiophyllus</i> (シロヨメナ)	Compositae	U	Yamanashi
MPR-0401	<i>Aster microcephalus</i> (Miq.) Franch. et Sav. var. <i>yezoensis</i> (Kitam. et H.Hara) Soejima et Mot.Ito (エゾノコンギク)	Compositae	U	Hokkaido
MPR-0402	<i>Aster scaber</i> Thunb. (シラヤマギク)	Compositae	U	Yamanashi
MPR-0403	<i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC. (ホソバオケラ)	Compositae	U	Ibaraki
MPR-0404	<i>Atractylodes ovata</i> (Thunb.) DC. (オケラ)	Compositae	U	Yamanashi
MPR-0405	<i>Cirsium japonicum</i> Fisch. ex DC. (ノアザミ)	Compositae	R and S	Nagano
MPR-0406	<i>Inula helenium</i> L. (オオグルマ)	Compositae	U	Ibaraki
MPR-0407	<i>Pertya rigidula</i> (Miq.) Makino (グルマバハグマ)	Compositae	W	Ishikawa
MPR-0408	<i>Petasites japonicus</i> (Siebold et Zucc.) Maxim. (フキ)	Compositae	U	Hokkaido
MPR-0409	<i>Solidago virgaurea</i> L. subsp. <i>leiocarpa</i> (Benth.) Hultén (ミヤマアキノキリンソウ)	Compositae	R	Hokkaido
MPR-0410	<i>Syneilesis palmata</i> (Thunb.) Maxim. (ヤブレガサ)	Compositae	U	Yamanashi
MPR-0411	<i>Taraxacum officinale</i> Weber ex F.H.Wigg. (セイヨウタンポポ)	Compositae	U	Ibaraki
MPR-0412	<i>Allium thunbergii</i> G.Don (ヤマラッキョウ)	Liliaceae	U	Shizuoka
MPR-0413	<i>Asparagus schoberioides</i> Kunth (キジカクシ)	Liliaceae	U	Yamanashi
MPR-0414	<i>Colchicum autumnale</i> L. (イヌサフラン)	Liliaceae	U	Ibaraki
MPR-0415	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miq. (アマガサユリ)	Liliaceae	U	Ibaraki
MPR-0416	<i>Heloniopsis orientalis</i> (Thunb.) Tanaka (ショウジョウバカマ)	Liliaceae	U	Ishikawa
MPR-0417	<i>Hosta sieboldii</i> (Paxton) J.W.Ingram var. <i>sieboldii</i> f. <i>spathulata</i> (Miq.) W.G.Schmid (コバギボウシ)	Liliaceae	U	Ibaraki
MPR-0418	<i>Lilium longiflorum</i> Thunb. (テッポウユリ)	Liliaceae	U	Nagano
MPR-0419	<i>Metanartheceum luteoviride</i> Maxim. (ノギラン)	Liliaceae	U	Nagano
MPR-0420	<i>Ophiopogon japonicus</i> (Thunb.) Ker Gawl. (ジャノヒゲ)	Liliaceae	U	Ibaraki
MPR-0421	<i>Polygonatum falcatum</i> A.Gray (ナルコユリ)	Liliaceae	U	Ishikawa
MPR-0422	<i>Iris ensata</i> Thunb. var. <i>spontanea</i> (Makino) Nakai ex Makino et Nemoto (ノハナショウブ)	Iridaceae	U	Hokkaido
MPR-0423	<i>Iris pseudacorus</i> L. (キショウブ)	Iridaceae	U	Ibaraki
MPR-0424	<i>Iris setosa</i> Pall. ex Link (ヒオウギアヤメ)	Iridaceae	U	Hokkaido
MPR-0425	<i>Juncus tenuis</i> Willd. (クサイ)	Juncaceae	W	Ehime
MPR-0426	<i>Luzula plumosa</i> E.Mey. subsp. <i>plumosa</i> (ヌカボシソウ)	Juncaceae	W	Ehime
MPR-0427	<i>Commelina communis</i> L. (ツユクサ)	Commelinaceae	U	Yamanashi
MPR-0428	<i>Arthraxon hispidus</i> (Thunb.) Makino (コブナグサ)	Gramineae	W	Ibaraki
MPR-0429	<i>Beckmannia syzigachne</i> (Steud.) Fernald (カズノコグサ)	Gramineae	U	Yamanashi
MPR-0430	<i>Leymus mollis</i> (Trin. ex Spreng.) Pilg. (ハマニンニク)	Gramineae	U	Hokkaido
MPR-0431	<i>Oplismenus undulatifolius</i> (Ard.) Roem. et Schult. (チヂミザサ)	Gramineae	U	Yamanashi
MPR-0432	<i>Setaria pumila</i> (Poir.) Roem. et Schult. (キンエノコログサ)	Gramineae	U	Chiba
MPR-0433	<i>Arisaema ternatipartitum</i> Makino (ミツバテンナンショウ)	Araceae	W	Kochi
MPR-0434	<i>Carex morrowii</i> Boott var. <i>morrowii</i> (カンスゲ)	Cyperaceae	U	Ehime
MPR-0435	<i>Carex sociata</i> Boott (タシロスゲ)	Cyperaceae	U	Okinawa
MPR-0436	<i>Gahnia tristis</i> Nees (クロガヤ)	Cyperaceae	U	Okinawa
MPR-0437	<i>Schoenoplectiella lineolata</i> (Franch. et Sav.) J.D.Jung et H.K.Choi (ヒメホタルイ)	Cyperaceae	R and S	Yamanashi
MPR-0438	<i>Hedychium spicatum</i> Buch.-Ham. ex Sm. (サンナ)	Zingiberaceae	U	Ibaraki
MPR-0439	<i>Zingiber mioga</i> (Thunb.) Roscoe (ミョウガ)	Zingiberaceae	U	Yamanashi
MPR-0440	<i>Curcuma longa</i> L. (ウコン)	Zingiberaceae	Rh	Kagoshima
MPR-0441	<i>Curcuma zedoaria</i> (Christ.) Roscoe (ガジュツ)	Zingiberaceae	Rh	Kagoshima
MPR-0442	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> D.Dietr. (クスリウコン)	Zingiberaceae	Rh	Kagoshima
MPR-0443	<i>Cymbidium goeringii</i> (Rchb.f.) Rchb.f. (シユンラン)	Orchidaceae	U	Nagano

^{a)} W, whole plant; R, root; U, underground part; S, stem; Rh, rhizome

Table 1-3-5. Plant extract samples for which the *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) Test was not possible (Crude drugs)

English name (和名)	Family	Part ^{a)}
Rhubarb (大黃)	Polygonaceae	Rh
Cimicifuga Rhizome (升麻)	Ranunculaceae	Rh
Coptis Rhizome (黃連)	Ranunculaceae	Rh
Asiasarum Root (細辛)	Aristolochiaceae	R
Moutan Bark (牡丹皮)	Paeoniaceae	Br
Corydalis Tuber (延胡索)	Papaveraceae	R
Astragalus Root (黃耆)	Leguminosae	R
Glycyrrhiza (甘草)	Leguminosae	R
Pueraria Root (葛根)	Leguminosae	R
Polygala Root (遠志)	Polygalaceae	R
Aralia Rhizome (獨活)	Araliaceae	Rh
Red Ginseng (紅參)	Araliaceae	R
Angelica Dahurica Root (白芷)	Umbelliferae	R
Bupleurum Root (柴胡)	Umbelliferae	R
Cnidium Rhizome (川芎)	Umbelliferae	Rh
Saposhnikovia Root (防風)	Umbelliferae	R
Japanese Gentian (竜胆)	Gentianaceae	R
Scutellaria Root (黃芩)	Labiatae	R
Atractylodes Lancea Rhizoma (蒼朮)	Compositae	Rh
Atractylodes Rhizome (白朮)	Compositae	Rh
Ginger (生薑)	Zingiberaceae	Rh
Notopterygium (羌活)	Zingiberaceae	Rh
Processed Ginger (乾姜)	Zingiberaceae	Rh
Gastrodia Tuber (天麻)	Orchidaceae	T

^{a)} Rh, rhizome; R, root; Br, bark; T, tuber

Table 1-3-6. Influence of polyphenol compounds and concentrations on the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Test

No.	Chemical name	Compound group	Recovery rate (%) ^{a)}			Effect on reaction curves ^{b)}		
			1 μ M	10 μ M	100 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
1	Gallic acid	Benzoic acid derivative	120	102	0	-	m	l,m
2	Methyl gallate		133	150	209	-	-	l,m
3	Vanillic acid		150	141	133	-	-	-
4	Ellagic acid		113	60	11	-	m ^c	m,l ^{c)}
5	<i>trans-p</i> -Coumaric acid	Phenylpropanoid	117	129	139	-	-	-
6	<i>trans</i> -Caffeic acid		130	70	25	-	-	-
7	Ferulic acid		112	93	18	-	-	-
8	Chlorogenic acid		115	112	61	-	d,l	d,l
9	Rosmarinic acid	130	100	59	-	d,l	d,l	
10	Hesperetin	Flavanone	128	146	87	-	-	-
11	Naringenin		119	55	152	-	- ^{cv}	- ^{c)}
12	Quercetin	Flavonol	98	-4662	0	-	d ^{c)}	d,l ^{c)}
13	Rutin		152	134	-127	-	-	d,l
14	Genistein	Isoflavone	112	112	67	-	-	m ^{c)}
15	Puerarin		136	102	112	-	-	-
16	(+)-Catechin	Flavanol	131	105	116	-	-	-

^{a)} Spike activity was 0.05 EU/mL

^{b)} Tested in the presence of 0.01 % polymyxin B. Letters indicate: m, meandering or deformation; d, decrease in absorbance at 405 nm; l, disappearance of lag

^{c)} Precipitation was observed

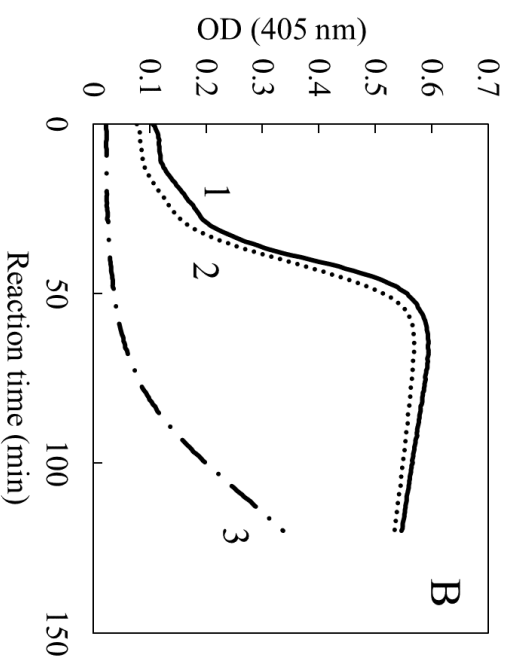
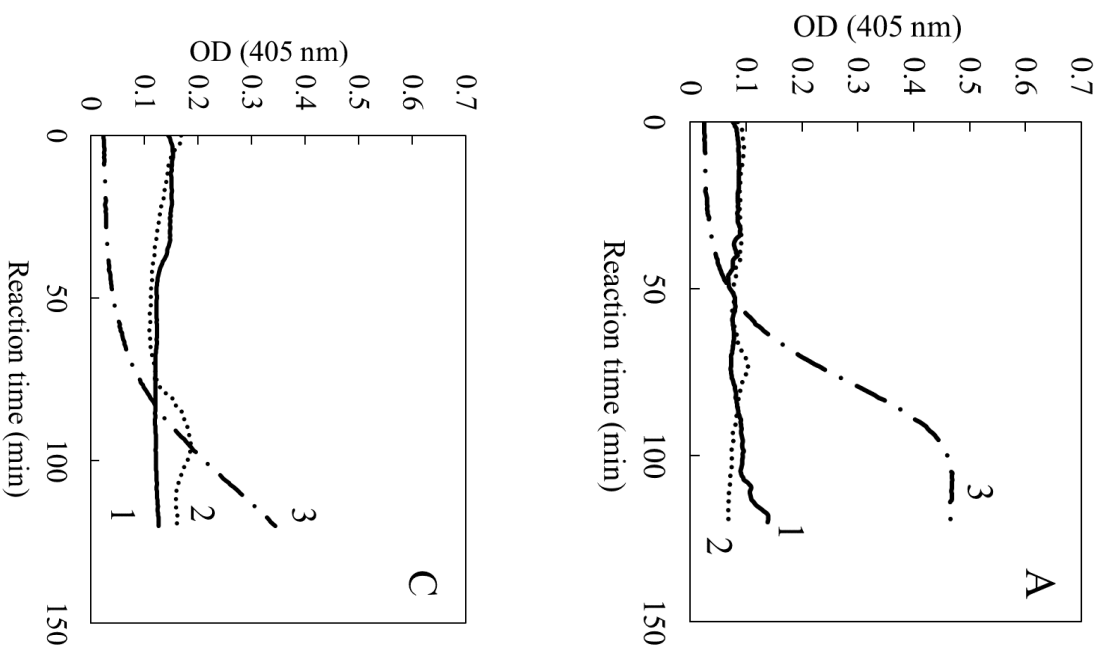


Fig. 1-3-4 Reaction courses of Limulus Amoebocyte Lysate Tests with plant extracts: (A) 0.4 mg/mL *Sanguisorba officinalis*, (B) 0.4 mg/mL *Oenothera biennis*, and (C) 0.4 mg/mL *Lythrum salicaria*. Plant extract conditions were as follows: 1, plant extract with no treatment; 2, plant extract and 0.01 % polymyxin B; and 3, plant extract treated with PVPP

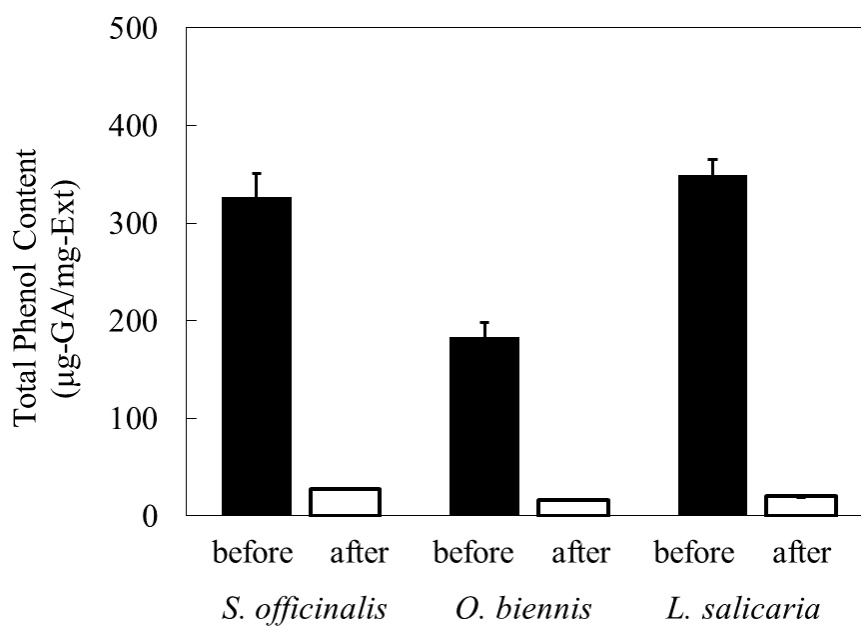


Fig. 1-3-5 Concentration of total phenolic contents of plant extracts (*Sanguisorba officinalis*, *Oenothera biennis*, and *Lythrum salicaria*) before and after PVPP treatment

Table 1-3-1 to 1-3-6 and Fig.1-3-4 to 1-3-5 were reproduced with permission from Biol. Pharm. Bull. Vol. 43 No. 11. Pages 1767 - 1775 Copyright 2020 The Pharmaceutical Society of Japan

第 1 部 小括

第 1 部では植物エキ斯拉イブラリーの構築を目的とし、質及び量の充実を図るため以下の事項を実施した。

植物採取及びエキス作製

日本全国における植物採取で 5,999 点の植物を収集し、現在までに野外採取品および生薬の MeOH 抽出エキスを 12,573 点作製した。海外産植物エキスと合わせ国内最大級の植物エキ斯拉イブラリーの構築を実施した。分注機を使用したエキス分譲する体制も整備し、大学や企業等に対しエキスの分譲を実施している。

ライブラリーの構成植物の調査を実施したところ、各エキスの原料となった植物は野外採取品が 60%、栽培品が 20%、生薬及び海外産植物がそれぞれ約 10%であった。野外採取品、栽培品、生薬の 3 つのグループを構成している植物種の多様度を Simpson の多様度指数及び分類学的多様度指数を用いて比較したところ、いずれのグループも高い多様度が認められた。分類学的多様度について距離別の割合を比較すると、いずれのグループでも被子植物間の距離に相当する距離 4 が全体の 50%以上を占めた。これはいずれのグループでも被子植物の割合が非常に多いことが影響していると考えられた。野外採取品は他 2 グループよりも被子植物—シダ植物間に相当する距離 6 の割合が多く、多様度の面からも構成植物の違いが示された。

食経験・食薬区分情報の付加

食品開発等の場面で利用に直結すると考えられるエキス情報として、原料植物の食薬区分及び食経験情報の調査及び付加を行った。特に食薬区分は法令に関わる部分であることから必須の情報と考えられる。

食薬区分は厚生労働省から公開されている専医及び非医の情報を元とし、食経験情報は各種書籍の情報を元とした。エキス 13,738 点を調査の結果、エキス全体の 27.2%(3,729 点)に食薬区分情報が、39.2%に食経験情報が確認された。食薬区分の内訳は 10.5%(1,481 点)が専医、16.5% (2,248 点)が非医であった。専医は 7 割が国内流通生薬を占めた。食経験については情報有・無のグループ共に食薬区分のないサンプルが 6 割以上を占め、また非医に該当する生薬の多くに食経験が確認された。

現在では食薬区分及び食経験情報に基づいたサンプル分譲を実施しているが、ユーザーからの関心が高い状態が続いている。そのため、今後安定したサンプル分譲システムの構築の必要性が認められた。

エンドトキシン活性情報の付加

エキストラブラリーで作製しているエキスは野外採取品等を使用しているため、環境由来の物質を含む場合がある。その一つとしてグラム陰性菌の細胞表面由来のリポ多糖であるエンドトキシンが挙げられる。ここでは測定法として広く使用されている LAL 法を使用して地下部を含むエキスの測定を実施した。

414 点のエキス測定の結果、野外採取品では 288 点中 43.8%にあたる 139 点から、生薬では 126 点中 4.0%にあたる 5 点からエンドトキシンが検出された。生薬は野外採取品よりも活性及び検出数は低く、また生薬から検出された活性及び件数は報告されている文献値よりも共に小さかった。これは生薬と野外採取品のサンプルの調製過程の違いや測定サンプルの調製手順の違いが関係していると考えられた。しかし、合計 150 点以上のエキスサンプルで測定時の反応曲線の形状異常や回収率の異常値が認められた。そこでポリフェノール化合物を吸着する PVPP を用いて 3 点の植物エキス処理したところ、いずれのエキスでも問題なくエンドトキシンの測定が可能となった。

次に単一のフェノール化合物 16 点を添加して LAL 試験を実施したところ、**caffeic acid** 誘導体並びに **gallic acid** 誘導体に反応曲線の形状異常などの LAL 試験への影響が認められた。タンニンを含むポリフェノール化合物は多くの異性体が存在し、植物エキスは多成分系であることから、実際には相乗的に作用して影響を与えているものと考えられた。

第 2 部 植物エキスライブラリーのスクリーニングへの応用

第 1 章 スクリーニング系の構築

背景と目的

現在日本では 2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患を抱えていると言われている [69]。アレルギー疾患は慢性疾患であり QOL への影響が大きく、原因が特定されていない場合も多い。治療薬としてステロイド薬、抗ヒスタミン薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、メディエーター遊離抑制薬などが使用されるが、既存薬が十分に治療効果を示さない場合も多く、様々な作用機序の抗アレルギー薬の開発が必要とされている。

ヒアルロン酸は(以下 HA)はヒトの結合組織の代表的成分であり、生体の水分の保持や関節の潤滑作用はよく知られている。しかし近年では免疫に関わる機能も明らかになりつつあり、高分子量 HA は消炎作用を、逆に低分子量 HA は炎症作用を持つことが報告されている [70]。この作用を応用し腫がん治療のターゲットとしてがん組織内の低分子量 HA に着目している例も報告されている [71]。

ヒアルロニダーゼ(以下 HAase)はヒアルロン酸(以下 HA)を加水分解することで組織透過性を上昇させる酵素である。多くの哺乳類の受精時における重要な酵素である一方、炎症反応を増悪させる作用も持ち、ハチやヘビの毒にも含まれていることが知られている [72]。HAase はまたケミカルメディエーター放出作用にも関連があるとされており [73]、その働きについてはまだ不明な点があるものの、免疫をコントロールすることにつながる可能性があると考えられている。

HAase 阻害活性を持つ物質は天然物からも報告があり、植物由来の化合物としてグリチルリチン酸やルチンなどが上げられる [72]。抗アレルギー薬として使用されているクロモグリク酸もセリ科のアンミ実の成分がリード化合物であり、HAase 阻害作用を持つことが知られている。そこで今回第 1 部で構築した植物エキスライブラリーを用いて HAase 阻害剤のスクリーニングを実施することとした。

High-throughput Screening を始め化合物ライブラリーを用いたスクリーニングでは、様々な原因で false-positive が発生する場合がある。Jadhav らの報告では High-throughput Screening で有効性を示した化合物の多くが false positive である可能性があることを指摘している [74]。

false positive の原因の一つとして化合物の凝集に由来する非特異的阻害反応が挙

げられる。これは主として水系反応液への溶解性の悪い化合物が液中で微粒子を形成し、酵素等が可逆的に吸着することでその働きを阻害するものである。この反応は物理現象であるため、対象への特異性もなくその後の応用展開も難しい。今回試験対象とする植物エキスイブラリーは植物の幅広い極性の化合物を得ることを目的として MeOH で抽出しているため、特に極性の低い成分は水溶液中で凝集してしまうことが予想される。

この非特異的阻害反応を抑える方法として界面活性剤や反応に関与しないタンパク質を系に添加する方法が有効であることが報告されている[75, 76]。系に添加された界面活性剤やタンパク質はエキス粒子を破壊したり、エキス粒子表面への酵素の吸着を防いでいると考えられている (Fig.2-1-2)。この方法により β -ラクタマーゼやシステインプロテアーゼである *cruzin* 等に対するクリーニングで有効性が報告されている[74, 77]。

本章では植物エキスイブラリーを用いて HAase 阻害活性試験を実施するにあたり、より適した試験系を構築することを目的として、①界面活性剤添加条件下での HAase 試験系の検討、②植物エキスサンプルを使用したプレスクリーニングを実施した。

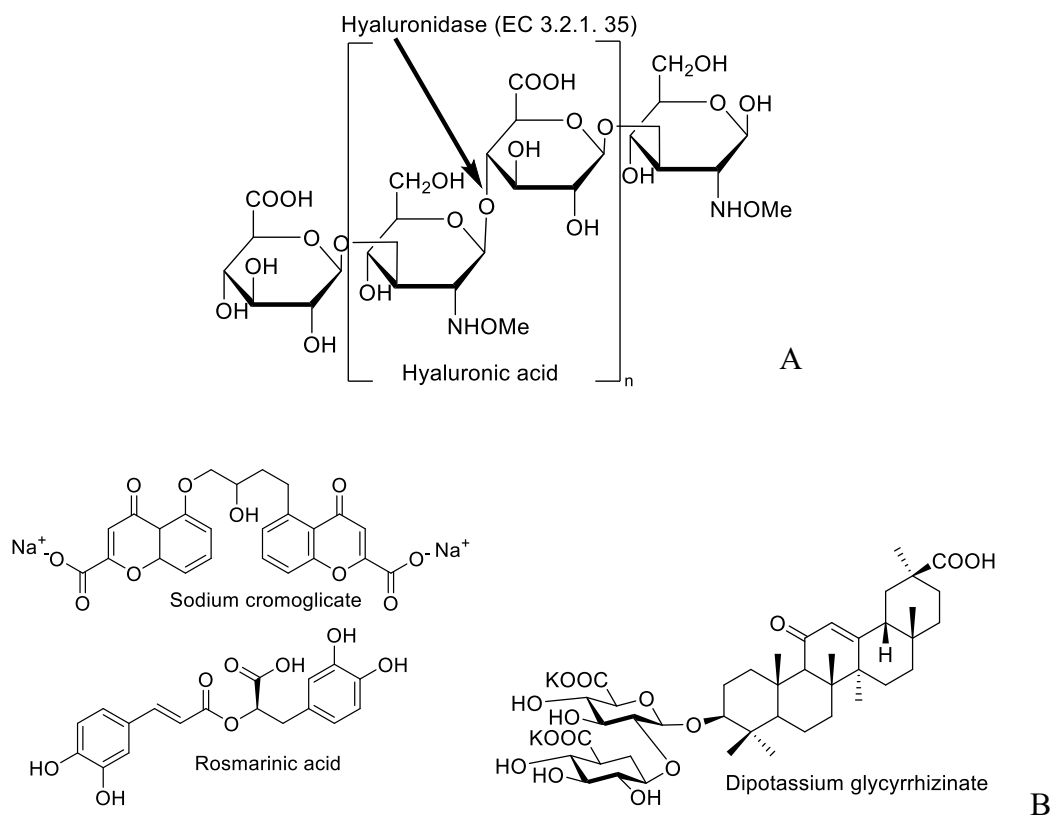


Fig. 2-1-1 HAase and HA (A), examples of HAase inhibitors (B)

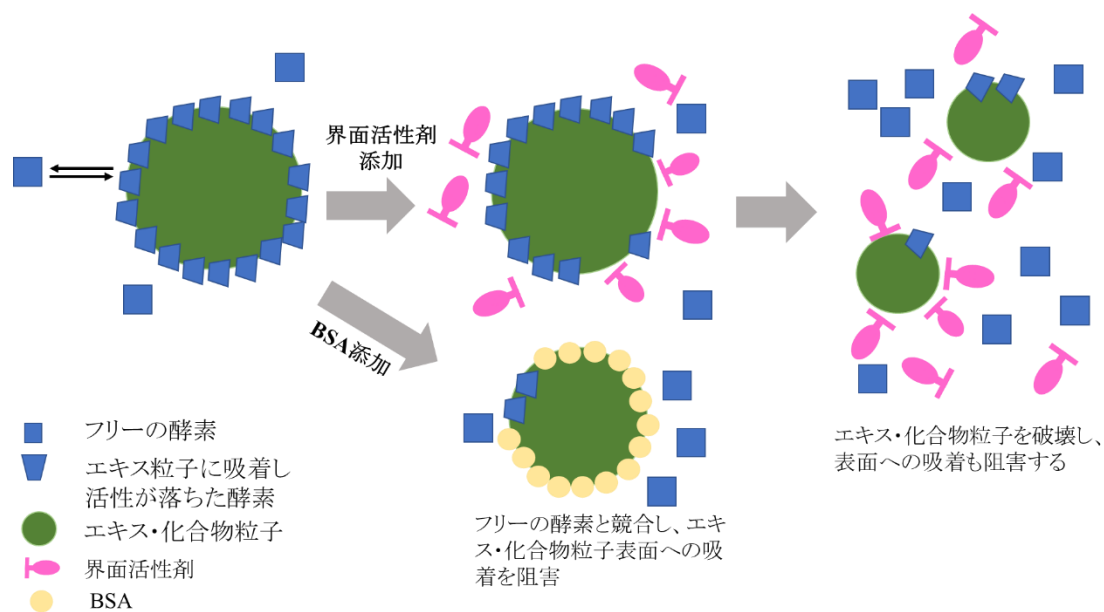


Fig.2-1-2 Effect of detergent to extract particles

実験方法

HAase 阻害活性の測定方法

HAase 阻害活性測定は Di Ferrante[78]の方法を一部改変して実施した。96 ウェルマイクロプレートに酢酸緩衝液 (0.2 M 酢酸、0.15 M NaCl、pH 5.0) に溶解した HAase (ウシ精巢由来 400~1000 U/mg, Type S-I, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)、DMSO サンプル溶液、各種界面活性剤類を加え 37 °Cにて 15 分間プレインキュベートした。HA 溶液(ヒアルロン酸ナトリウム鶏冠由来、富士フィルム和光純薬、大阪)を添加後、更に 15 分間インキュベートし、反応停止液 [2.0 % NaOH 2.5 % 臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB, 富士フィルム和光純薬、大阪)水溶液]を添加し 600 nm における濁度を測定した(反応前後のプレートの様子は Fig. 2-1-1 参照)。解析ソフトは Magellan™、プレートリーダーは Sunrise Thermo (いずれも Tecan, Mannedorf, Switzerland)、インキュベーターは CPE-2201(ヒラサワ、東京)を使用した。陽性対象としてグリチルリチン酸 2K(終濃度 0.4 mg/mL, 富士フィルム和光純薬、大阪)を使用し、コントロールに対し 50%以上の阻害活性を示した場合を阻害活性ありと判断した。HAase 阻害率は以下の計算式で算出した。また、実験は記載のない限り n = 3 で実施

し、結果は平均値±S.D.で表記した。平均値の比較は Student の t 検定または Tukey 検定にて実施し、有意水準は 5%とした(以降同処理実施)。統計処理には Microsoft® Excel® 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) 並びに R version 3.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing, , Vienna, Austria.) を使用した。

HAase 阻害率 (%) =

$$100 - \frac{[\text{OD}_{600 \text{ nm}}(\text{Sample blank}) - \text{OD}_{600 \text{ nm}}(\text{Sample} + \text{HAase})]}{[\text{OD}_{600 \text{ nm}}(\text{blank}) - \text{OD}_{600 \text{ nm}}(\text{HAase})]} \times 100$$

アッセイ時の DMSO 濃度及び DMSO エキス溶解補助の決定

本研究では界面活性剤としてポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル (POE)を使用した。POE は富士フィルム和光純薬(大阪)より入手し、終濃度 0.01%で 使用した。

アッセイ時の DMSO による HA 分解に対する影響は、DMSO 濃度を終濃度 0.25% ~5%に変化させ、DMSO 非添加時の HA 分解率と比較することで検討した。また、 DMSO エキスの溶解補助剤として終濃度 8%MeOH と酢酸緩衝液をして使用した場合 の HA 分解率についても比較した。

スクリーニング系の質の評価

スクリーニング系の質を評価するパラメーターとして、S/B 比(signal/baseline 比)、 S/N 比(signal/noise 比)、Z'値といった数値が使用される[75]。今回 1% DMSO、 0.01% POE 有及び無条件における各種パラメーター (CV 値、S/B 比、S/N 比、Z'値) の算出も行った。パラメーターの算出は以下の式で OD 600 nm の値を使用した。各 パラメーターの算出方法を以下に示す。

$$\text{S/B 比} = \text{Av}100\% / \text{Av}0\%$$

$$\text{S/N 比} = (\text{Av}100\% - \text{Av}0\%) / \text{SD}0\%$$

$$\text{CV 値} = \text{SD} / \text{Av} \times 100$$

$$\text{Z'値} = 1 - (3 \times \text{SD}100\% + 3 \times \text{SD}0\%) / (\text{Av}100\% - \text{Av}0\%)$$

100 % = HAase を添加していないサンプル

0 % = HAase を添加したサンプル

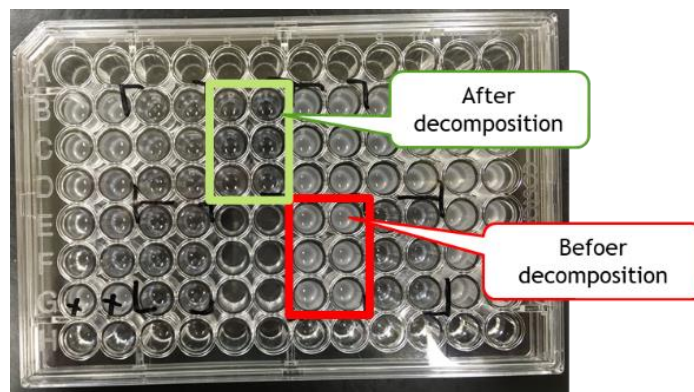


Fig. 2-1-3 Plate sample of before and after HA degradation

使用したパラメーターについて[79]

•S/B 比 (signal / background 比)

ベースラインに対するシグナル強度の比。この値が大きいほど活性の読み取りが容易になる。最低でも 2 以上とされる。

•S/N 比 (signal / noise 比)

ベースラインのばらつきに対するシグナルの比。

•CV 値 (変動係数, %)

データのばらつきに対する指標。スクリーニングでは概ね 10%を適正とする。

•Z'値

データのばらつき、シグナル強度から算出されるアッセイ系の制度を表す指標として使用される。一般に Z'値が 0.5 以上であれば適切とされる。

結果及び考察

界面活性剤類及び溶解補助剤の選定

HA 分解率に対する界面活性剤類と DMSO 濃度との関係を Fig. 2-1-4 に示す。DMSO 濃度が 0.25%及び 1%の場合、0.01%POE 添加条件で HA の分解率の向上が見られた。しかし、HA の分解率は DMSO 濃度が 2%の場合は 70%台まで、5%の場合 30%台まで低下し、スクリーニングで使用するには難しい結果となった。pH 5.0 の場合は DMSO の終濃度は 1%程度が上限と考えられた。なお、界面活性剤類による反応停止時における測定への影響は認められなかった。

次に、MeOH を DMSO エキスの溶解補助剤として使用した場合の結果を Table2-1-1 に示す。1% DMSO 条件下での HA 分解率はアルコール非添加条件と比較して 56.1%と低い値を示した。これは POE を追加した場合でも値の改善は認められなかった。また、MeOH を添加した場合、反応停止液による残存 HA 由来の濁度の発生の抑制も認められた。これらの結果から比濁法による HAase 阻害活性アッセイには適していないと判断し、サンプルの希釈には緩衝液を使用することにした。

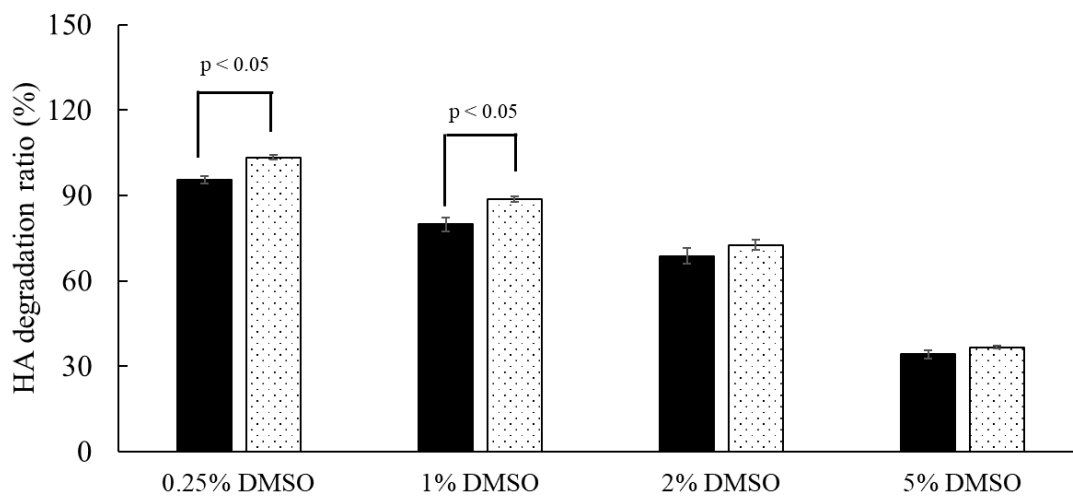


Fig. 2-1-4. HA degradation ratio under the condition of addition DMSO and detergent
 Assay condition were as follows: ■, with no detergent; ▨, with 0.01% POE

Table 2-1-1. HA decomposition rate under the conditions with addition of MeOH

MeOH	DMSO	detergent	HA degradation ratio (%)
8%	1%	-	56.1 ± 0.893
		0.01% POE	61.8 ± 1.09

スクリーニング系の質の評価

Table 2-1-2 に 1%DMSO 条件下における各種パラメーターの算出結果を示す。これまでの実験結果から、POE を使用し溶解補助剤は用いない条件が適していることが判明したため、0.01%POE の添加及び非添加条件にて各種パラメーターの算出を実施した。一般に CV 値は 10%未満、S/B 比は 3 以上、Z'値は 0.5 以上であることが望ましいとされている。比較試験の結果 CV 値は問題の無い範囲であったが、S/B 比はどちらの条件でも 3 未満であり、POE 添加による Z'値の改善もわずかにとどまった。しかし、全体として Z'値は 0.8 を超えており、POE 非添加条件でも十分な Z'値が確保されていることからアッセイとして機能することが確認された。

Table 2-1-2. Screening parameter value at 1 % DMSO

Assay condition POE(10)	HAase	CV value (%)	S/B ratio	S/N ratio	Z' value
-	-	1.7 ± 0.29	2.1 ± 0.075	35 ± 15	0.80 ± 0.031
	+	3.6 ± 1.9			
+	-	1.3 ± 0.11	2.3 ± 0.16	47 ± 8.5	0.86 ± 0.013
	+	2.9 ± 0.85			

DMSO エキス 96 点を用いたプレスクリーニング

DMSO エキスサンプル 96 点を 0.4 mg/mL の濃度で実施したプレスクリーニングの結果を Fig. 2-1-5 に示す。POE 非添加条件における HAase 阻害活性は総フェノール量と相関が認められ、特に総フェノール量 200 µg-GA/mg-Ext 以上のエキスはほとんどが阻害率 100%を示した。ここに 0.01% POE を添加すると、総フェノール量の高いエキスを中心に阻害活性の減弱するエキスが 26 点認められた (Fig. 2-1-5-B)。フェノール系化合物の中でもフラボノイドは凝集しやすいことが報告されており、quercetin や rhamnetin について Pohjala らは非特異的阻害剤である可能性を指摘している [58]。quercetin は植物に広く含まれている化合物でもあることから、類似の化合物による影響が POE の添加によって抑えられた可能性が考えられた。このことから、0.01%POE 添

加条件で試験を実施することとした。

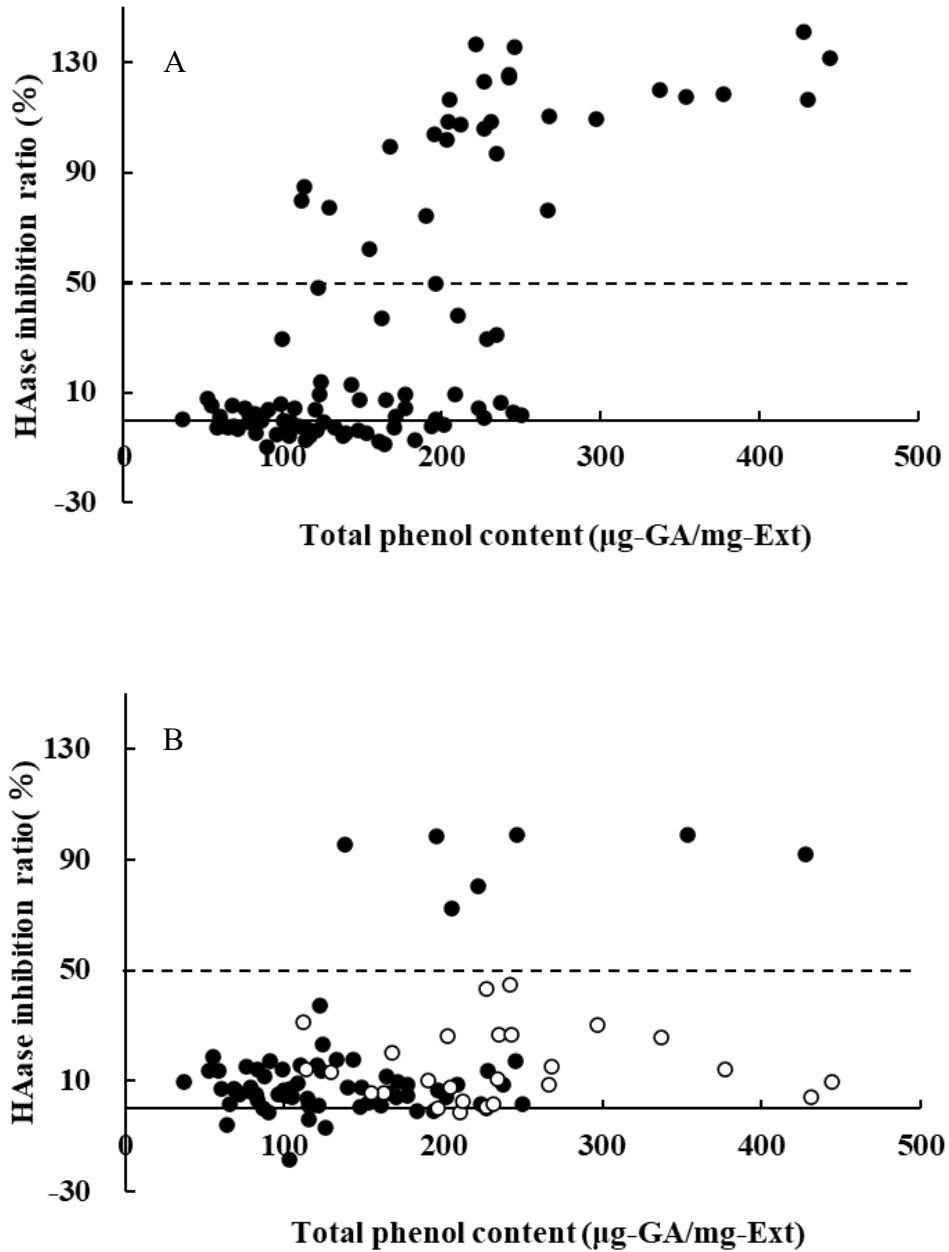


Fig. 2-1-5 Result of HAase inhibition prescreening

A; no detergent, B; with 0.01 % POE

Plant extraction concentration was 0.4 mg/mL, white dots mean samples with diminished HAase inhibitory activity

第 2 章 ライブラリーエキスをを用いた HAase 阻害活性スクリーニング

背景と目的

第 2 章では第 1 章で構築した HAase 阻害活性のスクリーニング系を用い、HAase 阻害作用を持つ植物エキスのスクリーニングを実施することを目的とした。試験を実施するにあたり、本ライブラリーの特徴でもあるシダ植物エキスに対しスクリーニングを実施した。これはシダ植物のエキスは被子植物エキスと成分的に異なる可能性が高いこと、HAase 阻害活性が報告されているシダ植物がほとんどないためである。

1 次スクリーニング実施後、阻害率 50%以上の陽性を示したサンプルに対し 2 次スクリーニングとして IC₅₀ の算出を実施し、ターゲット植物エキスの選定を試みた。

実験方法

HAase 阻害試験は酢酸緩衝液 (0.2 M 酢酸、0.15 M NaCl、pH 5.0) 中で実施した。96 ウェルマイクロプレートに HAase、植物エキス、POE を添加し 37 °Cにて 15 分間プレインキュベートした。HA 溶液を添加後更に 15 分間インキュベートし (インキュベート時各要素の濃度は HAase 17 EU/mL、POE 0.01%、DMSO 1%、HA 0.4 mg/mL とした)、反応停止液を添加し 600 nm における濁度を測定した。解析ソフトは Magellan™、プレートリーダーは Sunrise Thermo (いずれも Tecan, Mannedorf, Switzerland) を使用した。陽性対象としてグリチルリチン酸 2K を使用し、コントロールに対し 50%以上の阻害活性を示した場合を阻害活性ありと判断した。HAase 阻害率は以下の計算式で算出した。

HAase 阻害率(%) =

$$100 - \frac{OD_{600 \text{ nm}}(\text{Sample blank}) - OD_{600 \text{ nm}}(\text{Sample} + \text{HAase})}{[OD_{600 \text{ nm}}(\text{blank}) - OD_{600 \text{ nm}}(\text{HAase})]} \times 100$$

Sample + HAase = HAase + HA + サンプル (DMSO エキス等)

Sample blank = HA + サンプル (DMSO エキス等)

HAase = HAase + HA + サンプル (DMSO のみ)

Blank = HA + サンプル (DMSO のみ)

1 次スクリーニングでは DMSO 溶解植物エキスを終濃度 0.4 mg/mL とした。また各 DMSO 溶解植物エキスの総フェノール量の測定も実施した。総フェノール量の測定は第 1 部第 2 章と同様の方法で実施した (p.26)。次に 1 次スクリーニングで阻害率 50 % 以上を示したエキスに対し、2 次スクリーニングとして 0.01% POE 存在条件下における IC₅₀ を算出した。

結果及び考察

植物エキスライブラリー中のシダ植物由来のエキス 389 点について HAase 阻害活性試験を実施した結果を Table 2-2-1 に示す。エキス濃度 0.4 mg/mL における 1 次スクリーニングの結果、6.2%に当たる 24 点で HAase 阻害活性が認められた。389 点のエキスは 31 科 161 種のシダ植物で構成されているが、そのうち阻害活性を示したエキスは 9.3%にあたる 15 種の植物であった。中でもシシガシラ科とオシダ科の植物エキスを阻害活性は集中した。オシダ科オシダ (*Dryopteris crassirhizoma*) の全草エキスには HAase 阻害活性が報告されているが[72]、今回オシダ属(*Dryopteris*)以外のカナワラビ属(*Arachniodes*)ヤブソテツ属(*Cyrtomium*)など他の属でも阻害活性が認められた。また、同じ植物の部位のエキスでもジウモンジシダ (*Polystichum tripterum*) やヒトツバ (*Pyrrosia lingua*) のように活性に大きく差が出る場合も認められた。

逆にイワデンダ科、ヒカゲノカズラ科では阻害活性を示したエキスは 1 点も認められなかった。Fig.2-2-1 よりエキス中の総フェノール量と酵素阻害活性の間にはプレスクリーニングと同様に相関が認められたが、コウヤコケシノブ (*Hymenophyllum barbatum*) など一部のシダ植物は高い総フェノール量を示すも HAase 阻害活性は低い結果を示すエキスも認められた。阻害活性成分の HAase に対する特異性が非常に低い、または緩衝液への溶解性の悪さなどの影響があるものと思われた。

次に 1 次スクリーニングで陽性を示したサンプル 24 点の IC₅₀ を算出したところ、多くのサンプルで IC₅₀ は 0.050~0.17 mg/mL を示した。これはポジティブコントロールとして使用したグリチルリチン酸 2K の IC₅₀ 0.64 mM (0.57 mg/mL に相当)よりも強い阻害活性であった。エキスの阻害活性と共に植物体の入手も大切な因子であるといえることから、今回は大型のシダや繁茂するシダ類をターゲットとした。これらの結果から最終的にコシダの地上部及びヒリュウシダの根茎の 2 種に対し、次章で成分探索を実施

した。

Table 2-2-1. Screening results of HAase inhibition of fern extracts

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA}/\text{mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)			
Lycopodiaceae ヒカゲノカズラ科	<i>Lycopodiella cernua</i> (L.) Pic.Serm. (ミスズギ)	Leaf	Kagoshima	29.5 \pm 0.3	-11.7 \pm 2.8				
		Whole Plant	Ibaraki	33.9 \pm 0.8	-2.3 \pm 1.1		○		
	<i>Lycopodium clavatum</i> L. var. <i>nipponicum</i> Nakai (ヒカゲノカズラ)	Whole Plant	Nagano	31.2 \pm 0.1	0.1 \pm 1.3			○	
		Leaf	Nagano	41.5 \pm 0.5	-4.8 \pm 1.4			○	
		Whole Plant	Nagano	37.9 \pm 0.7	-10.3 \pm 2.1			○	
		Aerial Part	Kagoshima	-	-15.1 \pm 3.3			○	
	<i>Lycopodium dendroideum</i> Michx. (マンネンスズギ)	Whole Plant	Nagano	27.6 \pm 0.2	-1.3 \pm 1.2				
		Whole Plant	Nagano	28.4 \pm 0.2	-5.2 \pm 0.6				
	<i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trevis. (トウゲシバ)	Whole Plant	Tokyo	27.2 \pm 0.6	-7.6 \pm 1.8			○	
		Whole Plant	Nagano	33.7 \pm 1.8	-4.3 \pm 0.1			○	
	Aerial Part	Fukuoka	39.7 \pm 0.7	-10.5 \pm 1.1			○		
	Selaginellaceae イワヒバ科	<i>Selaginella involvens</i> (Sw.) Spring (カタヒバ)	Aerial Part	Chiba	81.5 \pm 0.7	-12.1 \pm 3.3			
Whole Plant			Shizuoka	67.5 \pm 0.7	-3.7 \pm 1.8				
<i>Selaginella remotifolia</i> Spring (クラマゴケ)		Aerial Part	Ibaraki	41.0 \pm 1.3	-4.2 \pm 1.0				
		Whole Plant	Ehime	37.1 \pm 0.1	-2.2 \pm 0.8				
		Whole Plant	Ehime	44.9 \pm 0.2	-10.2 \pm 1.8				
		Whole Plant	Saitama	33.5 \pm 0.2	-12 \pm 1.2				
<i>Selaginella uncinata</i> (Desv.) Spring (コンテリククラマゴケ)	Aerial Part	Miyazaki	40.4 \pm 0.7	-1.6 \pm 1.5					
	Equisetaceae トクサ科	<i>Equisetum arvense</i> L. (スギナ)	Aerial Part	Ibaraki	48.5 \pm 0.4	-5.9 \pm 2.3		○	○
Aerial Part			Ibaraki	29.6 \pm 0.8	18.6 \pm 1.1				
Ophioglossaceae ハナヤスリ科	<i>Botrychium multifidum</i> (S.G.Gmel.) Rupr. var. <i>robustum</i> (Rupr. ex Milde) C.Chr. (エゾフユノハナワラビ)	Leaf	Hokkaido	38.8 \pm 0.6	-5.1 \pm 1.9			○	
		Leaf	Hokkaido	32.6 \pm 0.3	-2.1 \pm 0.3			○	
	<i>Botrychium ternatum</i> (Thunb.) Sw. (フユノハナワラビ)	Whole Plant	Saga	27.4 \pm 0.6	-6.5 \pm 0.3			○	
		Aerial Part	Hokkaido	14.3 \pm 0.2	-10.5 \pm 0.9				
	<i>Botrychium virginianum</i> (L.) Sw. (ナツノハナワラビ)	Root	Hokkaido	20.5 \pm 0.7	-7.2 \pm 2.0				
		Aerial Part	Tokyo	18.4 \pm 0.1	-9.1 \pm 2.9				
	Aerial Part	Kouchi	27.5 \pm 0.3	0.1 \pm 1.0					
	Marattiaceae リュウビンタイ科	<i>Angiopteris evecta</i> (G.Forst.) Hoffm. (ホソバリリュウビンタイ)	Leaf	Okinawa	18.3 \pm 0	-0.3 \pm 3.0			
Aerial Part			Okinawa	21.1 \pm 0.2	-6.7 \pm 1.1				
<i>Angiopteris lygodiiifolia</i> Rosenst. (リュウビンタイ)		Leaf	Kagoshima	37.1 \pm 0.2	-9.9 \pm 2.6				
		Aerial Part	Kagoshima	10 \pm 0.4	3.2 \pm 0.5				
	Aerial Part	Miyazaki	21.3 \pm 0.1	-6.3 \pm 2.0					
	Osmundaceae ゼンマイ科	<i>Osmunda banksiifolia</i> (C.Presl) Kuhn (シロヤマゼンマイ)	Aerial Part	Kagoshima	37 \pm 0.1	-7.6 \pm 3.3			
Leaf			Okinawa	158 \pm 1.1	5.4 \pm 2.4				
<i>Osmunda japonica</i> Thunb. (ゼンマイ)		Leaf	Ibaraki	39.6 \pm 0.2	1.1 \pm 0.6			○	
		Aerial Part	Yamanashi	66.9 \pm 0.7	2.0 \pm 2.0			○	
Aerial Part		Kagoshima	49.9 \pm 0.4	-3.6 \pm 2.1			○		
<i>Osmundastrum cinnamomeum</i> (L.) C.Presl var. <i>fokiense</i> (Copel.) Tagawa (ヤマドリゼンマイ)	Aerial Part	Hokkaido	114.2 \pm 1.0	-0.2 \pm 2.9			○		
Schizaeaceae フサンド科	<i>Lygodium japonicum</i> (Thunb.) Sw. (カニクサ)	Aerial Part	Ibaraki	63.2 \pm 2.4	-0.7 \pm 2.0			○	
		Aerial Part	Ibaraki	35.5 \pm 3.9	-5.0 \pm 2.5				
		Aerial Part	Chiba	40.0 \pm 0.3	-14.3 \pm 2.7				
		Aerial Part	Tokyo	35.8 \pm 0.1	-1.5 \pm 0.1				
		Aerial Part	Kagoshima	42.0 \pm 0.9	-10.5 \pm 1.7				
	<i>Lygodium japonicum</i> (Thunb.) Sw. var. <i>microstachyum</i> (Desv.) C.Chr. et Tardieu (ナガバカニクサ)	Aerial Part	Kagoshima	43.1 \pm 0.4	-6.6 \pm 2.6				
		Leaf	Okinawa	44.9 \pm 1.2	-7.2 \pm 4.6				
		Aerial Part	Okinawa	146.6 \pm 1.3	0.9 \pm 1.8				
		Leaf	Okinawa	117.1 \pm 1.4	-10.4 \pm 1.4				
	Gleicheniaceae ウラボシ科	<i>Dicranopteris pedata</i> (Houtt.) Nakaike (コシダ)	Aerial Part	Chiba	118.8 \pm 0.7	12.6 \pm 3.1			
Aerial Part			Shizuoka	83.5 \pm 0.7	20.9 \pm 5.4				
Aerial Part			Ehime	289.1 \pm 3.4	59.3 \pm 11.4	0.11 \pm 0.021			
Leaf			Kagoshima	136.8 \pm 1.1	0.7 \pm 2.0				
Aerial Part			Kagoshima	188.7 \pm 1.5	21.4 \pm 4.9				
		Aerial Part	Okinawa	242.0 \pm 0.3	60.6 \pm 17.6	0.14 \pm 0.021			
		Fronde	Okinawa	219.3 \pm 0.4	56.8 \pm 9.2	0.12 \pm 0.0075			
<i>Diplazium glaucum</i> (Houtt.) Nakai (ウラボシ)		Aerial Part	Shizuoka	127.6 \pm 0.9	-3.8 \pm 2.1				
		Aerial Part	Ehime	8.0 \pm 0.1	16.6 \pm 3.6				
		Leaf	Kagoshima	199.8 \pm 1.6	-10.4 \pm 4.8				

Table 2-2-1. (continued)

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA/mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)			
Hymenophyllaceae コケシノブ科	<i>Crepidomanes thysanostomum</i> (Makino) Ebihara et K.Iwats. (カンシノブホラゴケ)	Leaf	Okinawa	189.6 \pm 3.7	35.8 \pm 6.2				
		Whole Plant	Ibaraki	253.9 \pm 1.2	-6.8 \pm 2.2				
	<i>Hymenophyllum barbatum</i> (Bosch) Baker (コウヤコケシノブ)	Whole Plant	Ibaraki	237.3 \pm 1.5	-8.9 \pm 2.2				
		Whole Plant	Ehime	383.8 \pm 0.6	-2.9 \pm 3.6				
		Whole Plant	Ohita	235.6 \pm 1.3	-10.4 \pm 2.8				
<i>Vandenboschia kalamocarpa</i> (Hayata) Ebihara (ハイホラゴケ)	Whole Plant	Ohita	58.2 \pm 3.3	-8.5 \pm 3.0					
Pteridaceae イノモトソウ科	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L. (ホウライシダ)	Aerial Part	Hokkaido	93.2 \pm 0.9	-2.7 \pm 0.9				
		Aerial Part	Iwate	71.5 \pm 1.2	0.2 \pm 1.8				
		Underground Part	Iwate	116.5 \pm 1.4	8.0 \pm 0.6				
		Whole Plant	Yamanashi	119.5 \pm 1.2	-2.7 \pm 1.2				
		Aerial Part	Yamanashi	123.9 \pm 1.4	3.8 \pm 2.1				
		Whole Plant	Nagano	100.9 \pm 0.8	-7.4 \pm 1.8				
	<i>Adiantum flabellulatum</i> L. (オキナワクジャクシダ)	Aerial Part	Okinawa	135.6 \pm 2.9	25.5 \pm 3.5				
		Aerial Part	Okinawa	173.8 \pm 1.2	42.7 \pm 1.9				
		Leaf	Okinawa	209.8 \pm 1.4	48.1 \pm 14.7				
	<i>Adiantum monochlamys</i> D.C.Eaton (ハコネシダ)	Whole Plant	Chiba	172.2 \pm 1.3	0.7 \pm 1.7				
	<i>Cheilanthes argentea</i> (S.G.Gmel.) Kunze (ヒメウラジロ)	Whole Plant	Kouchi	146.0 \pm 1.3	7.3 \pm 2.6				
	<i>Cibotium barometz</i> (L.) J.Sm. (タカワラビ)	Leaf	Okinawa	155.8 \pm 0.9	-0.5 \pm 7.3				
	<i>Coniogramme japonica</i> (Thunb.) Diels (イワガネソウ)	Leaf	Ibaraki	32.7 \pm 0.4	-7.0 \pm 1.6				
		Aerial Part	Tokyo	21.2 \pm 0.3	-9.3 \pm 1.4				
		Aerial Part	Tokyo	29.6 \pm 0.2	-9.0 \pm 0.1				
		Aerial Part	Kagoshima	16.2 \pm 0	-7.3 \pm 1.6				
	<i>Dennstaedtia hirsuta</i> (Sw.) Mett. (イヌシダ)	Underground Part	Kagoshima	3.3 \pm 0	-5.6 \pm 1.2				
		Aerial Part	Ibaraki	83.5 \pm 0.2	-1.2 \pm 1.8				
		Whole Plant	Iwate	33.9 \pm 0.4	-14.3 \pm 7.0				
	<i>Dennstaedtia wilfordii</i> (T.Moore) Christ (オウレンシダ)	Whole Plant	Iwate	33.9 \pm 0.4	-14.3 \pm 7.0				
	<i>Dennstaedtia zeylanica</i> (Sw.) Zink ex Fraser-Jenk. et Kandel (コバノイシカグマ)	Aerial Part	Tokyo	45.6 \pm 0.3	-4.9 \pm 2.3				
		Aerial Part	Shizuoka	81.7 \pm 0.9	-8.0 \pm 1.2				
		Aerial Part	Shizuoka	59.9 \pm 2.5	-5.9 \pm 1.8				
		Aerial Part	Shizuoka	39.2 \pm 0.3	-5.1 \pm 2.3				
		Aerial Part	Shizuoka	88.7 \pm 0.4	-9.0 \pm 1.2				
		Aerial Part	Shizuoka	87.5 \pm 0.6	-30.8 \pm 2.0				
	<i>Hypolepis punctata</i> (Thunb.) Mett. ex Kuhn (イワヒメワラビ)	Aerial Part	Shizuoka	88.7 \pm 0.4	-9.0 \pm 1.2				
		Aerial Part	Shizuoka	87.5 \pm 0.6	-30.8 \pm 2.0				
	<i>Lindsaea merrillii</i> Copel. subsp. <i>yaeyamensis</i> (Tagawa) K.U.Kramer (トラノオホングウシダ)	Leaf	Okinawa	26.1 \pm 0.3	-13.4 \pm 2.0				
	<i>Lindsaea orbiculata</i> (Lam.) Mett. ex Kuhn var. <i>orbiculata</i> (マルバホングウシダ)	Aerial Part	Okinawa	51.1 \pm 0.4	-4.9 \pm 1.3				
Aerial Part		Ibaraki	63.3 \pm 1.2	2.3 \pm 2.5			○		
<i>Microlepia marginata</i> (Panzer) C.Chr. (フモトシダ)	Aerial Part	Tokyo	40.7 \pm 1.1	-7.5 \pm 0.9			○		
	Aerial Part	Saitama	0 \pm 0	-14.1 \pm 2.7			○		
	Aerial Part	Shizuoka	45.4 \pm 0.6	-2.5 \pm 1.5			○		
	Aerial Part	Shizuoka	54.8 \pm 0.2	-1.5 \pm 0.7			○		
	Aerial Part	Kouchi	52.9 \pm 0.7	-4.4 \pm 2.2			○		
	Aerial Part	Miyazaki	31.9 \pm 0.5	-10.3 \pm 1.6			○		
	Leaf	Kagoshima	64.1 \pm 0.5	-10.6 \pm 1.5					
<i>Microlepia strigosa</i> (Thunb.) C.Presl (イシカグマ)	Aerial Part	Kagoshima	72.2 \pm 0.6	5.9 \pm 0.9					
	Underground Part	Kagoshima	67.4 \pm 0.2	1.2 \pm 1.1					
	Aerial Part	Miyazaki	35.5 \pm 1.1	-13.8 \pm 2.8					
<i>Monachosorum maximowiczii</i> (Baker) Hayata (フジシダ)	Whole Plant	Kouchi	142.3 \pm 1.8	-11.8 \pm 2.0					

Table 2-2-1. (continued)

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA}/\text{mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)			
Pteridaceae イノモトソウ科	<i>Odontosoria chinensis</i> (L.) J.Sm. (ホランソノブ)	Aerial Part	Chiba	139.5 \pm 1.2	-13.7 \pm 1.1				
		Aerial Part	Chiba	259.5 \pm 2.1	-7.8 \pm 2.1				
		Whole Plant	Shizuoka	235.6 \pm 1.8	-11.3 \pm 2.3				
		Aerial Part	Ehime	212.6 \pm 3.6	1.8 \pm 0.4				
		Leaf	Kagoshima	244.8 \pm 0.8	0.8 \pm 3.3				
	<i>Onychium japonicum</i> (Thunb.) Kunze (タチソノブ)	Aerial Part	Kagoshima	133.7 \pm 0.8	-11.4 \pm 3.0				
		Aerial Part	Chiba	42.6 \pm 0.3	-3.5 \pm 2.1				
		Aerial Part	Chiba	42.6 \pm 0.3	-2.3 \pm 1.6				
	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn subsp. <i>japonicum</i> (Nakai) Á. et D.Löve (ワラビ)	Aerial Part	Shizuoka	40.2 \pm 0.9	-1.1 \pm 0.4				
		Aerial Part	Iwate	28.2 \pm 0.2	-9.0 \pm 1.4			○	
		Aerial Part	Ibaraki	25.9 \pm 3.1	-8.4 \pm 2.7			○	
		Aerial Part	Yamanashi	82.1 \pm 0.4	19.5 \pm 3.0			○	
		Underground Part	Yamanashi	54.8 \pm 0.5	0.3 \pm 1.9			○	
	<i>Pteris amoena</i> Blume (ヒカゲアマクサシダ)	Leaf	Kagoshima	52.5 \pm 0.7	-5.6 \pm 2.4			○	
		Aerial Part	Kagoshima	83.1 \pm 0.2	-8.2 \pm 3.8			○	
		Leaf	Kagoshima	33.8 \pm 0.1	-10.3 \pm 1.3				
		Stem	Kagoshima	57.8 \pm 0.2	4.4 \pm 3.1				
		Leaf	Kagoshima	38.5 \pm 0.3	-3.2 \pm 2.6				
	<i>Pteris cretica</i> L. (オオバノイノモトソウ)	Stem	Kagoshima	90.4 \pm 0.6	6.6 \pm 1.2				
		Aerial Part	Miyazaki	29.7 \pm 0.6	-11.7 \pm 1.1				
		Leaf	Ibaraki	49.0 \pm 0.9	-8.0 \pm 2.4				
		Aerial Part	Ibaraki	30.3 \pm 0.8	-7.4 \pm 2.0				
		Aerial Part	Ibaraki	37.8 \pm 0.1	-7.3 \pm 2.4				
	<i>Pteris dispar</i> Kunze (アマクサシダ)	Aerial Part	Tokyo	23.3 \pm 0.2	-8.7 \pm 1.2				
		Aerial Part	Chiba	30.9 \pm 0.2	-8.1 \pm 1.3				
		Aerial Part	Shizuoka	33.9 \pm 0.1	-5.7 \pm 3.8				
		Underground Part	Shizuoka	132.3 \pm 0.8	5.4 \pm 0.4				
		Whole Plant	Ehime	67.2 \pm 0.0	-9.9 \pm 2.9				
	<i>Pteris fauriei</i> Hieron. (ハチジョウシダ)	Aerial Part	Shizuoka	46.5 \pm 0.5	-9.0 \pm 1.5				
		Aerial Part	Shizuoka	41.1 \pm 0.6	-8.3 \pm 2.5				
		Aerial Part	Kouchi	35.5 \pm 0.2	-4.9 \pm 1.4				
		Leaf	Kagoshima	26.8 \pm 0.9	3.1 \pm 1.6				
		Stem	Kagoshima	51.7 \pm 0.3	12.8 \pm 0.4				
<i>Pteris kiuschiuensis</i> Hieron. (ニシノコハチジョウシダ)	Aerial Part	Kumamoto	51.6 \pm 0.3	-20.2 \pm 1.6					
	Leaf	Okinawa	55.5 \pm 0.5	-11.3 \pm 3.2					
	Aerial Part	Okinawa	64.1 \pm 1.2	-10.6 \pm 1.9					
	Leaf	Kagoshima	40.4 \pm 0.8	-4.1 \pm 2.7					
	Stem	Kagoshima	43.4 \pm 0.1	-5.3 \pm 3.1					
<i>Pteris multipida</i> Poir. (イノモトソウ)	Leaf	Kagoshima	46.2 \pm 0.1	-3.4 \pm 2.2					
	Aerial Part	Kagoshima	42.9 \pm 0.8	-9.5 \pm 0.6					
	Leaf	Kagoshima	34.7 \pm 0.4	-7.1 \pm 1.0					
<i>Pteris nipponica</i> W.C.Shieh (マツザカシダ)	Stem	Kagoshima	32.2 \pm 0.3	-8.8 \pm 2.5					
	Aerial Part	Tokyo	78.7 \pm 0.5	-14.7 \pm 1.3		○			
	Aerial Part	Chiba	38.6 \pm 0.4	-9.5 \pm 2.3					
<i>Pteris oshimensis</i> Hieron. (ハチジョウシダモドキ)	Aerial Part	Shizuoka	35.0 \pm 0.2	-8.2 \pm 1.8					
	Whole Plant	Kouchi	25.2 \pm 0.1	-7.8 \pm 0.9					
	Leaf	Kagoshima	50.2 \pm 0.3	-11.4 \pm 2.9					
<i>Pteris perplexa</i> Y.S.Chao, H.Y.Liu et W.L.Chiou (カワリバアマクサシダ)	Stem	Kagoshima	40.9 \pm 0.7	-8.5 \pm 1.4					
	Aerial Part	Kagoshima	29.4 \pm 0.5	-6.3 \pm 2.1					
	Leaf	Kagoshima	43.4 \pm 1.0	-5.8 \pm 3.6					
<i>Pteris ryukyuensis</i> Tagawa (リュウキュウイノモトソウ)	Stem	Kagoshima	42.9 \pm 0.3	-6.8 \pm 4.8					
	Leaf	Kagoshima	29.5 \pm 0.5	3.4 \pm 3.0					
	Whole Plant	Kagoshima	31.0 \pm 0.4	-11.4 \pm 2.0					
<i>Pteris setulosocostulata</i> Hayata (トゲハチジョウシダ)	Whole Plant	Kagoshima	41.0 \pm 0.3	-10.7 \pm 2.7					
	Aerial Part	Okinawa	33.7 \pm 0.2	-5.9 \pm 0.9					
	Leaf	Kagoshima	41.5 \pm 0.7	2.4 \pm 0.9					
<i>Pteris terminalis</i> Wall. ex J.Agardh var. <i>terminalis</i> (オオバノハチジョウシダ)	Stem	Kagoshima	43.9 \pm 0.2	11.2 \pm 2.2					
	Aerial Part	Chiba	19.3 \pm 0.5	-14.8 \pm 1.0			○		
		Aerial Part	Shizuoka	43.4 \pm 0.3	-12.2 \pm 1.3			○	

Table 2-2-1. (continued)

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA/mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)			
Pteridaceae イノモトソウ科	<i>Pteris wallichiana</i> J.Agardh (ナチシダ)	Aerial Part	Chiba	24.2 \pm 0.5	-5.8 \pm 2.6				
		Aerial Part	Shizuoka	40.9 \pm 0.3	-2.5 \pm 1.7				
		Aerial Part	Shizuoka	39.4 \pm 0.1	-2.0 \pm 0.9				
		Leaf	Kagoshima	36.2 \pm 0.9	-12.3 \pm 1.5				
		Stem	Kagoshima	34.8 \pm 0.5	-4.5 \pm 3.7				
		Aerial Part	Miyazaki	20.1 \pm 0.2	-0.2 \pm 2.8				
	<i>Pteris x namegateae</i> Sa.Kurata (イブスキイノモトソウ)	Leaf	Kagoshima	62.3 \pm 0.5	-8.0 \pm 2.7				
		Stem	Kagoshima	39.1 \pm 0.2	-8.1 \pm 0.5				
		Leaf	Kagoshima	56.8 \pm 0.9	-7.1 \pm 1.3				
	<i>Pteris yakuinsularis</i> Sa.Kurata (ヤクシマハチジョウシダ)	Stem	Kagoshima	77.6 \pm 0.3	-0.3 \pm 4.7				
		<i>Tapeinidium pinnatum</i> (Cav.) C.Chr. (ゴザダケシダ)	Leaf	Okinawa	82.6 \pm 1.5	-11.8 \pm 2.3			
	<i>Coniogramme intermedia</i> Hieron. var. <i>glabra</i> Ching (イワガネゼンマイ)	Aerial Part	Hokkaido	131 \pm 0.9	-8.6 \pm 2.6				
		Aerial Part	Hokkaido	14.8 \pm 0.4	-7.0 \pm 2.9				
Aerial Part		Tokyo	17.4 \pm 0.8	-7.7 \pm 2.7					
Aerial Part		Ehime	38.4 \pm 0.5	-2.9 \pm 0.8					
Davalliaceae シノブ科	<i>Nephrolepis biserrata</i> (Sw.) Schott (ホウビカンジュ)	Leaf	Okinawa	27.1 \pm 0.8	-6.4 \pm 3.0				
	<i>Nephrolepis brownii</i> (Desv.) Hovenk. et Miyam. (ヤンバルタマシダ)	Leaf	Okinawa	93.2 \pm 1.6	16.3 \pm 5.1				
	<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C.Presl (タマシダ)	Whole Plant	Kouchi	119.6 \pm 1.1	20.0 \pm 3.9				
		Aerial Part	Kagoshima	78.3 \pm 1.1	16.4 \pm 4.0				
		Aerial Part	Kagoshima	41.8 \pm 0.1	-6.2 \pm 2.7				
Plagiogyriaceae キジノオシダ科	<i>Plagiogyria euphlebia</i> (Kunze) Mett. (オオキジノオ)	Aerial Part	Ehime	54.2 \pm 0.5	-5.8 \pm 1.1				
		Aerial Part	Ohita	76.3 \pm 0.5	-16.8 \pm 2.0				
	<i>Plagiogyria japonica</i> Nakai (キジノオシダ)	Aerial Part	Ibaraki	82.4 \pm 0.5	-13.8 \pm 1.5				
		Underground Part	Ibaraki	241.9 \pm 2.1	68.5 \pm 8.7	0.13 \pm 0.011			
<i>Plagiogyria matsumurana</i> Makino (ヤマソテツ)	Leaf	Ibaraki	114.4 \pm 0.4	39.6 \pm 11.1			○		
Cyatheaceae ヘゴ科	<i>Cyathea podophylla</i> (Hook.) Copel. (クロヘゴ)	Leaf	Okinawa	186.4 \pm 0.8	-5.2 \pm 1.8				
		Aerial Part	Okinawa	177.5 \pm 1.2	-0.8 \pm 5.2				
	<i>Cyathea spinulosa</i> Wall. ex Hook. (ヘゴ)	Aerial Part	Ibaraki	195 \pm 2.5	14.4 \pm 11.1				
	<i>Cyathea lepifera</i> (J.Sm.) Copel. (ヒカゲヘゴ)	Aerial Part	Okinawa	87.1 \pm 1.5	-9.1 \pm 2.1				
Dryopteridaceae オシダ科	<i>Anisocampium niponicum</i> (Mett.) Y.C.Liu, W.L.Chiou et M.Kato (イヌワラビ)	Aerial Part	Ibaraki	50.6 \pm 0.2	-10.1 \pm 2.1				
		Aerial Part	Tokyo	83.0 \pm 0.8	-10.2 \pm 2.8				
	<i>Anisocampium sheareri</i> (Baker) Ching (ウラボシノコギリシダ)	Aerial Part	Kumamoto	40.4 \pm 0.2	-7.0 \pm 0.5				
	<i>Arachniodes borealis</i> Seriz. (ホソバナライシダ)	Aerial Part	Hokkaido	61.8 \pm 0.1	-10.1 \pm 1.3				
		Aerial Part	Tokyo	55.8 \pm 2.5	-11.9 \pm 3.8				
		Aerial Part	Ehime	62.7 \pm 0.2	-12.1 \pm 4.0				
	<i>Arachniodes chinensis</i> (Rosenst.) Ching (オニカナワラビ)	Aerial Part	Ehime	62.7 \pm 0.2	-12.1 \pm 4.0				
	<i>Arachniodes fargesii</i> (Christ) Seriz. (ナンゴクナライシダ)	Aerial Part	Ibaraki	46 \pm 1.1	-11.6 \pm 0.5				
	<i>Arachniodes mutica</i> (Franch. et Sav.) Ohwi (シノブカグマ)	Aerial Part	Ehime	289.4 \pm 1.3	32.8 \pm 5.3				
	<i>Arachniodes rhomboidea</i> (Wall. ex C.Presl) Ching (オオカナワラビ)	Aerial Part	Kouchi	211.8 \pm 2.1	34.9 \pm 3.6				
	<i>Arachniodes sporadosora</i> (Kunze) Nakaike (コバノカナワラビ)	Leaf	Okinawa	175.9 \pm 2.6	26.7 \pm 6.3				
	<i>Arachniodes standishii</i> (T.Moore) Ohwi (リョウメンシダ)	Aerial Part	Hokkaido	41.2 \pm 0.3	-3.8 \pm 0.7				
		Leaf	Ibaraki	169.7 \pm 1.3	0.8 \pm 6.7				
		Aerial Part	Tokyo	234.9 \pm 1	6.2 \pm 1.8				
		Aerial Part	Chiba	80.3 \pm 0.8	4.1 \pm 0.6				
		Aerial Part	Chiba	99.2 \pm 0.4	0.4 \pm 2.8				
		Aerial Part	Kouchi	186.1 \pm 0.3	6.4 \pm 9.0				
Aerial Part		Kagoshima	178.8 \pm 1.4	1.0 \pm 3.5					
<i>Athyrium decurrentialatum</i> (Hook.) Copel. (シケチシダ)	Aerial Part	Tokyo	16.4 \pm 0.3	-8.8 \pm 1.6					

Table 2-2-1. (continued)

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA}/\text{mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)			
Dryopteridaceae オシダ科	<i>Athyrium vidalii</i> (Franch. et Sav.) Nakai (ヤマイヌワラビ)	Aerial Part	Hokkaido	59.8 \pm 0.9	-1.8 \pm 2.8				
		Aerial Part	Iwate	69.9 \pm 0.7	-2.3 \pm 6.6				
		Aerial Part	Ibaraki	176.9 \pm 1.3	24.0 \pm 4.1				
	<i>Athyrium yokoscense</i> (Franch. et Sav.) Christ (ヘビノネゴザ)	Aerial Part	Tokyo	111.3 \pm 0.8	0.5 \pm 3.3				
	<i>Bolbitis heteroclita</i> (C.Presl) Ching (オオヘツカシダ)	Leaf	Okinawa	73 \pm 2.0	2.6 \pm 2.7				
	<i>Bolbitis subcordata</i> (Copel.) Ching (ヘツカシダ)	Aerial Part	Kagoshima	69.0 \pm 0.7	16.2 \pm 0.7				
	<i>Ctenitis subglandulosa</i> (Hance) Ching (カツモウイノデ)	Leaf	Kagoshima	196.1 \pm 0.4	0.4 \pm 7.8				
	<i>Cyrtomium falcatum</i> (L.f.) C.Presl subsp. <i>Falcatum</i> (オニヤブソテツ)	Aerial Part	Ibaraki	95 \pm 1.4	4.4 \pm 5.5				
		Aerial Part	Shizuoka	122.8 \pm 0.1	21.9 \pm 4.0				
		Aerial Part	Shizuoka	97.4 \pm 0.6	11.2 \pm 1.5				
	<i>Cyrtomium fortunei</i> var. <i>fortunei</i> (ヤブソテツ)	Leaf	Ibaraki	61.2 \pm 0.2	-8.6 \pm 3.0				
		Aerial Part	Ibaraki	48.7 \pm 0.6	11.8 \pm 3.5				
		Aerial Part	Ibaraki	87 \pm 0.4	1.4 \pm 2.3				
		Aerial Part	Tokyo	27.4 \pm 0.4	40.3 \pm 1.1				
		Aerial Part	Chiba	61.7 \pm 0.3	-2.1 \pm 2.7				
	<i>Deparia lancea</i> (Thunb.) Fraser-Jenk. (ヘラシダ)	Aerial Part	Shizuoka	71.2 \pm 1.4	-5.3 \pm 0.7				
		Aerial Part	Shizuoka	85.4 \pm 2.4	-5.7 \pm 2.9				
		Leaf	Kagoshima	59.1 \pm 1.0	-6.4 \pm 1.9				
	<i>Deparia petersenii</i> (Kunze) M.Kato (ナチシケシダ)	Aerial Part	Kagoshima	96.9 \pm 0.6	-5.4 \pm 0.5				
		Leaf	Kagoshima	25.7 \pm 0.2	-9.9 \pm 2.3				
	<i>Deparia pterorachis</i> (Christ) M.Kato (オオメシダ)	Aerial Part	Hokkaido	17.1 \pm 0.2	-10.9 \pm 3.5				
	<i>Deparia pycnosora</i> (Christ) M.Kato (ミヤマシケシダ)	Whole Plant	Iwate	63.8 \pm 1	-1.1 \pm 2.1			○	
		Aerial Part	Tokyo	28.8 \pm 0.2	-8.4 \pm 2.2			○	
	<i>Diplazium donianum</i> (Mett.) Tardieu var. <i>aphanoneuron</i> (Ohwi) Tagawa (アツバキノボリシダ)	Aerial Part	Okinawa	-	-1.3 \pm 3.0				
		<i>Diplazium hachijoense</i> Nakai (シロヤマシダ)	Aerial Part	Kagoshima	24.3 \pm 0.1	-3.7 \pm 2.0			
	Rhizome		Kagoshima	28.7 \pm 0.2	-7.1 \pm 1.7				
	<i>Diplazium hachijoense</i> Nakai (シロヤマシダ)	Aerial Part	Kouchi	37 \pm 0.4	-8.0 \pm 9.4				
	<i>Diplazium squamigerum</i> (Mett.) C.Hope (キヨタキシダ)	Aerial Part	Ehime	77.4 \pm 0.7	16.7 \pm 3.8			○	
	<i>Dryopsis maximowicziana</i> (Miq.) Holtum et P.J.Edwards (キヨスミヒメワラビ)	Aerial Part	Tokyo	61.3 \pm 0.5	3.3 \pm 3.1				
		Aerial Part	Ehime	157.2 \pm 0.8	31.5 \pm 4.8				
		Aerial Part	Fukuoka	55.1 \pm 0.8	2.3 \pm 1.1				
	<i>Dryopteris chinensis</i> (Baker) Koidz. (ミサキカグマ)	Aerial Part	Gumma	51.8 \pm 0.2	-6.5 \pm 0.4				
		Aerial Part	Hokkaido	114.3 \pm 1.3	-1.5 \pm 2.6				
Aerial Part		Hokkaido	40.3 \pm 1.3	-9.3 \pm 4.0					
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai (オンダ)		Underground Part	Iwate	332.9 \pm 1.9	102.5 \pm 3.9	0.12 \pm 0.0097	○		
		Aerial Part	Yamanashi	210.2 \pm 2.2	22.2 \pm 1.9				
Aerial Part	Kagoshima	110.1 \pm 1.3	-1.1 \pm 2.4						
<i>Dryopteris erythrosora</i> (D.C.Eaton) Kuntze (ベニシダ)	Leaf	Ibaraki	107.8 \pm 1.6	8.3 \pm 4.5			○		
	Aerial Part	Ibaraki	73.2 \pm 0.2	13.0 \pm 0.4			○		
	Aerial Part	Ehime	85.1 \pm 0.6	9.5 \pm 5.5			○		
<i>Dryopteris lacera</i> (Thunb.) Kuntze (クマワラビ)	Aerial Part	Ehime	74.7 \pm 0.7	23.7 \pm 1.6					
<i>Dryopteris monticola</i> (Makino) C.Chr. (ミヤマベニシダ)	Aerial Part	Hokkaido	35.6 \pm 0.7	-3.9 \pm 4.0					
	Aerial Part	Hokkaido	20.8 \pm 0.2	-6.6 \pm 0.6					
<i>Dryopteris sabae</i> (Franch. et Sav.) C.Chr. (ミヤマイトチシダ)	Aerial Part	Ehime	159.2 \pm 0.3	16.3 \pm 8.2					
<i>Dryopteris saxifraga</i> H.Ito (イワイトチシダ)	Aerial Part	Ibaraki	108.8 \pm 0.9	18.4 \pm 2.3					
<i>Dryopteris sordidipes</i> Tagawa (ヨゴレイタチシダ)	Leaf	Okinawa	220.6 \pm 2.9	64.6 \pm 8.0	0.10 \pm 0.013				
<i>Dryopteris uniformis</i> (Makino) Makino (オクマワラビ)	Aerial Part	Ibaraki	56.3 \pm 0.4	18.6 \pm 1.2					
	Aerial Part	Tokyo	192.2 \pm 1.1	2.8 \pm 4.2					

Table 2-2-1. (continued)

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA/mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience	
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)				
Dryopteridaceae オンダ科	<i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Tod. (クサソテツ)	Aerial Part	Hokkaido	84.3 \pm 0.1	2.6 \pm 3.2				○	
		Underground Part	Hokkaido	248.1 \pm 0.6	24.8 \pm 1.2				○	
		Aerial Part	Hokkaido	146.3 \pm 0.4	7.2 \pm 2.5				○	
		Aerial Part	Hokkaido	21.6 \pm 0.1	-4.0 \pm 2.2				○	
		Aerial Part	Hokkaido	16.3 \pm 0.2	-10.5 \pm 2.2				○	
	<i>Onoclea sensibilis</i> L. var. <i>interrupta</i> Maxim. (コウヤワラビ)	Aerial Part	Nagano	112.1 \pm 0.9	0.5 \pm 0.8				○	
		Aerial Part	Iwate	85.3 \pm 0.9	-1.5 \pm 1.3					
		Underground Part	Iwate	330.3 \pm 1.4	87.5 \pm 7.9	0.10 \pm 0.014				
		Aerial Part	Ibaraki	49.6 \pm 0.6	5.0 \pm 1.2					
		Aerial Part	Yamanashi	242.5 \pm 1.1	36.6 \pm 3.5					
	<i>Pentarhizidium orientale</i> (Hook.) Hayata (イヌガンソク)	Aerial Part	Nagano	118.3 \pm 0.5	21.4 \pm 1.4					
		Aerial Part	Hokkaido	34.3 \pm 1.0	-12.0 \pm 2.1					
		Aerial Part	Hokkaido	55.9 \pm 0.2	-11.2 \pm 5.9					
		Aerial Part	Iwate	62 \pm 0.4	2.9 \pm 2.9					
	<i>Polystichum craspedosorum</i> (Maxim.) Diels (ツルデンダ)	Underground Part	Iwate	119 \pm 1.3	-4.1 \pm 1.2					
		Aerial Part	Chiba	79.7 \pm 0.7	-5.9 \pm 5.3					
		Aerial Part	Gumma	62.5 \pm 0.3	-1.6 \pm 2.2					
	<i>Polystichum lepidocaulon</i> (Hook.) J.Sm. (オリツルシダ)	Aerial Part	Shizuoka	185.8 \pm 0.8	33.1 \pm 1.0					
		Aerial Part	Shizuoka	108.9 \pm 1.1	12.3 \pm 1.4					
		Underground Part	Shizuoka	216.3 \pm 0.8	48.4 \pm 1.1					
	<i>Polystichum longifrons</i> Sa.Kurata (ア イアスカイノデ)	Aerial Part	Tokyo	150.6 \pm 1.3	1.8 \pm 2.1					
		Aerial Part	Iwate	107.6 \pm 2.1	11.9 \pm 1.0					
	<i>Polystichum ovatopaleaceum</i> (Kodama) Sa.Kurata var. <i>ovatopaleaceum</i> (ツヤナシイノデ)	Underground Part	Iwate	470.4 \pm 2.1	105.8 \pm 4.1	0.080 \pm 0.0048				
		Aerial Part	Kouchi	238.5 \pm 2.0	69.2 \pm 10.7	0.073 \pm 0.0065				
		Leaf	Ibaraki	141.0 \pm 2.0	-1.8 \pm 0.9					
	<i>Polystichum polyblepharon</i> (Roem. ex Kunze) C.Presl (イノデ)	Aerial Part	Ibaraki	137.3 \pm 0.6	11.9 \pm 1.7					
		Aerial Part	Tokyo	226.8 \pm 2.1	10.0 \pm 2.0					
		Aerial Part	Fukuoka	248.5 \pm 2.7	51.1 \pm 9.3	0.12 \pm 0.014				
		Aerial Part	Kumamoto	132.5 \pm 0.8	9.8 \pm 4.4					
	<i>Polystichum pseudomakinoi</i> Tagawa (サイゴクイノデ)	Aerial Part	Ohita	193.1 \pm 0.6	12.6 \pm 2.2					
		Aerial Part	Hokkaido	24.4 \pm 0.2	-8.5 \pm 2.1				○	
		Aerial Part	Hokkaido	33.3 \pm 0.2	-6.0 \pm 1.3				○	
		Aerial Part	Hokkaido	30.8 \pm 0.3	-6.5 \pm 1.7				○	
		Underground Part	Hokkaido	206.1 \pm 1.4	7.7 \pm 1.8				○	
		<i>Polystichum tripterum</i> (Kunze) C.Presl (ジュウモンジシダ)	Aerial Part	Ibaraki	37.3 \pm 0.7	0.7 \pm 2.6				○
			Aerial Part	Ibaraki	9.8 \pm 0.3	0.4 \pm 4.9				○
			Aerial Part	Tokyo	44.9 \pm 0.2	4.2 \pm 3.2				○
		<i>Tectaria decurrens</i> (C.Presl) Copel. (ナナバケシダ)	Underground Part	Tokyo	306.8 \pm 0.4	52.8 \pm 4.1	0.11 \pm 0.019			○
			Underground Part	Ehime	109.4 \pm 0.3	-3.7 \pm 1.7				○
			Aerial Part	Ehime	49.2 \pm 5.2	-12.9 \pm 4.0				○
		<i>Tectaria harlandii</i> (Hook.) C.M.Kuo (ハルランシダ)	Leaf	Okinawa	320.9 \pm 2.4	89.9 \pm 4.1	0.098 \pm 0.019			
	Aerial Part		Okinawa	226.7 \pm 2.7	57.8 \pm 10.4	0.13 \pm 0.018				
	<i>Tectaria simonsii</i> (Bedd.) Ching (カレンコウアミシダ)	Aerial Part	Okinawa	57.9 \pm 0.2	-12.8 \pm 3.9					
		Leaf	Okinawa	46.9 \pm 8.6	-8.5 \pm 0.6					
	<i>Tectaria subtriphylla</i> (Hook. et Arn.) Copel. (ミカワリシダ)	Aerial Part	Ibaraki	43.1 \pm 0.8	-10.9 \pm 2.4					
		Aerial Part	Chiba	80.2 \pm 1.3	-2.8 \pm 1.4					
		Aerial Part	Shizuoka	42.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.6					
		Aerial Part	Shizuoka	59.4 \pm 0.2	6.9 \pm 1.1					
		Leaf	Kagoshima	34.9 \pm 1.1	-10.8 \pm 1.9					
	<i>Thelypteris acuminata</i> (Houtt.) C.V.Morton (ホシダ)	Aerial Part	Kagoshima	77.0 \pm 0.4	-0.6 \pm 2.9					
		Aerial Part	Kagoshima	111.3 \pm 1.6	-0.4 \pm 4.0					
	<i>Thelypteris angustifrons</i> (Miq.) Ching (コハシゴシダ)	Aerial Part	Kagoshima	111.3 \pm 1.6	-0.4 \pm 4.0					
		Aerial Part	Tokyo	90.9 \pm 1.0	13.5 \pm 2.3				○	
	<i>Thelypteris decursivepinnata</i> (H.C.Hall) Ching (サジゲジシダ)	Aerial Part	Ohita	109.9 \pm 0.9	5.8 \pm 4.0				○	
		Aerial Part	Ohita	109.9 \pm 0.9	5.8 \pm 4.0				○	
	<i>Thelypteris glanduligera</i> (Kunze) Ching (ハンショシダ)	Aerial Part	Kagoshima	26.7 \pm 0.7	-12.1 \pm 4.1					
		Aerial Part	Kagoshima	26.7 \pm 0.7	-12.1 \pm 4.1					
	<i>Thelypteris interrupta</i> (Willd.) K.Iwats. (テツホシダ)	Leaf	Kagoshima	174.2 \pm 1.2	0 \pm 2.8					
		Leaf	Kagoshima	174.2 \pm 1.2	0 \pm 2.8					
	<i>Thelypteris japonica</i> (Baker) Ching (ハリガネワラビ)	Leaf	Ibaraki	62.9 \pm 1.4	-7.1 \pm 2.2					
		Leaf	Ibaraki	62.9 \pm 1.4	-7.1 \pm 2.2					

Table 2-2-1. (continued)

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA/mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)			
Dryopteridaceae オンシダ科	<i>Thelypteris leveillei</i> (Christ) C.M.Kuo (ミゾシダモドキ)	Aerial Part	Miyazaki	47.5 \pm 0.3	4.4 \pm 2.0				
	<i>Thelypteris parasitica</i> (L.) Tardieu (ケホシダ)	Aerial Part	Kagoshima	33.6 \pm 0.6	-4.4 \pm 2.7				
		Leaf	Okinawa	68.0 \pm 1.9	4.7 \pm 4.3				
	<i>Thelypteris phegopteris</i> (L.) Sloss. ex Rydb. (ミヤマワラビ)	Aerial Part	Okinawa	52.4 \pm 0.5	-8.4 \pm 2.4				
		Aerial Part	Ibaraki	112.4 \pm 0.8	16.7 \pm 2.5				
	<i>Thelypteris pozoi</i> (Lag.) C.V.Morton subsp. <i>mollissima</i> (Fisch. ex Kunze) C.V.Morton (ミゾシダ)	Aerial Part	Ibaraki	80.8 \pm 0.7	25.3 \pm 2.3				
		Aerial Part	Okinawa	414.2 \pm 2.1	40 \pm 3.1				
	<i>Thelypteris triphylla</i> (Sw.) K.Iwats. (コウモリシダ)	Leaf	Okinawa	61.1 \pm 0.5	-8.0 \pm 1.1				
		Aerial Part	Okinawa	29.7 \pm 0.5	-6.8 \pm 2.3				
	<i>Thelypteris viridifrons</i> Tagawa (ミドリヒメワラビ)	Aerial Part	Okinawa	32.5 \pm 0.2	-6.5 \pm 1.7				
		Aerial Part	Ibaraki	61.7 \pm 0.6	2.6 \pm 0.9				
	<i>Woodsia manchuriensis</i> Hook. (フクロシダ)	Aerial Part	Chiba	88.7 \pm 0.8	-2.2 \pm 1.6				
		Aerial Part	Gumma	51.3 \pm 0.4	-6.4 \pm 2.0				
Blechnaceae シシガシラ科	<i>Blechnopsis orientalis</i> (L.) C.Presl (ヒリュウシダ)	Leaf	Okinawa	309.0 \pm 2.6	109.5 \pm 3.2	0.051 \pm 0.0017			○
		Aerial Part	Okinawa	221.7 \pm 1	86.3 \pm 4.3	0.097 \pm 0.011			○
		Aerial Part	Okinawa	257.0 \pm 1.7	93.6 \pm 3.9	0.11 \pm 0.0067			○
		Underground Part	Okinawa	384.9 \pm 3	104.2 \pm 1.9	0.17 \pm 0.0070			○
	<i>Struthiopteris amabilis</i> (Makino) Ching (オサシダ)	Aerial Part	Chiba	196.9 \pm 3.4	89.9 \pm 1.0	0.075 \pm 0.0050			
		Underground Part	Iwate	432.9 \pm 1.7	65.3 \pm 14.2	0.095 \pm 0.0094			
	<i>Struthiopteris castanea</i> (Makino) Nakai (ミヤマシシガシラ)	Aerial Part	Ibaraki	138.1 \pm 0.8	15.5 \pm 4.7				
		Aerial Part	Gumma	130.9 \pm 0.9	24.2 \pm 9.5				
		Whole Plant	Shizuoka	247.1 \pm 2.2	25.5 \pm 5.4				
		Aerial Part	Nagano	191.0 \pm 0.8	93.0 \pm 4.5	0.071 \pm 0.0018			
		Aerial Part	Ehime	197.4 \pm 2.2	35.8 \pm 5.8				
	<i>Woodwardia japonica</i> (L.f.) J.Sm. (オオカグマ)	Aerial Part	Kumamoto	212.4 \pm 1.6	17.8 \pm 0.7				
		<i>Woodwardia orientalis</i> Sw. (コモチシダ)	Aerial Part	Ibaraki	194.8 \pm 1.8	24.5 \pm 4.5			
Aerial Part			Shizuoka	158.5 \pm 1.3	73.9 \pm 5.8	0.12 \pm 0.0067			
<i>Woodwardia prolifera</i> Hook. et Arn. (ハチジョウカグマ)		Leaf	Kagoshima	232.1 \pm 1.5	51.1 \pm 2.6	0.089 \pm 0.013			
	Aerial Part	Kagoshima	199.5 \pm 3.3	-4.9 \pm 1.8					
Aspleniaceae チャセンシダ科	<i>Asplenium antiquum</i> Makino (オオタニワタリ)	Aerial Part	Kagoshima	13.7 \pm 0.8	-9.6 \pm 0.6				○
		Aerial Part	Nagano	60.4 \pm 1	-8.8 \pm 2.3				
	<i>Asplenium incisum</i> Thunb. (トラノオシダ)	Aerial Part	Okinawa	19.7 \pm 0.1	-14.6 \pm 1.5				○
		Aerial Part	Ibaraki	87.3 \pm 0.4	3.2 \pm 3.1				
	<i>Asplenium normale</i> D.Don (スリトラノオ)	Aerial Part	Shizuoka	52.2 \pm 0.2	-11.2 \pm 2.9				
		Underground Part	Shizuoka	31.2 \pm 0.1	-5.4 \pm 1.4				
	<i>Asplenium ritoense</i> Hayata (コウザキシダ)	Whole Plant	Kouchi	37.8 \pm 0.2	-11.6 \pm 0.8				
		Aerial Part	Hokkaido	48.8 \pm 0.6	-10.6 \pm 2.8				
	<i>Asplenium scolopendrium</i> L. subsp. <i>japonicum</i> (Kom.) Rasbach, Reichst. et Viane (コタニワタリ)	Aerial Part	Hokkaido	18.1 \pm 0.9	-18.6 \pm 0.9				
		Aerial Part	Iwate	62.1 \pm 0.6	-5.7 \pm 5.3				
		Underground Part	Iwate	169.7 \pm 0.5	29.5 \pm 3.1				
	<i>Asplenium wrightii</i> D.C.Eaton ex Hook. (クルマシダ)	Aerial Part	Kouchi	20.6 \pm 0.1	-5.0 \pm 1.9				
		Underground Part	Kouchi	12.5 \pm 0	-1.8 \pm 1.6				
<i>Asplenium anogrammoides</i> Christ ex H.Lév. (コバノヒノキシダ)	Whole Plant	Tokyo	64.8 \pm 0.8	-5.6 \pm 4.1					
	Whole Plant	Shizuoka	65.1 \pm 0.7	-11.2 \pm 1.8					
Polypodiaceae ウラボシ科	<i>Cheiropleuria integrifolia</i> (D.C.Eaton ex Hook.) M.Kato, Y.Yatabe, Sahashi et N.Murak. (スジヒトツバ)	Leaf	Okinawa	76.1 \pm 0.8	-9.4 \pm 1.9				
		Leaf	Okinawa	242.6 \pm 4	26.1 \pm 6.4				
	<i>Goniophlebium niponicum</i> (Mett.) Bedd. (アオネカズラ)	Whole Plant	Ohita	104.5 \pm 0.4	-15.6 \pm 0.4				

Table 2-2-1. (continued)

Family	Scientific name (Japanese name)	Part	Area	Total phenol content ($\mu\text{g-GA}/\text{mg-Ext}$)	HAase inhibition		Drug	non Drug	Food experience
					1st SC (%)	2nd SC (IC ₅₀ mg/mL)			
Polypodiaceae ウラボシ科	<i>Lemmaphyllum microphyllum</i> C.Presl (マメツタ)	Whole Plant	Ibaraki	50.9 \pm 1.0	-6.4 \pm 0.9				
		Aerial Part	Chiba	38.3 \pm 0.9	-10.7 \pm 2.4				
		Underground Part	Chiba	61.1 \pm 0.7	-7.6 \pm 2.3				
		Aerial Part	Shizuoka	70.6 \pm 0.9	-1.5 \pm 1.8				
		Aerial Part	Shizuoka	50.5 \pm 1.8	-3.8 \pm 2.1				
	<i>Lepisorus thunbergianus</i> (Kaulf.) Ching (ノキシノブ)	Aerial Part	Ibaraki	70.4 \pm 0.5	-12.1 \pm 4.8				
		Underground Part	Ibaraki	43.6 \pm 0.5	-1.2 \pm 1.8				
		Whole Plant	Ibaraki	68.7 \pm 0.8	1.5 \pm 1.9				
	<i>Leptochilus ellipticus</i> (Thunb.) Noot. (イワヒトデ)	Aerial Part	Kouchi	79.6 \pm 0.3	-6.9 \pm 2.4				
		Leaf	Kagoshima	26.5 \pm 0.1	-13.5 \pm 1.6				
	<i>Leptochilus neopothifolius</i> Nakaïke (オオイワヒトデ)	Aerial Part	Kagoshima	50.5 \pm 0.7	-11.2 \pm 3.0				
		Underground Part	Kagoshima	67.5 \pm 0.4	-14.4 \pm 1.7				
		Aerial Part	Miyazaki	40 \pm 0.2	-8.2 \pm 0.2				
		Leaf	Okinawa	57.8 \pm 0.2	-3.7 \pm 2.1				
	<i>Leptochilus wrightii</i> (Hook.) X.C.Zhang (ヤリノホクリハラン)	Aerial Part	Kagoshima	36.1 \pm 2.8	-9.5 \pm 4.5				
		Aerial Part	Shizuoka	39.7 \pm 6.4	-5.8 \pm 0.6				
	<i>Neolepisorus ensatus</i> (Thunb.) Ching (クリハラン)	Underground Part	Shizuoka	62.1 \pm 0.8	-9.3 \pm 2.5				
		Aerial Part	Ibaraki	161.5 \pm 0.6	22.8 \pm 5.0			○	
	<i>Pyrrhosia lingua</i> (Thunb.) Farw. (ヒトツバ)	Aerial Part	Chiba	146.4 \pm 1.2	35.7 \pm 7.6			○	
		Underground Part	Chiba	113.4 \pm 1.4	3.3 \pm 2.0			○	
		Whole Plant	Shizuoka	213.1 \pm 0.6	66.7 \pm 0.4	0.16 \pm 0.022		○	
		Aerial Part	Okinawa	249.7 \pm 0.8	94.5 \pm 2.5	> 0.4		○	
		Aerial Part	Okinawa	145.5 \pm 0.6	23.4 \pm 5.1			○	
<i>Selliguea hastata</i> (Thunb.) Fraser- Jenk. (ミツデウラボシ)	Whole Plant	Chiba	60.5 \pm 0.5	0 \pm 3.7			○		
	Aerial Part	Chiba	71.1 \pm 0.4	-0.8 \pm 1.7			○		
	Whole Plant	Ibaraki	76.6 \pm 0.2	0 \pm 1.3			○		
Aerial Part	Ibaraki	12.6 \pm 0.1	-8.6 \pm 0.7			○			

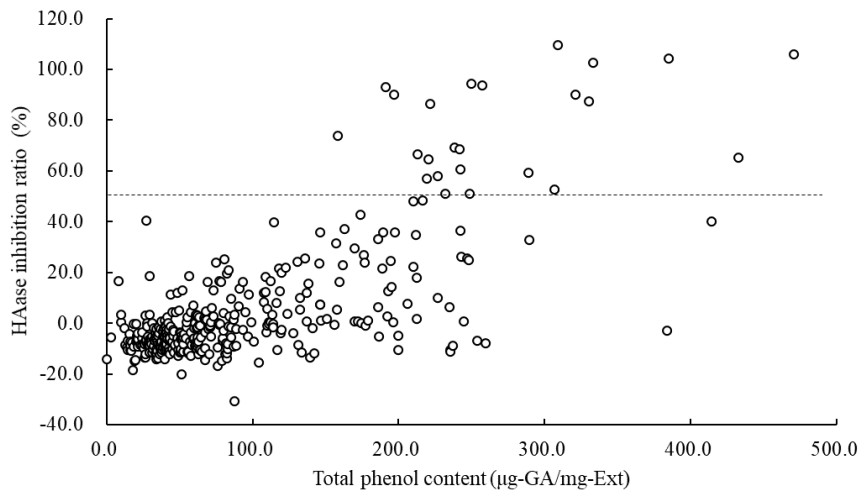


Fig. 2-2-1 Total phenol content vs HAase inhibition ratio of fern extracts

第3章 シダ植物に着目した HAase 阻害活性成分探索

背景と目的

植物由来の HAase 阻害活性物質はこれまでに多数報告されており、アルカロイド類、フェノール系化合物、多糖類など多種にわたる[72]。本章では HAase 阻害活性を指標としてコシダ地上部およびヒリュウシダ根茎の MeOH エキス中の HAase 阻害成分の探索を実施した。

実験方法

機器及び試薬類

1. 分析機器

核磁気共鳴装置 (NMR)	Ascend 600 (Bruker Biospin)
質量分析計 (MS)	Orbitrap Elite (Thermo scientific)
HPLC 装置	ポンプ: PU-1580 (日本分光) 検出器: UV-1575 (日本分光) カラムオーブン: CO-1560 (日本分光) HPLC カラム: CapcellpackC18 UG120 (Osaka Soda) 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm COSMOSIL Cholester (nakarai) 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm Kinetex 5u Biphenyl 100 A (Phenomenex) 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm
旋光度計	P-1020 (日本分光)
円二色性分散計 (CD)	J-820 (日本分光) *CD スペクトルの測定は東レリサーチセンターに委託して実施した。
紫外可視分光光度計 (UV)	UVmini1240 (島津)

2. カラム用単体及び TLC プレート

活性炭素	活性炭素 クロマトグラフ用(富士フィルム和光純薬)
シリカゲル	シリカゲル 60N(球状、中性) 100-210 μm (関東化学)
ODS	YMC-Gel ODS-A (YMC)
セファデックス	LH-20(GE ヘルスケア)
TLC プレート	LuxPlate TLC-Silica gel 60 F254 (Merk) ODS プレート(Merk)

3. 試薬類

hexane, chloroform (CH_3Cl), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), MeOH, HPLC 用溶媒 [MeOH, Acetonitrile (MeCN)] は富士フィルム和光純薬(大阪)より入手した。NMR 用溶媒 (CD_3OD , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{Acetone-}d_6$) は関東化学(東京)より入手した。

HAase 阻害試験で使用した試薬については第 2 部第 2 章 (p.60) を参照

4. ソフトウェア

分子の立体構造の予測には Chem3D version 20.0.0.41 (PerkinElmer) を使用し、MM2 にて実施した。

実験方法

1. HAase 阻害活性測定法

第 2 部第 2 章を参照 (p. 60)

2. 植物材料について

コシダの地上部は 2019 年 4 月に静岡県にて、ヒリュウシダの地下部は 2019 年 10 月に沖縄県石垣島にて採取した。植物体は水洗、乾燥、粉碎後使用した。抽出及び分離方法については結果及び考察の項を参照。

結果及び考察

コシダについて

ウラボシ科コシダ属コシダ [*Dicranopteris pedata* (Houtt.) Nakaike] は福島県・新潟県以西に生育するシダ植物である。地上部は二叉分枝で永続的に伸長する特徴的な形状をしており、しばしば明るい斜面に巨大な群落を作る (Fig. 2-3-1) [15]。中国では芒萁骨 (ボウキコツ) の名称で止血、解熱等に使用される [80] が、日本における食用及び薬用の活用歴は確認されていない。地上部のエキスからは afzelin、quercitrin 等のフラボノイド類、clerodan 系ジテルペノイド等の含有が報告されている (Fig. 2-3-2) [81, 82]



Fig. 2-3-1 Photographs of *D. pedate* in Shizuoka
Upper: close view, lower: distant view (April, 2019)

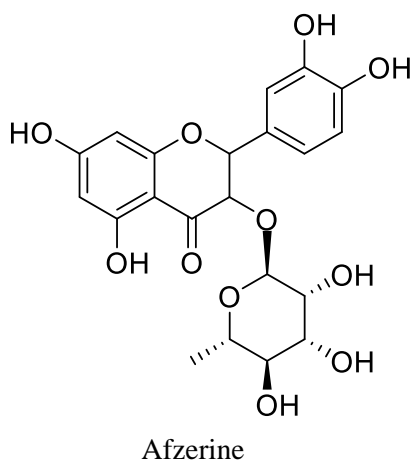
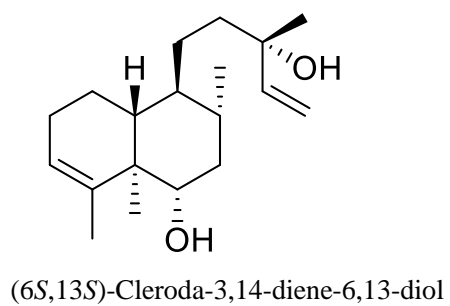
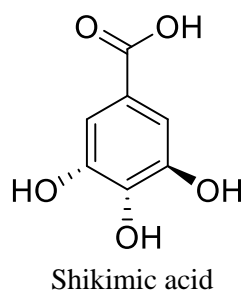


Fig. 2-3-2 Structures of compounds isolated from *D.pedata*

コシダ地上部の抽出及び分離 (Fig. 2-3-3 及び 4 参照)

2019年4月に静岡県で採集したコシダ地上部(4.8 kg)を乾燥、粉碎後、熱 MeOH にて抽出した(30 L × 3 回)。抽出液は分離精製の妨げとなるクロロフィルを除去するため、活性炭カラム(活性炭 500 g、15 cm × 15 cm i.d.)を通し、5つの分画に分けた。活性炭カラム通過分画(Fig.2-2-3、2-2-4 Pass-through Fr.)の有色分画、及び MeOH 溶出分画を合わせてシリカゲルカラム(23 cm × 15 cm i.d.)で分画した結果、極性の高い分画に強い HAase 阻害作用が認められた(Fig. 2-3-3)。阻害活性の認められた後半の分画の内、TLC 上で比較的明瞭なスポットが確認された Fr.22 を更に Sephadex LH-20(60 cm × 3 cm i.d. 90%MeOH)を使用して再分画を実施した所、活性分画は TLC 上で塩化鉄(Ⅲ) 試薬噴霧にて青色の呈色が確認された。このことからこの分画はフェノール系化合物を主とする事が推測された。Fr.22-4 を逆相分取 HPLC (Capcellpack C18 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm MeOH/H₂O + 0.1%TFA)にて精製し、Comp.1 及び 2 を得た。

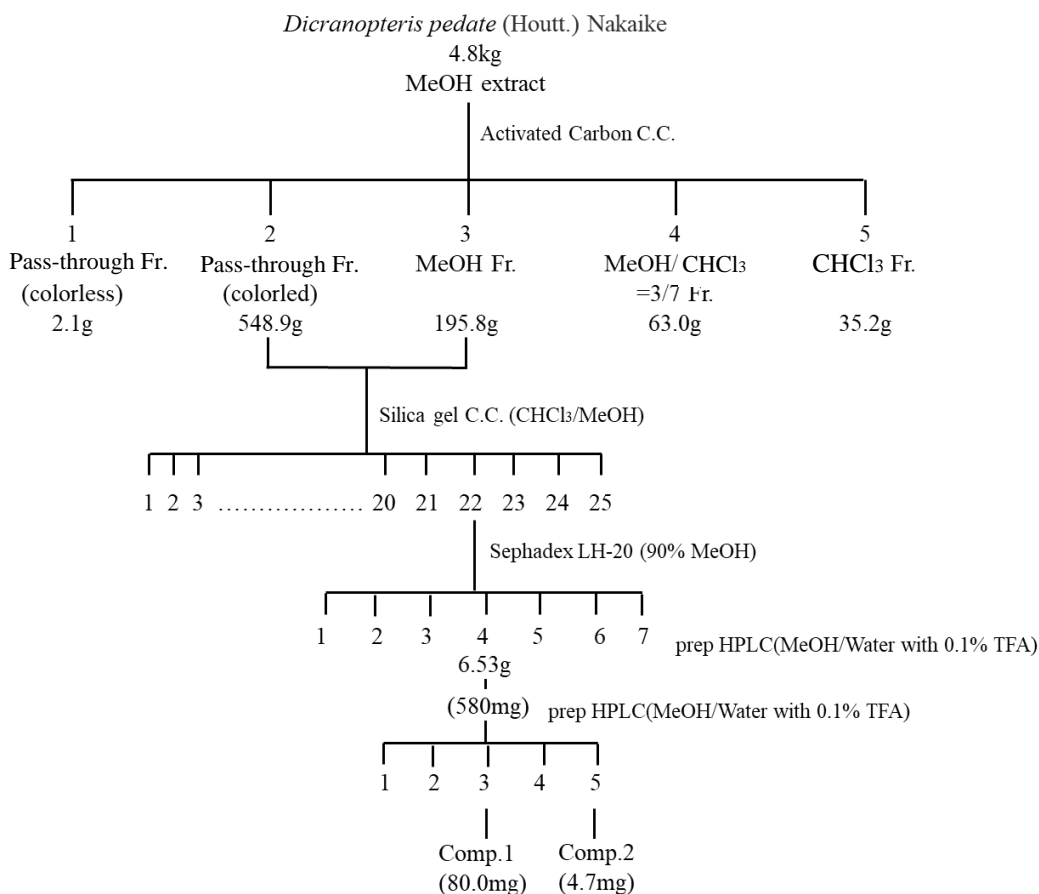


Fig. 2-3-3 Flow chart of separation and purification of *D. pedata*

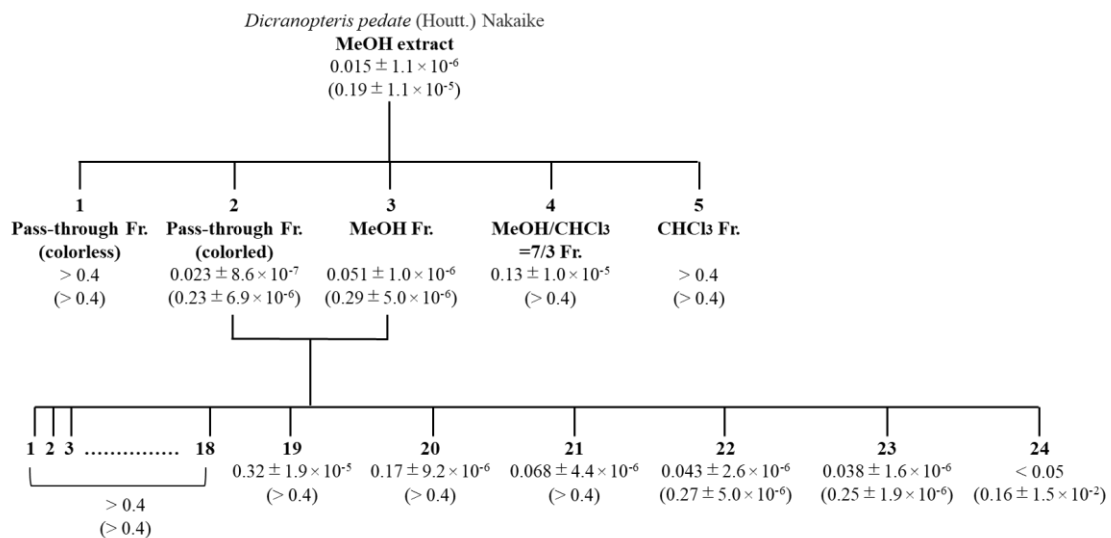


Fig. 2-3-4 IC₅₀ of HAase inhibition in each fractions of *D. pedata*

The values mean IC₅₀ of HAase inhibition (mg/mL) and values in parentheses indicate IC₅₀ under 0.01% POE addition conditions

Comp.1, Comp.2

Comp.1 はヒリュウシダの Comp.4、Comp.2 は Comp.5 と同じ化合物であったため構造については後述。

ヒリュウシダについて

ヒリュウシダ [*Blechnopsis orientalis* (L.) C.Presl] はコモチシダ科ヒリュウシダ属の常緑性シダで、アジア・オセアニア地域に広く分布し、日本では屋久島、沖縄地方で一般的にみられる。1 m を超える長さの葉を持ち、根茎は地上部に直立して生える (Fig. 2-3-5) [18]。空いた土地にいち早く侵入・成長する植物としての一面も持つ [83]。

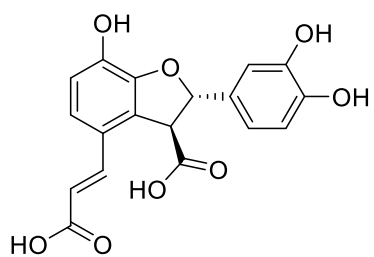
Blechnum 属植物はアジア・オセアニア地域に主に分布し、食用や薬用に用いられている例も多い。オセアニア地域では *B. cappense*, *B. indicum* は食用に、*B. fluviatile* は口内炎に、*B. hastatum* は嘔吐剤または妊娠中絶薬として用いられている [84]。

ヒリュウシダの利用法については虫下しや膀胱炎、根茎は生薬「貫仲」として使用される例 [85] や新芽を食用として用いる [29] といったことが挙げられる。地上部からは *blechnic acid*, *brainic acid* 等のリグナン類 [86]、*catechin* 重合体 [87] が報告されている。また全草からはステロール化合物や *chlorogenic acid* 等が報告されている [88, 89] (Fig. 2-3-6)。

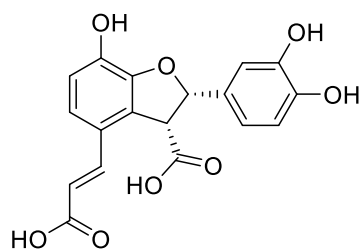


Fig. 2-3-5 Photographs of *B. orientalis* in Ishigaki Island

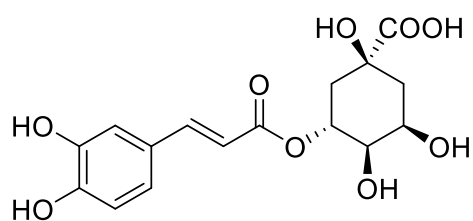
Left: aerial part, right: rhizome (October 2020)



8-epiblechnic acid



trans-blechnic acid



chlorogenic acid

Fig. 2-3-6 Examples of compounds isolated from *B. orientale*

ヒリュウシダ根茎の抽出及び分離 (Fig.2-3-7 及び 8 参照)

ヒリュウシダの根茎及び根(乾燥重量 1 kg)は 2019 年 10 月に石垣島にて採取した。乾燥、粉碎後、MeOH 10 L を加え 2 時間の還流抽出を 3 回繰り返し、ろ液 30 L を集めて減圧濃縮し、エキス 83.51 g を得た。エキスは水に懸濁し Hexane、EtOAc、*n*-BuOH で順次分配後、各溶出画分は減圧濃縮し計 4 種の分画を得た。

各分画で HAase 阻害活性が認められたが、Hexane 層は収量が少なかったこと、*n*-BuOH 層及び水層は TLC の結果からタンニンを主成分とする分画と予想されたことから、ここでは EtOAc 層に着目して分画を実施した。

EtOAc 分画についてシリカゲルカラム(25 cm × 5 cm i.d. 粒子径 5 µm CHCl₃/MeOH)で 4 フラクシオン(Fr. 2-1 ~ Fr. 2-4)に分画したところ、HAase 阻害活性は Fr. 2-3 及び Fr.2-4 に集中した。

Fr. 2-3 は Sephadex LH-20(46 cm × 3 cm i.d. 90% MeOH)にて 7 つの分画に分けた。2-3-4 及び 2-3-5 を逆相分取 HPLC(CapcellpackC18 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5µm MeOH/H₂O + 0.1% TFA)で分画し、Comp.3 (19.1 mg) Comp.4 (16.5 mg) 、Comp.5 (2.0 mg) を得た。

次に Fr.2-2 について、シリカゲルカラム(40 cm × 3 cm i.d. CHCl₃/MeOH)で 5 フラクシオン(Fr. 2-2-1~Fr. 2-2-5)に分画した。

Fr.2-2-3(760 mg)は Sephadex LH-20(60 cm × 3 cm i.d. 90% MeOH)で 9 つに分割した(Fr.2-2-3-1~Fr.2-2-3-9)。Fr.2-2-3-4 を逆相分取 HPLC(Capcellpack C18 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 µm MeOH/H₂O + 0.1% TFA)で精製し、Comp.6(26.2 mg)を得た。また Fr.2-2-3-5 を分取 HPLC(Kinetex Biphenyl 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 µm MeOH/H₂O + 0.1% TFA)で精製し、Comp.7 (4.9 mg)を得た。

Fr. 2-2-4 は二つに分け(①及び②)、それぞれ Sephadex LH-20(35 cm × 2 cm i.d. 80%EtOH)で分画した。① (253.3 mg)の分画は 9 つの分画に分割後、Fr.2-2-4-2 を逆相分取 HPLC で精製(Capcellpack C18 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 µm MeOH/H₂O + 0.1% TFA)し、Comp.8 (12.1 mg)、Comp.9 (3.2 mg)を得た。②(1.5 g)は 5 つに分割した(Fr. 2-2-4-1~Fr. 2-2-4-5)。Fr. 2-2-4-3 を ODS シリカゲルカラム(23 cm × 2.5 cm

MeOH/H₂O)で6つの分画に分割した(Fr. 2-2-4-3-1~Fr. 2-2-4-3-6)。Fr. 2-2-4-3-2をSephadex LH-20(37 cm × 2.5 cm i.d. 60% MeOH)で5つの分画に分けた(Fr. 2-2-4-3-2-1~Fr. 2-2-4-3-2-5)。Fr. 2-2-4-3-2-2を逆相 HPLC(Capcellpack C18 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm 30-40% MeOH + 0.1% TFA)で4つのピークを精製し、Comp.10(2.1 mg)、Comp.11(2.5 mg)を得た。Fr. 2-2-4-3-2-2-4を分取 HPLC(Kinetex Biphenyl 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm MeCN/H₂O + 0.1% TFA)で精製し、Comp.7(2.9 mg)を得た。Fr. 2-2-4-3-2-3を逆相 HPLC(250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm 20% MeCN + 0.1% TFA)で精製し、Comp.12(0.9 mg)を得た。Fr. 2-2-4-3-2-4(40 mg)を逆相 HPLC(Capcellpack C18 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm MeOH/H₂O + 0.1% TFA)にて精製し、Comp.13(34.9 mg)を得た。Fr. 2-2-4-3-4をSephadex LH-20(37 cm × 2.5 cm i.d. 60%MeOH)で4つの分画に分けた(Fr. 2-2-4-3-4-1~Fr. 2-2-4-3-4-4)。Fr. 2-2-4-3-4-3を逆相分取 HPLC(Capcellpack C18 250 mm × 10 mm i.d. 粒子径 5 μm MeOH/H₂O + 0.1% TFA)で精製し Comp.15(10.2 mg)を得た。

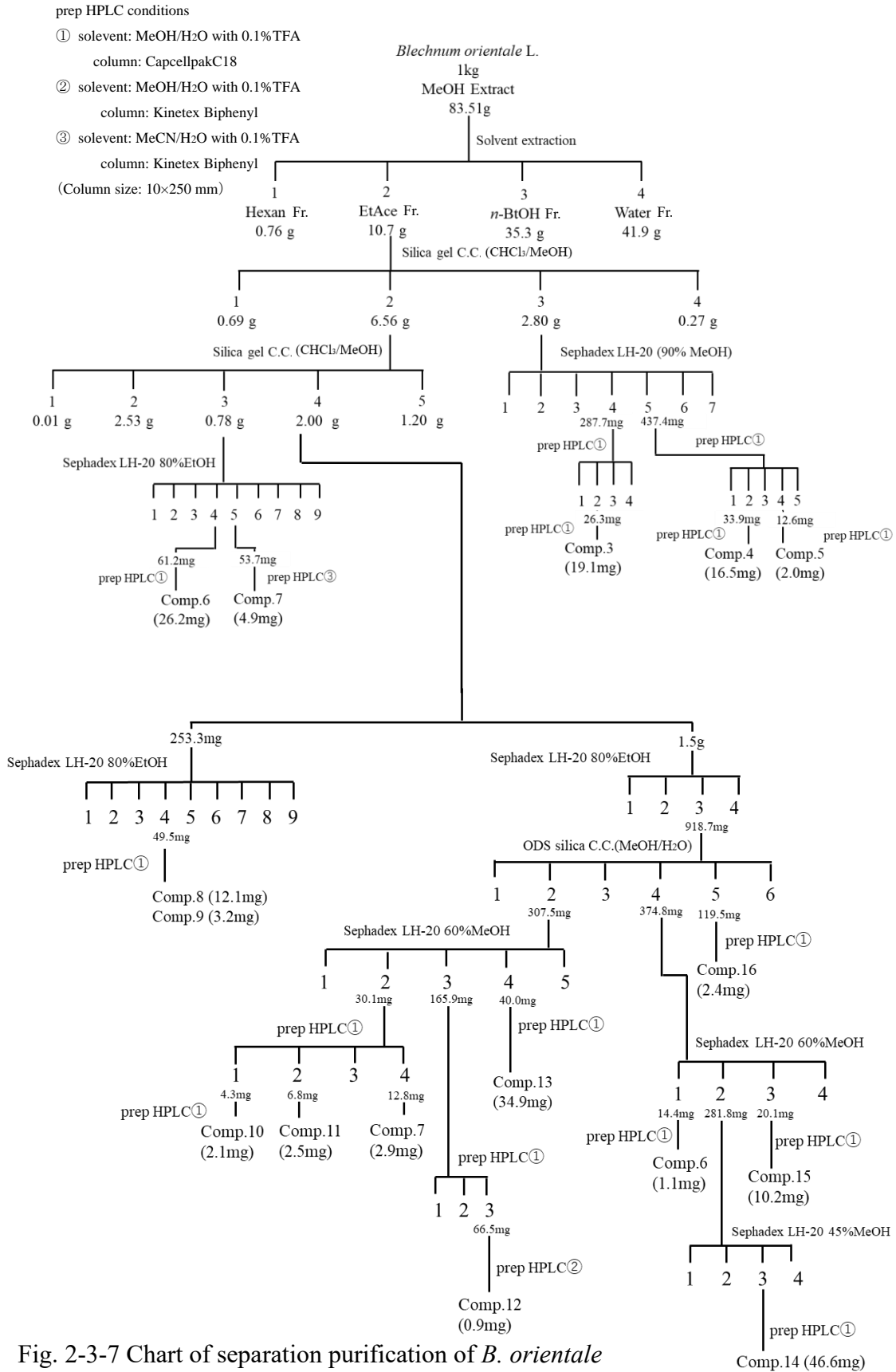


Fig. 2-3-7 Chart of separation purification of *B. orientale*

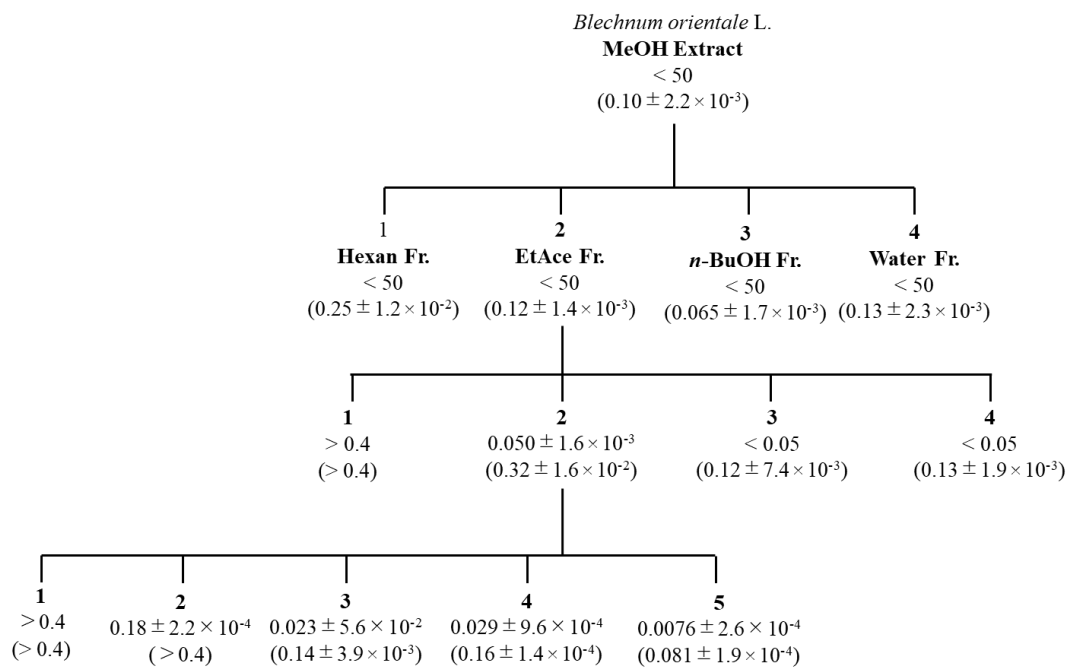


Fig. 2-3-8 IC₅₀ of HAase inhibition in each fractions of *B. orientale*

The unit of IC₅₀ is mg/mL and values in parentheses indicate IC₅₀ under 0.01% POE addition conditions

単離された化合物について

コシダ地上部及びヒリュウシダ根茎より単離された合計 14 種類の化合物の構造解析について以下に述べる。¹H-NMR は 600 MHz、¹³C-NMR は 150 MHz で実施し、全て溶媒ピークを基準とした。

Comp.1 (Comp.4) 及び Comp.2 (Comp.5)

Comp.1 は赤褐色の粉末、Comp.2 は褐色の粉末として得られた。両化合物は TLC プレート上塩化鉄(III)試薬噴霧により青色のスポットを、希硫酸噴霧加熱処理により赤色のスポットを与えたことから、プロシアニジン系化合物であることが示唆された。また、HRESIMS の測定値よりどちらも分子式 C₄₅H₃₆O₁₈ が推定され、catechin 及び epicatechin からなる 3 量体であることが推定された。

¹³C-NMR シグナルから両化合物は芳香環炭素 21 本 (δ_c 110-130)、酸素と隣接した芳香環炭素 15 本 (δ_c 140-160)、酸素原子と隣接する sp³ 炭素 (δ_c 65-80) 及び炭素原子と隣接する sp³ 炭素合計 9 本 (δ_c 25-30) のみから構成されることが示唆され、flavan-3-ol の 3 量体構造を持つことが推定された。各種 NMR スペクトルより予想される両化合物のシグナルの帰属結果を Table 3-2-2 及び 3-2-3 に示す。3 つのユニットの結合について、¹³C-NMR における両化合物の Upper unit の 2-C は 98.5 ppm 及び 98.7 ppm であり、更に DEPT スペクトルから 4 級炭素であった。そのケミカルシフトは両化合物の Middle unit および Lower unit の 2-C よりも 15-20 ppm 程度低磁場側にあることから、2 つの酸素原子と隣接するケタノール炭素であることが示唆された。また Upper unit 及び Middle unit の 4-C はどちら DEPT スペクトルから 3 級炭素であり、HMBC スペクトルからそれぞれ下部 unit の 8-C との結合が示唆された。これらの結果より、両化合物は Upper unit から Middle unit は A タイプ (2→O→7)、Middle unit から Lower unit は B タイプ (4→8) で結合していることが示唆された。

NMR シグナルから両化合物は非常に構造が似ていることが予想されたが、¹H-NMR を詳細に検討したところ、2H/3H の配置に違いが認められた。すなわち ¹H-NMR シグナルにおいて Comp.2 の Middle unit のみ $J = 9.2$ Hz と比較的大きなカップリング定数を示したのに対し、Comp.1 及び Com.2 の他の unit は最大でも $J = 4.4$ Hz と小さな値を示した。この違いは 2H/3H の配置がそれぞれ *cis/trans* 構造を持つ epicatechin

と catechin の違いに相当するものと考えられた。そこで Comp.2 の Middle unit を catechin、他の unit を全て epicatechin と仮定し、両化合物の立体モデルを MM2 にて計算した結果、2H/3H の二面角の予測値はそれぞれ Fig. 2-3-9 のように計算され、catechin 部分のみ大きな二面角を示した。これらの値からカープラスの式により予測される 2H/3H の結合定数の予測値[90]は $J_{\text{epicatechin}} \doteq 3.0 \text{ Hz}$, $J_{\text{catechin}} \doteq 9.5 \text{ Hz}$ となり catechin の方が大きな値をとった。また epicatechin 及び catechin の CD₃OD 中における 2H/3H のカップリング定数はそれぞれ $J_{\text{epicatechin}} = 1.3 \text{ Hz}$ 及び $J_{\text{catechin}} = 7.4 \text{ Hz}$ と報告されており[91, 92]、この結果を支持するものであった。この結果より Comp.2 の Middle unit は catechin、Comp.1 及び Comp.2 の他の unit は epicatechin であることが示唆された。

以上の結果及び文献値 [93]から、それぞれ Comp.1 は epicatechin の三量体である cinnamtannin B1、Comp.2 は epicatechin-catechin-epicatechin の構造を持つ aesculitannin B と決定した (Fig. 2-3-10)。cinnamtannin B1 と aesculitannin B はそれぞれセイロンニッケイ (*Cinnamomum ceylanicum*) 及びセイヨウトチノキ (*Aesculus hippocastanum*) より見いだされたタンニンであるが[94, 95]、シダ植物を含む他の植物からも単離報告がなされている[93, 96]。なお、コシダからはこれまでに epiafzelechin や epicatechin などの単量体から 5 量体タンニンの単離が[96]、ヒリュウシダの地上部からはコシダとは異なる 5 量体タンニン[87]がそれぞれ単離報告されている。cinnamtannin B1 は機能性タンニンとしても知られており、抗腫瘍活性や血小板凝集抑制作用、創傷治癒作用も報告されている[98, 99]。

なお、今回コシダについてははエキスの一部を使用して精製を実施したが、エキス全体量からの分画予想量は 0.9 g であった (乾燥植物体重量の 0.02 %に相当)。前後の分画にも同様の成分が存在していると思われるため実際にはさらに多くの cinnamtannin B1 が含まれているものと考えられた。

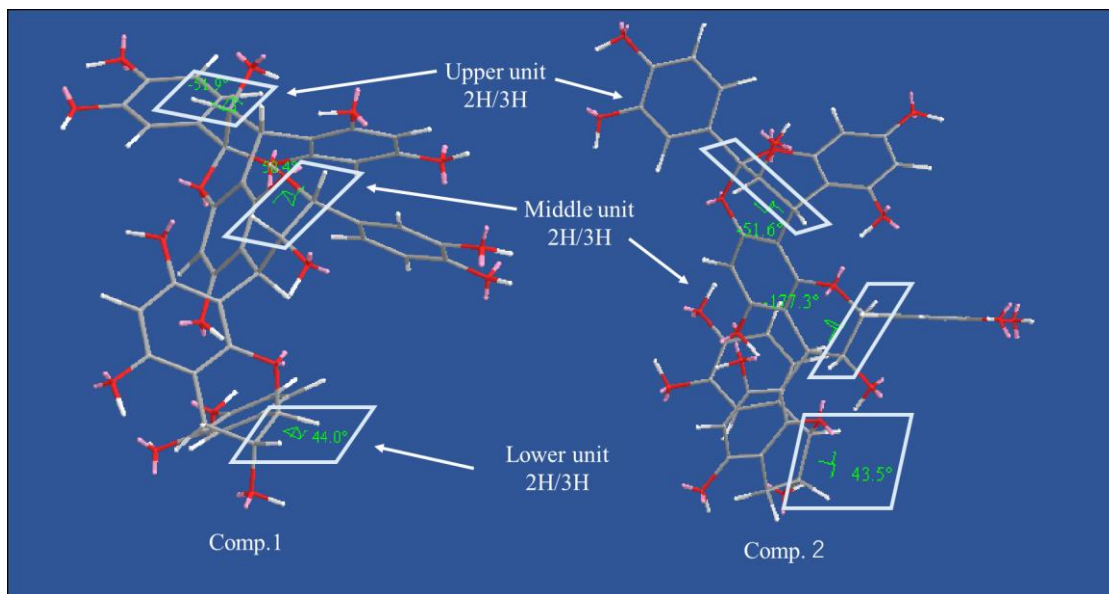


Fig. 2-3-9 MM2 calculation models of Comp.1 and Comp.2

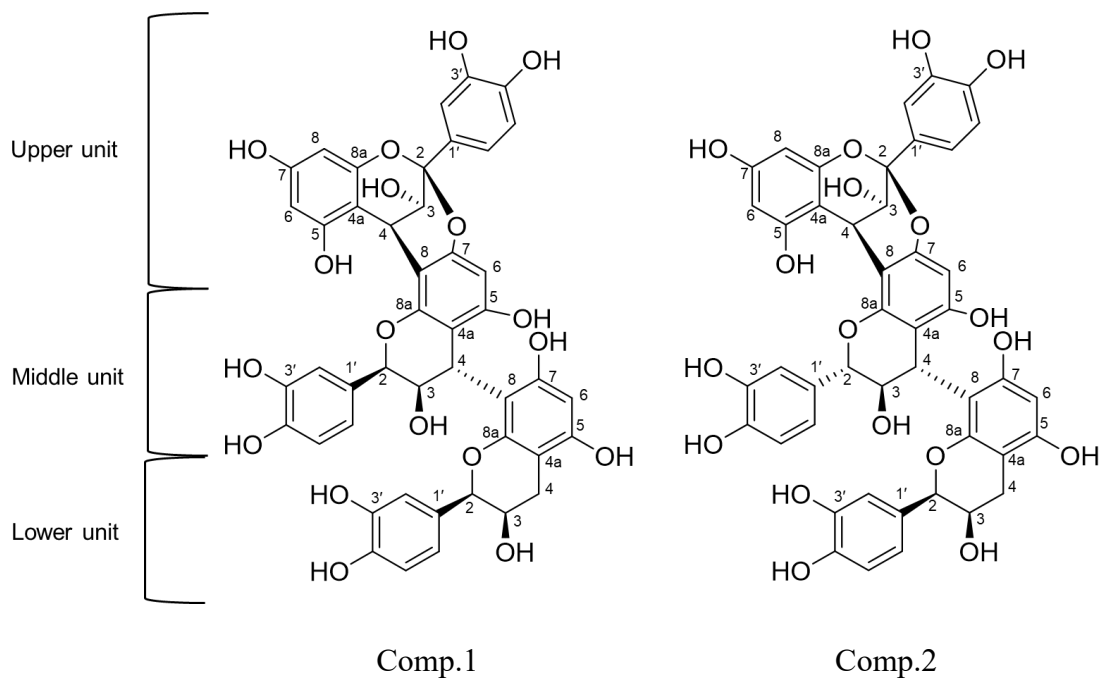


Fig. 2-3-10 Structures of Comp.1 and Comp.2

Table 2-3-1. ¹³C-NMR and ¹H-NMR data of Comp. 1 in CD₃OD

Position	Comp.1		cinnamtannin B1 ^(a)	
	δ _C	δ _H (<i>J</i> in Hz)	δ _C	δ _H (<i>J</i> in Hz)
Upper Unit				
2	98.5		100.0	
3	66.1	3.29 (d, 3.5)	67.2	3.29 (d, 3.5)
4	27.4	4.16 (d, 3.5)	28.9	4.15 (d, 3.5)
5	155.4		156.7	
6	96.8	5.98 (d, 2.3)	98.2	5.97 (d, 2.4)
7	156.4		157.8	
8	95.1	6.02 (d, 2.3)	96.6	6.02 (d, 2.4)
8a	152.7		154.1	
4a	103.5		105.0	
1'	131.0		132.4	
2'	114.3	7.04 (d, 1.9)	115.8	7.03 (d, 2.0)
3'	144.1		145.5	
4'	145.2		146.6	
5'	114.7	6.86 (d, 8.2)	116.2	6.84 (d, 8.1)
6'	118.4	6.86 (dd, 8.2, 1.9)	119.9	6.86 (dd, 8.1, 2.0)
Middle Unit				
2	77.5	5.72 (br s)	78.9	5.70 (br s)
3	71.2	4.12 (br d, 1.3)	72.6	4.13 (br d, 1.4)
4	36.9	4.58 (br s)	38.3	4.56 (br s)
5	154.4		155.8	
6	94.6	5.81 (s)	96.1	5.80 (s)
7	149.7		151.1	
8	104.9		106.4	
8a	150.4		151.8	
4a	105.3		106.7	
1'	130.4		131.8	
2'	115.3	7.33 (d, 2.0)	116.7	7.32 (d, 2.0)
3'	144.5		145.9	
4'	144.9		146.3	
5'	114.3	6.83 (d, 8.1)	115.8	6.82 (d, 8.2)
6'	120.0	7.22 (dd, 8.1, 2.0)	121.4	7.19 (dd, 8.2, 2.0)
Lower Unit				
2	78.9	4.41 (br s)	80.3	4.38 (br s)
3	65.7	3.88 (br t, 3.9)	65.7	3.85 (br t, 3.8)
4	28.5	2.85 (m)	29.8	2.83 (m)
5	154.6		156.0	
6	94.9	6.12 (s)	96.5	6.10 (s)
7	154.2		155.5	
8	107.4		108.9	
8a	154.4		155.8	
4a	98.5		100.1	
1'	131.8		133.2	
2'	114.0	6.84 (d, 1.7)	115.5	6.82 (d, 1.7)
3'	143.9		145.3	
4'	144.3		145.7	
5'	114.5	6.77 (d, 8.1)	116.0	6.76 (d, 8.2)
6'	118.0	6.74 (dd, 6.74, 1.7)	119.5	6.72 (dd, 8.2, 1.7)

^{a)} Reference [93]

Table 2-3-2. ¹³C-NMR and ¹H-NMR data of Comp. 2 in CD₃OD

Position	Comp.2		aesculitannin B ^(a)	
	δ _C	δ _H (<i>J</i> in Hz)	δ _C	δ _H (<i>J</i> in Hz)
Upper Unit				
2	98.7		100.1	
3	65.6	3.31 (d, 3.5)	67.1	3.31 (d, 3.5)
4	27.5	3.96 (d, 3.5)	28.9	3.95 (d, 3.5)
5	155.1		156.5	
6	96.4	5.86 (d, 2.4)	97.9	5.85 (d, 2.3)
7	156.6		158.0	
8	95.0	6.01 (d, 2.4)	96.5	6.00 (d, 2.3)
8a	152.5		153.9	
4a	102.7		104.1	
1'	130.8		132.2	
2'	114.3	7.02 (d, 2.1)	115.7	7.02 (d, 2.1)
3'	143.8		145.2	
4'	144.1		145.5	
5'	114.5	6.85 (d, 8.3)	116.0	6.83 (d, 8.3)
6'	118.4	6.86 (dd, 8.3, 2.1)	119.8	6.86 (dd, 8.3, 2.1)
Middle Unit				
2	83.1	4.63 (d, 9.2)	84.5	4.62 (d, 9.3)
3	72.5	4.59 (t, 9.2)	73.9	4.57 (t, 9.3)
4	37.6	4.53 (d, 9.2)	39.0	4.51 (d, 9.3)
5	154.0		155.4	
6	95.7	5.80 (s)	97.2	5.80 (s)
7	149.8		151.2	
8	105.4		106.9	
8a	150.9		152.2	
4a	107.6		108.9	
1'	129.7		131.1	
2'	115.1	7.21 (d, 2.0)	116.5	7.20 (d, 2.0)
3'	144.7		146.1	
4'	145.3		146.7	
5'	114.9	6.91 (d, 8.2)	116.3	6.9 (d, 8.2)
6'	119.7	7.17 (dd, 8.2, 2.0)	121.1	7.15 (dd, 8.2, 2.0)
Lower Unit				
2	78.2	4.38 (br s)	79.6	4.37 (br s)
3	66.3	4.09 (br d, 4.4)	67.6	4.07 (br d, 3.5)
4	28.7	2.90 (dd, 17.0, 4.9) 2.79 (d, 17.0)	30.1	2.87 (dd, 17.0, 4.8) 2.77 (br d, 17.0)
5	154.9		156.2	
6	95.0	6.09 (s)	96.6	6.08 (s)
7	154.7		156.2	
8	107.3		108.6	
8a	153.9		155.3	
4a	99.4		101.0	
1'	131.6		132.9	
2'	113.8	7.00 (d, 1.9)	115.3	6.98 (d, 1.8)
3'	144.5		145.9	
4'	145.3		146.7	
5'	114.2	6.81 (d, 8.3)	115.7	6.80 (d, 8.3)
6'	117.8	6.91 (dd, 8.3, 1.9)	119.3	6.88 (dd, 8.3, 1.8)

^{a)} Reference [93]

Comp.3

Comp.3 は淡褐色の固体で、TLC プレート上希硫酸噴霧加熱処理により褐色のスポットを与え、HRESIMS の測定値より分子式 $C_{31}H_{28}O_{14}$ が推定された。

^{13}C -NMR スペクトルより、2 つのカルボニル基 (δ_C 172.5, 168.2) の存在が推定された。 1H -NMR スペクトルより、1 つの 1, 2, 3, 5-置換ベンゼン [δ_H 5.99 (1H, d, $J=2.3$ Hz), 5.89 (1H, d, $J=2.3$ Hz)]、2 つの 1, 2, 4-置換ベンゼン [δ_H 6.84 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.73 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 6.70 (1H, dd, $J=8.2, 2.0$ Hz) 及び 6.79 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.73 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 6.66 (1H, dd, $J=8.1, 2.0$ Hz)]、shikimic acid [δ_H 6.71 (1H, br s), 4.27 (1H, br s), 3.78 (1H, dd, $J=6.7, 4.1$ Hz), 4.80 (1H, dt, $J=6.7, 4.7$ Hz), 2.42 (1H, br dt, $J=18.6, 2.4$ Hz), 1.74 (1H, br dt, $J=18.6, 1.7$ Hz)] の存在が推定された。

1H -NMR スペクトルには更に 5 つの特徴的なシグナル [δ_H 5.17 (1H, d, $J=5.0$ Hz), 3.98 (1H, dd, $J=10.7, 5.0$ Hz), 3.07 (1H, t, $J=10.9$ Hz), 4.83 (1H, d, $J=10.1$ Hz), 2.62 (1H, t, $J=10.8$ Hz)] が見られた。これらのシグナルは COSY スペクトルの相関 (Fig. 2-3-11) から、-CH(O)-CH(O)-CH-CH-CH(O)- の配列であることが推定された。更に HMBC スペクトルの相関から、この配列にはカルボニル基 (δ_C 172.5) 及びフェニル基 (δ_C 129.3, 129.5)、そして 1, 2, 3, 5-置換ベンゼン (δ_C 96.7, 154.5) への結合が示唆 (Fig. 2-3-12) されたことから、Comp.3 は flavan-3-ol 骨格をもつことが予想された。また shikimic acid の 5H [δ_H 4.80 (1H, dt, $J=6.7, 4.7$ Hz)] とカルボニル基 (δ_C 172.5) に HMBC 相関がみられたことから shikimic acid 5C の水酸基がカルボニル基 (δ_C 172.5) とエステル結合をしていることが推定された。得られた相関を Fig. 2-3-13 に示す。

最終的に 1H 及び ^{13}C -NMR の値とも文献値[100]とよく一致したことから、Comp.3 を brainicin (Fig. 2-3-14) と決定し、各シグナルを Table 2-3-1 のように帰属した。

brainicin は 2010 年に Wang らがシンガシラ科のソテツワラビ (*Brainea insignis*) より単離報告しているフェノール系化合物である[100]。他の植物からは水生シダであるアカウキクサ (*Azolla pinnata* R.Br. subsp. *asiatica*) からの検出が報告[101]されているのみであり、ヒリュウシダは 3 例目の単離例となる。

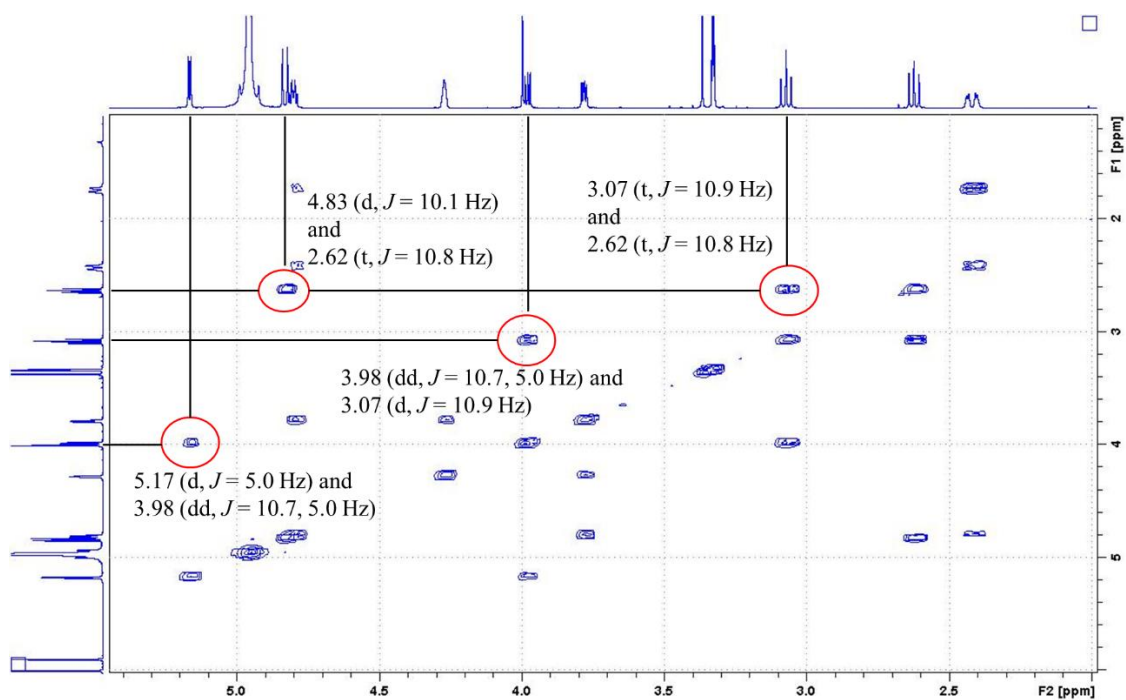


Fig. 2-3-11 COSY spectrum of Comp.3 (expanded)

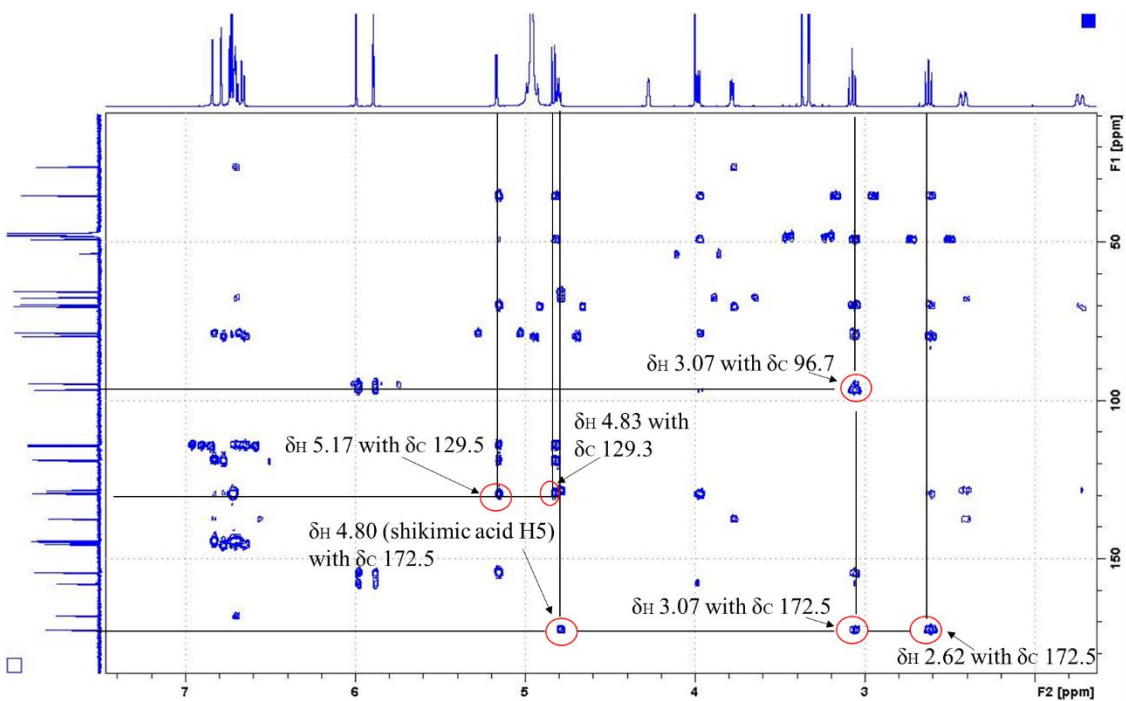


Fig. 2-3-12 HMBC spectrum of Comp.3 (expanded)

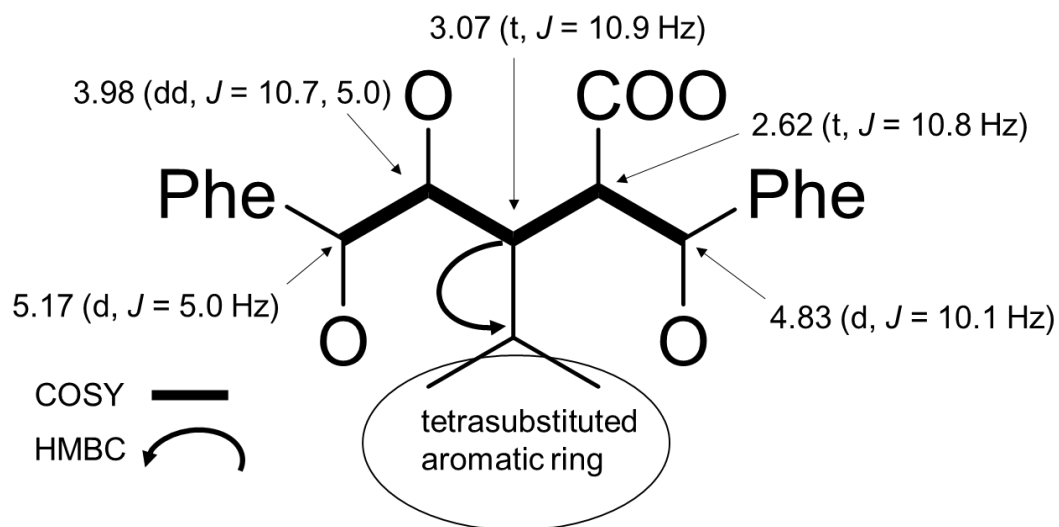


Fig.2-3-13 Partial structure and $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of Comp.3

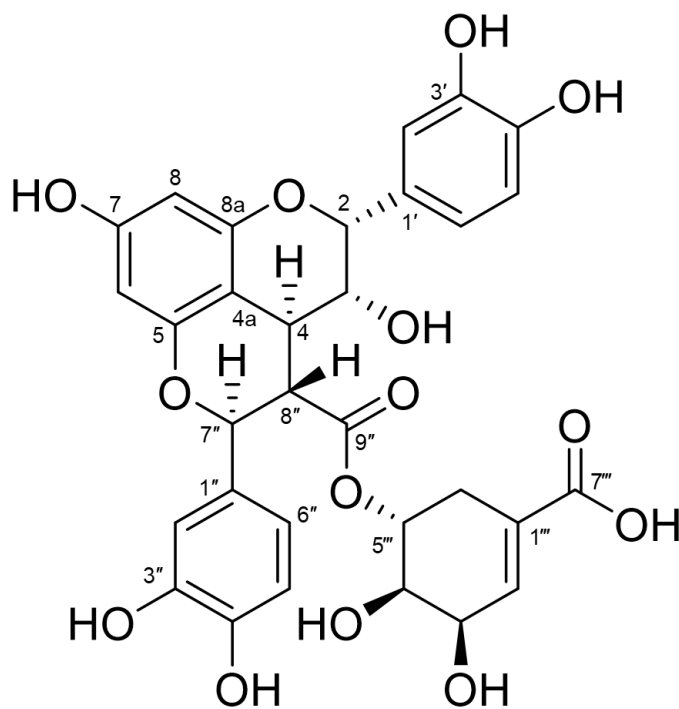


Fig. 2-3-14 Structure of Comp.3

Table 2-3-3. ¹³C-NMR and ¹H-NMR data of Comp.3 in CD₃OD

Position	Comp.3		brainicin ^{a)}	
	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)
2	78.8	5.17 (d, 5.0)	80.2	5.14 (d, 5.0)
3	69.9	3.98 (dd, 10.7, 5.0)	71.3	3.97 (dd, 10.7, 5.0)
4	35.4	3.07 (t, 10.9)	36.9	3.05 (t, 10.8)
4a	96.7		98.1	
5	154.5		155.9	
6	94.7	5.89 (d, 2.3)	96.1	5.88 (d, 2.0)
7	158.0		159.4	
8	94.6	5.99 (d, 2.3)	96.1	5.98 (d, 2.0)
8a	154.3		155.7	
1'	129.5		130.9	
2'	114.0	6.84 (d, 2.0)	115.5	6.82 (d, 1.5)
3'	144.5		145.9	
4'	144.3		145.7	
5'	114.6	6.73 (d, 8.2)	116.0	6.71 (d, 7.5)
6'	118.8	6.70 (dd, 8.2, 2.0)	120.3	6.67 (dd, 7.5, 1.5)
1''	129.3		130.7	
2''	114.1	6.79 (d, 2.0)	115.6	6.77 (d, 2.0)
3''	145.6		147.0	
4''	144.8		146.2	
5''	114.4	6.73 (d, 8.1)	115.8	6.71 (d, 8.0)
6''	119.1	6.66 (dd, 8.1, 2.0)	120.5	6.64 (dd, 8.0, 2.0)
7''	79.8	4.83 (d, 10.1)	81.2	4.81 (d, 10.0)
8''	49.2	2.62 (t, 10.8)	50.4	2.61 (d, 10.6)
9''	172.5		173.9	
1'''	128.5		130.4	
2'''	137.5	6.71 (br s)	138.4	6.67 (overlapped)
3'''	65.6	4.27 (br s)	67.0	4.25 (br s)
4'''	67.6	3.78 (dd, 6.7, 4.1)	69.1	3.75 (dd, 7.0, 4.0)
5'''	70.4	4.80 (dt, 6.7, 4.7)	71.8	4.79 (dt, 7.0, 5.0)
6'''	26.3	2.42 (br dt, 18.6, 2.4) 1.74 (br dt, 18.6, 1.7)	28.0	2.40 (br dt, 18.6, 2.4) 1.71 (br d, 18.6)
7'''	168.2		170.0	

^{a)} Reference [100]

Comp.7、Comp.10、Comp.11

Comp.7、Comp.10、Comp.11 は TLC 上希硫酸噴霧加熱条件にて黄色いスポットを与え、HRESIMS からいずれも分子式 $C_{16}H_{17}O_8$ が示された。 1H -NMR より 1, 3, 4-置換ベンゼンのシグナル(いずれも δ_H 7.05, 6.98, 6.80 付近)、*trans*-オレフィンのシグナル(いずれも δ_H 7.65, 6.36 付近)、shikimic acid 由来のシグナル(δ_H 6.90 付近及び 5.70-2.30)が認められた。HMBC スペクトル上で 2-H 及び 6-H のプロトンと *trans*-オレフィンに相関が見られたことから、Comp.7、Comp.10、Comp.11 はいずれも *trans*-caffeic acid と shikimic acid が結合した化合物であることが推定された。さらに 1H -NMR において shikimic acid 由来と推定されるシグナルについて、Comp.7 は 5-H、Comp.10 は 4-H、Comp.11 は 3-H の低磁場への移動が認められ (Fig. 2-3-15。赤丸で囲われたプロトンシグナル。)、また HMBC スペクトル上でのカルボニル炭素と shikimic acid のプロトンとの間に相関がみられたことから (Comp.7 は 5-H、Comp.10 は 4-H、Comp.11 は 3-H)、それぞれ shikimic acid との異なる場所とのエステル結合が示唆された。

以上の結果から、Comp.7、Comp.10、Comp.11 はそれぞれ 5-*O*、4-*O*、3-*O*-caffeoylshikimic acid であることが予想された。5-*O*、4-*O*-caffeoylshikimic acid は文献値[102, 103]とよく一致しており、3-*O*-caffeoylshikimic acid については文献値は確認されなかったものの NMR シグナルの相関が認められたことから決定した (Fig. 2-3-16)。各シグナルの帰属結果を Table 2-3-4 に示す。

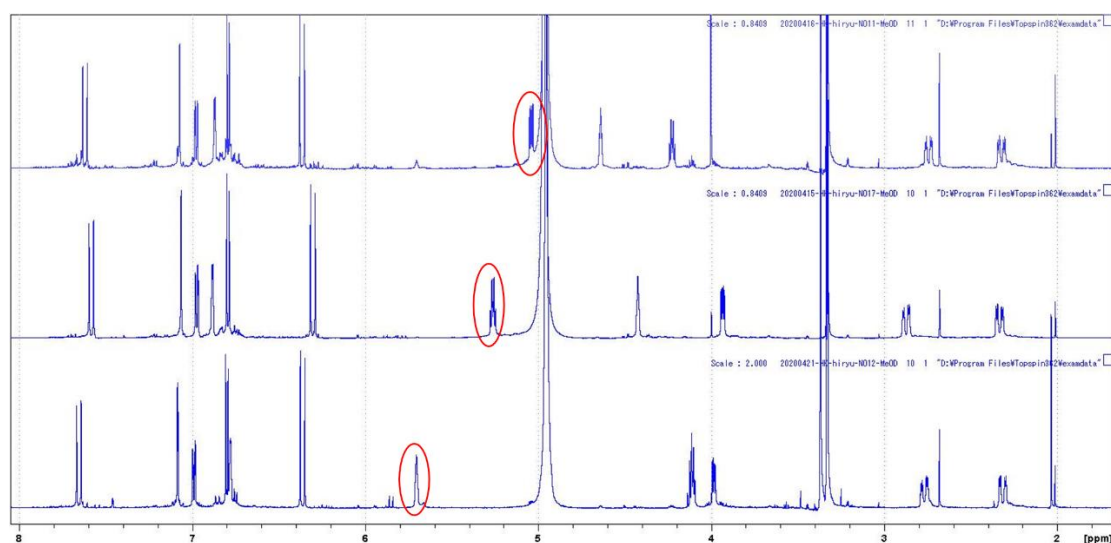


Fig. 2-3-15 1H -NMR spectrums of Comp 7, Comp 10, Comp 11

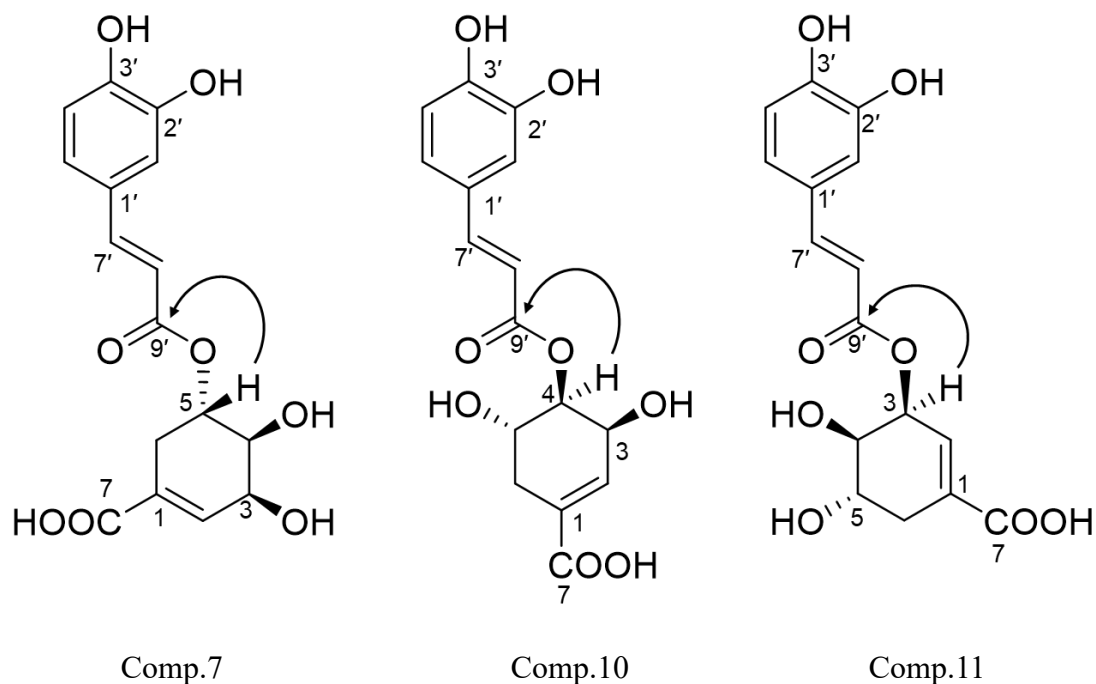


Fig. 2-3-16 Key correlations of HMBC of Comp.7, Comp.10, Comp.11

Table 2-3-4. ^{13}C -NMR and ^1H -NMR data of Comp. 7, Comp. 10, Comp. 11 in CD_3OD

Position	Comp. 7		Comp. 10		Comp. 11	
	δc	δH (J in Hz)	δc	δH (J in Hz)	δc	δH (J in Hz)
1	132.8		129.6		131.2	
2	136.8	6.88 (br t, 1.8)	136.9	6.87 (br t, 1.9)	133.5	6.78 (br d, 2.4)
3	67.5	4.42 (br t, 3.7)	64.2	4.64 (br t, 3.9)	69.2	5.70 (br s)
4	71.6	3.93 (dd, 7.6, 4.1)	73.5	5.04 (dd, 7.8, 4.2)	69.0	3.98 (dd, 6.7, 3.8)
5	70.5	5.26 (dt, 7.5, 5.3)	64.4	4.22 (dt, 7.7, 5.5)	67.3	4.11 (m)
6	30.0	2.87 (br dd, 18.4, 5.1) 2.33 (br dd, 18.4, 5.5)	30.7	2.73 (br dd, 18.4, 5.1) 2.32 (br dd, 18.4, 5.7)	29.8	2.77 (br dt, 18.5, 2.4) 2.31 (br dd, 18.4, 4.7)
7	169.9		168.3		168.2	
1'	127.9		126.4		126.3	
2'	115.3	7.06 (d, 2.0)	113.7	7.07 (d, 2.0)	113.7	7.08 (d, 2.0)
3'	146.7		145.8		145.4	
4'	149.6		145.4		148.3	
5'	116.7	6.79 (d, 8.2)	115.0	6.79 (d, 8.2)	115.0	6.80 (d, 8.2)
6'	122.9	6.97 (dd, 8.2, 2.0)	121.6	6.98 (dd, 8.3, 2.0)	121.7	6.99 (dd, 8.3, 2.0)
7'	147.2	7.58 (d, 15.8)	148.2	7.62 (d, 15.9)	146.1	7.65 (d, 15.9)
8'	115.4	6.30 (d, 15.8)	113.7	6.36 (d, 15.9)	113.4	6.36 (d, 15.9)
9'	168.7		167.5		167.1	

Comp.6

Comp.6 は HRESIMS より分子式 $C_7H_6O_4$ が示された。 ^{13}C -NMR より 1 つのカルボニル基 (δ_C 167.8)、1 つの芳香環 (δ_C 150.4, 145.3, 122.3, 122.1, 117.0, 115.6) の存在が推定された。また、 1H -NMR より 1, 2, 4-置換ベンゼン [δ_H 7.34 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.29 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)] の存在が推定された。これらの結果と文献値[104]から、Comp.6 は protocatechuic acid と決定した (Table 2-3-5, Fig. 2-3-17)。

Table 2-3-5. ^{13}C -NMR and 1H -NMR data for
Comp.6 in DMSO- d_6

Position	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	122.1	
2	117.0	7.34 (1H, d, 2.0)
3	145.3	
4	150.4	
5	115.6	6.78 (1H, d, 8.2)
6	122.3	7.29 (1H, dd, 8.2, 2.1)
7	167.8	

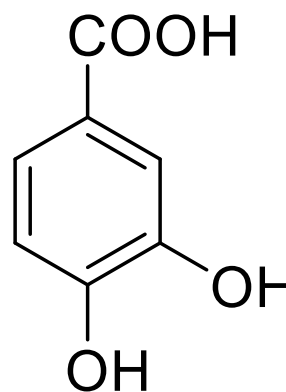


Fig. 2-3-17 Structure of Comp.6

Comp.8

Comp.8 は HRESIMS の測定結果より分子式 $C_{15}H_{18}O_8$ が推定された。 1H -NMR より *trans*-オレフィン [δ_H 8.13 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 6.55 (1H, d, $J = 16.2$ Hz)], 1, 2-置換ベンゼン [δ_H 7.65 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz), 7.39 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.27 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.08 (1H, t, $J = 7.8$ Hz)], 糖 [δ_H 5.01 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 3.91 (1H, dd, $J = 12.1, 2.0$ Hz), 3.73 (1H, dd, $J = 12.1, 5.3$ Hz), 3.59 (1H, m), 3.50 (1H, m), 3.48 (1H, m), 3.44 (1H, m)]の存在が推定された。 ^{13}C -NMR より 1 つのカルボニル基 (δ_C 169.9)、糖の種類が glucose (δ_C 101.0, 76.9, 76.7, 73.5, 69.9, 61.1) であることが推定された。また、glucose のアノマー位に該当するプロトンのシグナルのカップリング定数 [δ_H 5.01 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)] から、本化合物の glucose は β アノマーであることも推定された。

文献値[105]とも一致したことから、Comp.8 は *trans*-melilotoside であると決定した (Table 2-3-6, Fig. 2-3-18)。

Table 2-3-6. ^{13}C -NMR and 1H -NMR data for Comp.8 in CD_3OD

Position	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	124.1	
2	156.1	
3	115.5	7.27 (1H, d, 7.8)
4	131.3	7.39 (1H, t, 7.8)
5	122.2	7.08 (1H, t, 7.8)
6	127.4	7.65 (1H, dd, 7.8, 1.6)
7	139.7	8.13 (1H, d, 16.2)
8	118.5	6.55 (1H, d, 16.2)
9	169.9	
1'	101.0	5.01 (1H, d, 7.8)
2'	73.5	3.59 (1H, m)
3'	76.7	3.50 (1H, m)
4'	69.9	3.44 (1H, m)
5'	76.9	3.48 (1H, m)
6'	61.1	3.91 (1H, dd, 12.1, 2.0) 3.73 (1H, dd, 12.1, 5.3)

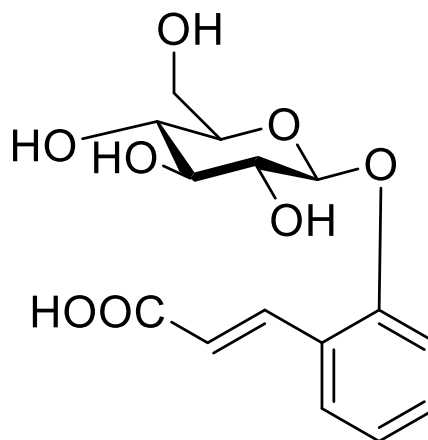


Fig. 2-3-18 Structure of Comp.8

Comp.9

Comp.9はTLC希硫酸噴霧加熱条件で灰色のスポットを与えた。HRESIMSの測定値より分子式 $C_{15}H_{18}O_9$ が推定された。 1H -NMRより *trans*-オレフィン [δ_H 8.33 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.34 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)], 1, 2, 3-置換ベンゼン [δ_H 7.11 (1H, dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz), 6.96 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 6.84 (1H, dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz)], 糖 (δ_H 4.47-3.16) の存在が示唆された (Fig. 2-3-19)。また ^{13}C NMR よりカルボニル基の存在 (δ_C 170.1)、糖の種類は glucose であることが示唆された (δ_C 106.2, 77.2, 76.4, 74.1, 69.6, 61.2) (Fig. 2-3-20)。さらに 1H -NMR において glucose のアノマー位水素 (δ_H 4.47) のカップリング定数が $J = 7.9$ Hz だったことから、本化合物の glucose は β アノマーであることが推定された。

そこで糖の種類を確認するため、本化合物 1.1mg を 3% HCl で加水分解し、得られた糖部分について旋光度検出器を用いた HPLC (HPLC-OR)、及びトリメチルシリル化後の糖については GC-MS 測定に供した。その結果、分離した糖は HPLC-OR の結果より正の旋光性を示し、保持時間は HPLC-OR、GC-MS のいずれにおいても標準品の D-glucose と一致したことから、構成糖は D-glucose であると確定した (測定条件等については p.130-131 参照)。

各部分構造の配置については HMBC 及び NOESY スペクトルより考察した。まず HMBC の相関スペクトルより、glucose アノマー位水素と *trans*-オレフィンの水素がベンゼン環の 2-C と相関が認められたことから glucose は置換ベンゼンの 2 位の水酸基と結合していることが示唆された (Fig. 2-3-21)。更に NOESY スペクトルを確認したところ、glucose のアノマー位水素と *trans*-オレフィンの 7-H、ベンゼン環上 6-H と *trans*-オレフィンの 8-H との相関が認められた (Fig. 2-3-22)。この結果より、*trans*-オレフィンはフェニル基上の 6-H と glucose とに挟まれており、さらにフェニル基は 1, 2, 3-置換ベンゼンの部分構造を持つことから glucose の結合位置を 2 位と確定した。以上の結果から 2-O-(β -D-glucopyranosyl)-2,3-dihydroxycinnamic acid と決定した (Fig. 2-3-23, 24)。本化合物は新規化合物であった。

本化合物の母核となっている 2,3-dihydroxycinnamic acid は単離例が非常に少ない。菌類の代謝産物としての報告がある他 [106]、植物からはローマカミツレ (*Anthemis nobilis*)、サジオモダカ (*Alisma orientale*) の種子から単離された報告があるのみであ

った[107, 108]。本研究で使用しているサンプルはシダの根茎であり、土壌と接している部分や朽ちた部分も一部含まれている。そのため本化合物はシダ由来である場合と菌類由来である場合の両方の可能性が考えられるが、2 位に glucose が結合している配糖体は本化合物が初となる。

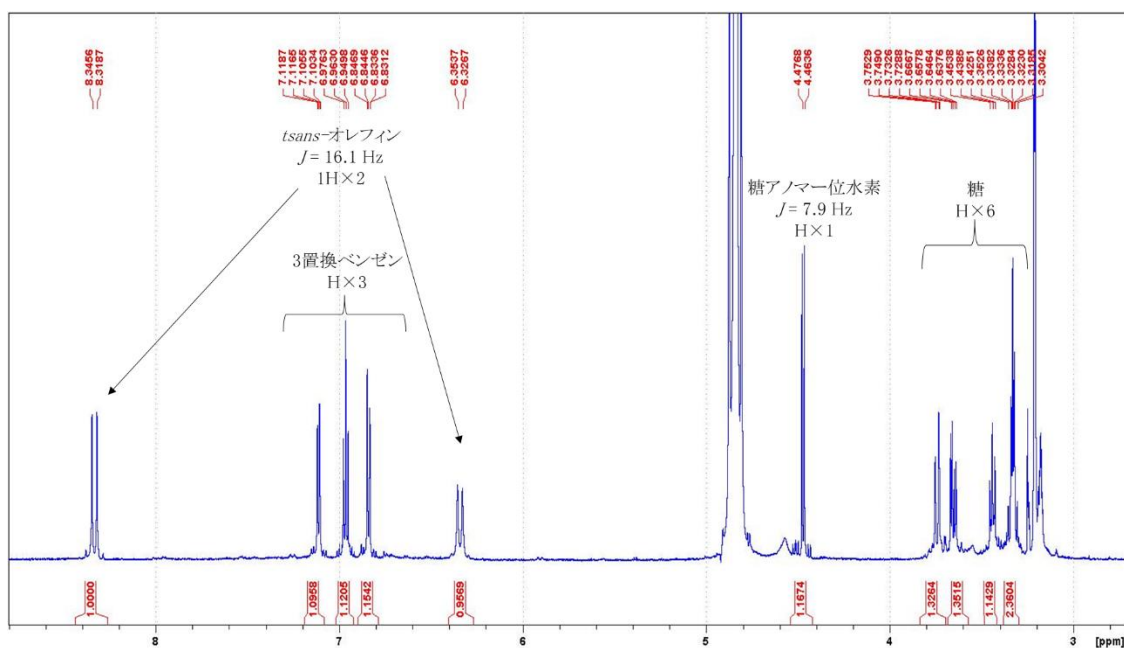


Fig. 2-3-19 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Comp. 9

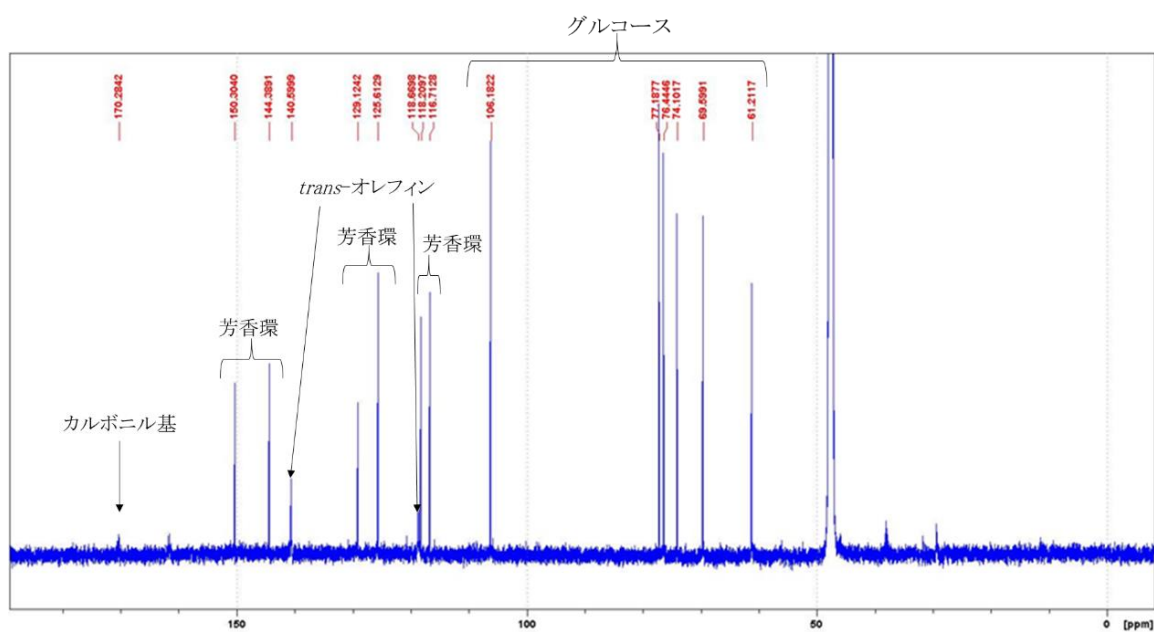


Fig. 2-3-20 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of Comp. 9

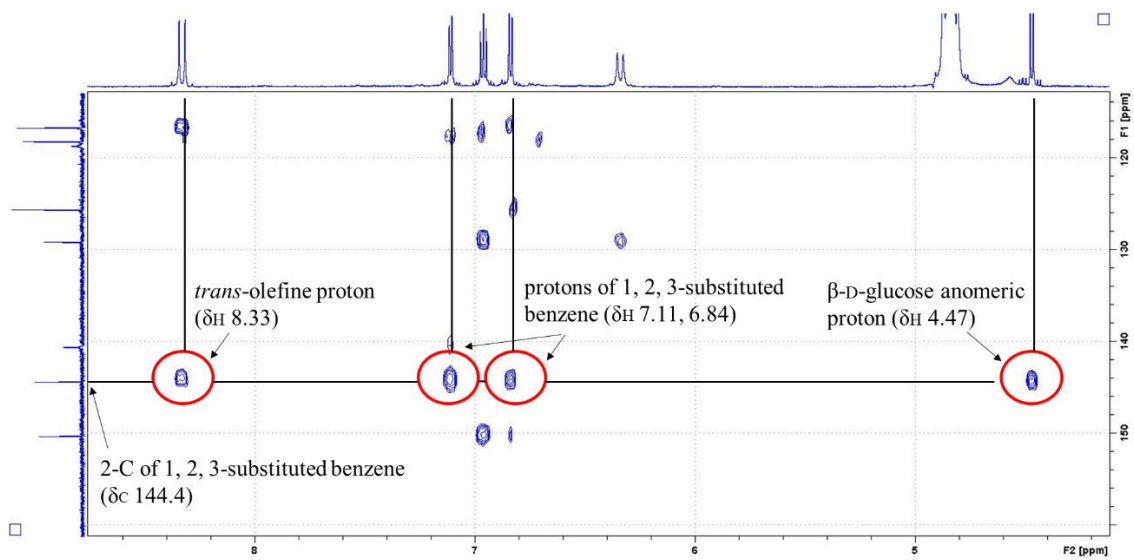


Fig. 2-3-21 HMBC spectrum of Comp.9 (expansion)

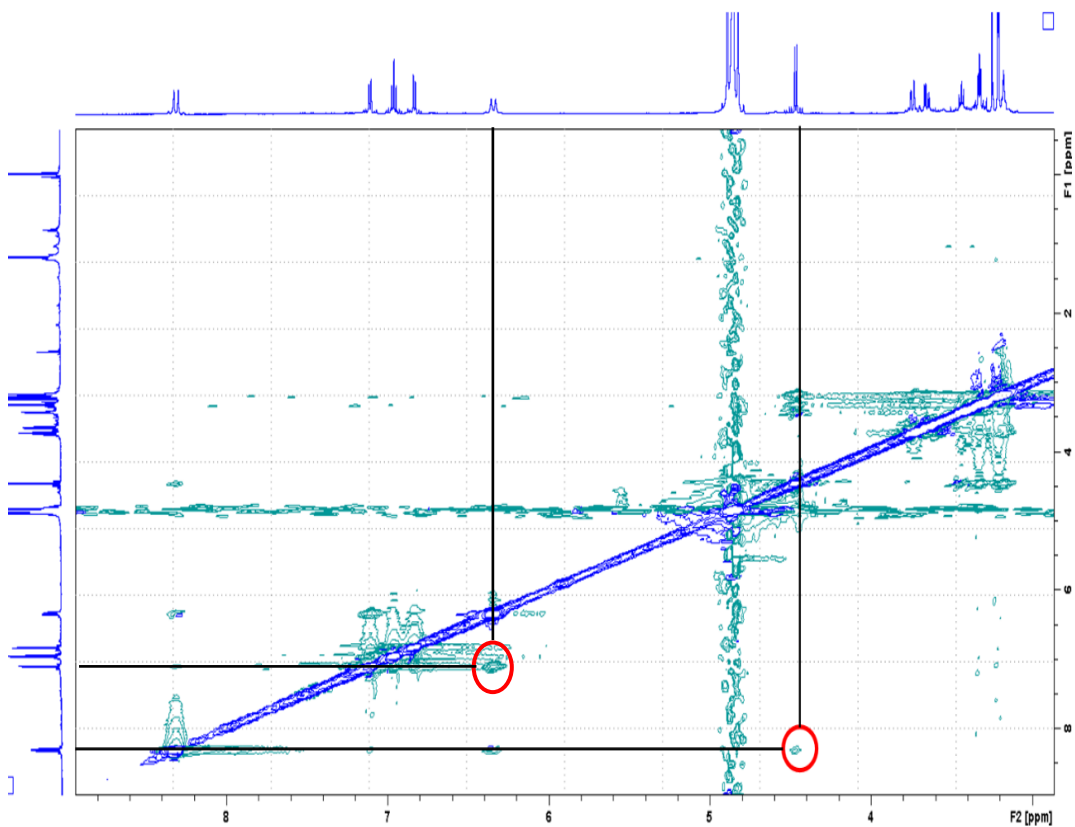


Fig. 2-3-22 NOESY spectrum of Comp.9

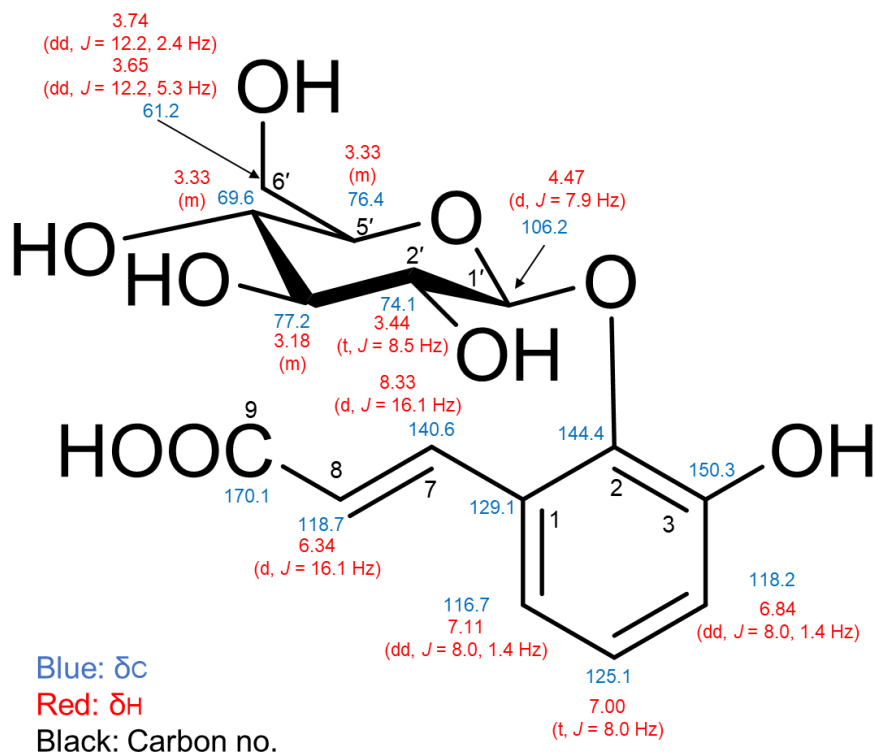


Fig. 2-3-23 Structure and chemical shifts of Comp.9

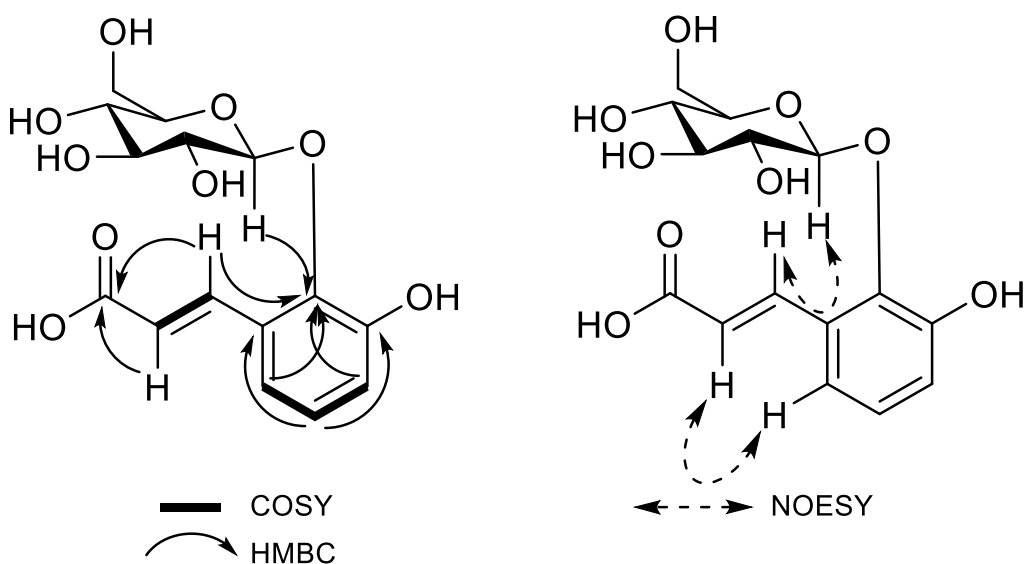


Fig. 2-3-24 Key correlations of HMBC, COSY, NOESY of Comp.9

Comp.12

Comp.12 は TLC 上で希硫酸噴霧加熱時にオレンジ色のスポットを与え、HRESIMS より分子式 $C_{26}H_{24}O_{12}$ が示された。 1H -NMR のスペクトルから *trans*-オレフィン [δ_H 7.74 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)], 1, 2, 4-置換ベンゼン [δ_H 6.78 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.72 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz)]及びオルト位同士のカップリング(1, 2, 3, 4-置換ベンゼン) [δ_H 7.22 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.84 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)]を示すプロトン、shikimic acid [δ_H 6.34 (1H, m), 5.25 (1H, dt, $J = 7.6, 5.4$ Hz), 4.30 (1H, br, s), 3.91 (1H, dd, $J = 7.6, 4.2$ Hz), 2.75 (1H, br dd, $J = 18.4, 5.3$ Hz), 2.29 (1H, br dd, $J = 18.4, 5.5$ Hz)], メキシ基 [δ_H 3.74 (3H, s)]の存在が示唆された (Fig. 2-3-25)。 ^{13}C -NMR スペクトルからは 3 つのカルボニル基 (δ_C 171.3, 169.5, 166.7) の存在が示唆された (Fig. 2-3-26)。さらに 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、COSY、HMBC スペクトルの解析から本化合物には 3 級 sp^3 炭素 2 つから成る部分構造 (δ_C 86.9, 55.8) が示唆され、-(O)CH-CH-の構造が示唆された。また HMBC スペクトルよりこの部分構造は 1, 2, 3, 4-置換ベンゼンと相関がみられたことから (Fig. 2-3-27)、本化合物には 1-ベンゾフラン骨格の存在が示唆された。更に HMBC スペクトルから 1, 2, 3, 4-置換ベンゼンには *trans*-オレフィンが結合し、2 つの 3 級 sp^3 炭素から成る部分構造はそれぞれ 1, 2, 4-置換ベンゼンとカルボニル基が結合していることが示唆された。この構造は、リグナン系化合物である blechnic acid の構造異性体である、epiblechnic acid に類似していることが推察された。blechnic acid 類については Wada らが、7-H/8-H が *cis* となる blechnic acid、*trans* となる epiblechnic acid をシシガシラ科植物の地上部から単離しており (Fig. 2-3-28)、 1H -NMR における CD_3OD 中の 7-H/8-H のカップリング定数を blechnic acid で $J = 9.2$ Hz、epiblechnic acid で $J = 4.9$ Hz と報告している [86]。Comp.12 には [δ_H 5.96 (1H, d, $J = 4.1$ Hz), 4.46 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)]のシグナルが観測されたことから、基本骨格は epiblechnic acid であることが予想された。

Comp.12 の他の部分構造については HMBC スペクトルより検討した。メキシ基 [δ_C 51.1, δ_H 3.74 (3H, s)]のプロトンは shikimic acid の 7-C のカルボニル基 (δ_C 171.3) と相関がみられたことからメチルエステルの存在が推定された。同様に epiblechnic acid の 9C カルボニル基 (δ_C 166.7) と shikimic acid 5C のプロトン [δ_C 5.25 (1H, dt, $J = 7.6, 5.4$ Hz)]に HMBC の相関がみられたことから、shikimic acid は epiblechnic acid の C-9 にエステル結合していることが推定された。

epiblechnic acid の 7-H と 8-H の絶対配置については 7*R*, 8*R* (7-epiblechnic acid に相当) と 7*S*, 8*S* (8-epiblechnic acid に相当) の 2 種が報告されており、CD スペクトルでは 7-epiblechnic acid は 230-250 nm で負のコットン効果を、8-epiblechnic acid は正のコットン効果を示すことが報告されている[109, 110]。分子内のカルボン酸部分に置換基がついた monardic acid A, B や lithospermic acid の場合もそれぞれ同様のコットン効果を示すことが報告されている (Fig. 2-3-29-1, 2) [105-107]。Comp.12 は CD スペクトルの測定の結果、227 nm ($\Delta\epsilon - 6.56$) 及び 243 nm ($\Delta\epsilon - 6.22$) で負のコットン効果を示したことから (Fig. 2-3-30)、7*R*, 8*R* の構造を持つと決定した。本化合物は brainic acid の 7 エピマーに相当する構造を持つことから 7''-methyl 7-epibrainate と命名した (Fig. 2-3-31, 32)。本化合物は新規化合物であった。なお、shikimic acid 7-C のメチル化については、ヒリュウシダの抽出に MeOH を用いていることから溶媒由来のアーティファクトである可能性があるものの、brainic acid の 7-エピマー構造を持つ化合物の単離報告は初となる。

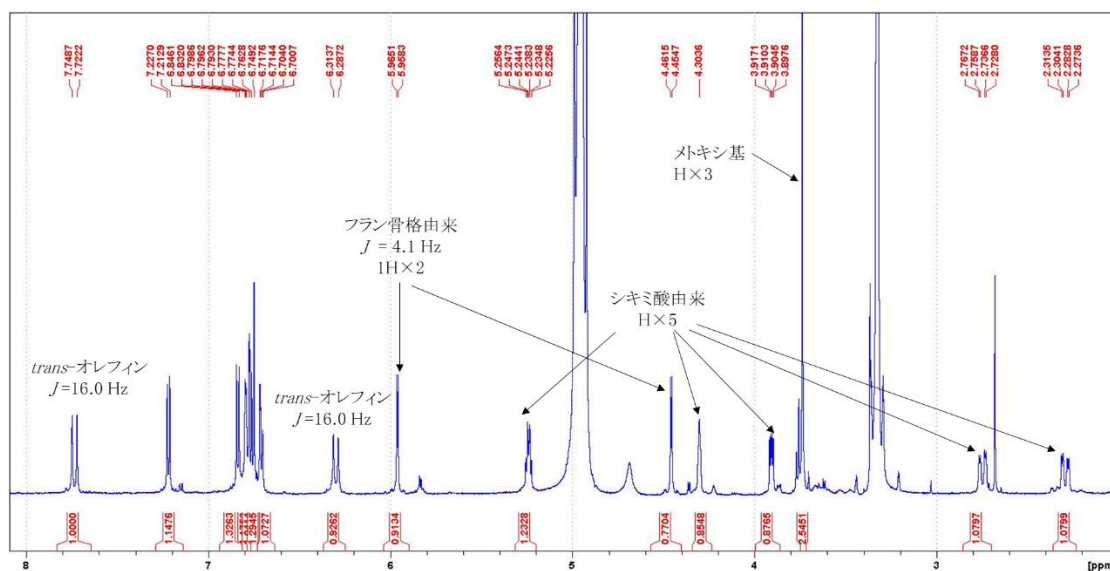


Fig. 2-3-25 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Comp. 12

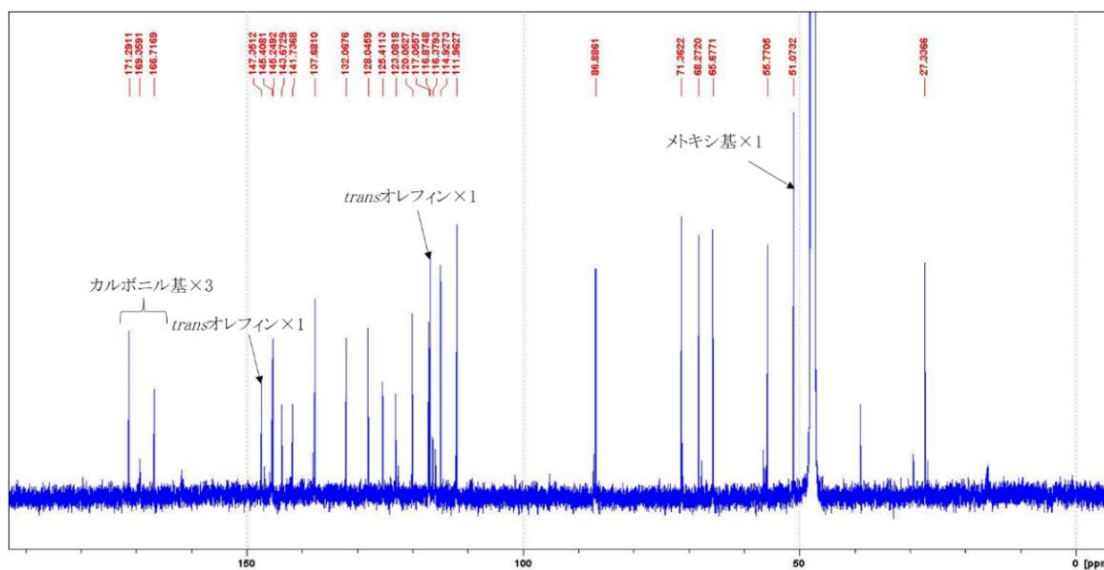


Fig. 2-3-26 ^{13}C -NMR spectrum of Comp. 12

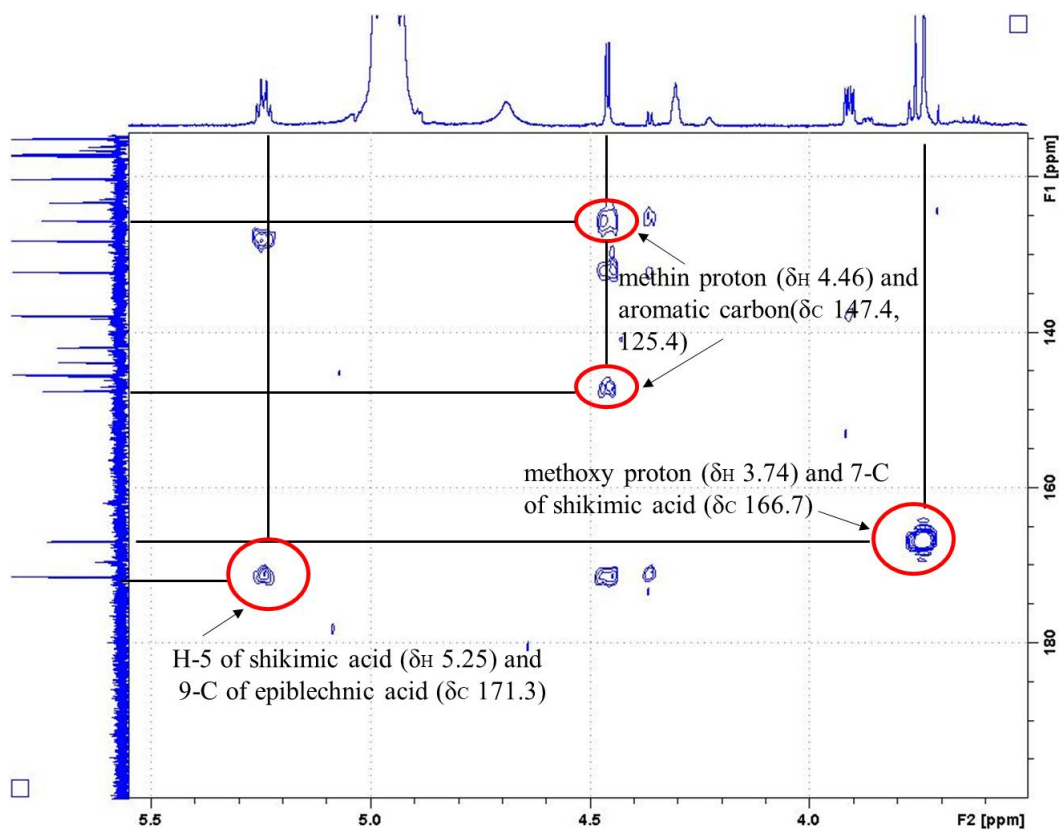


Fig. 2-3-27 HMBC spectrum of Comp.12 (expansion)

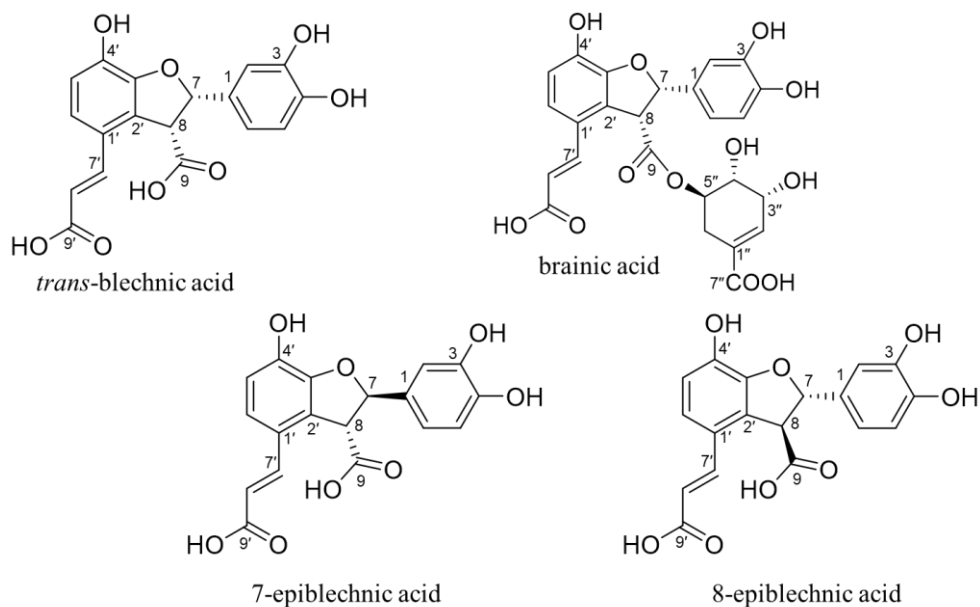
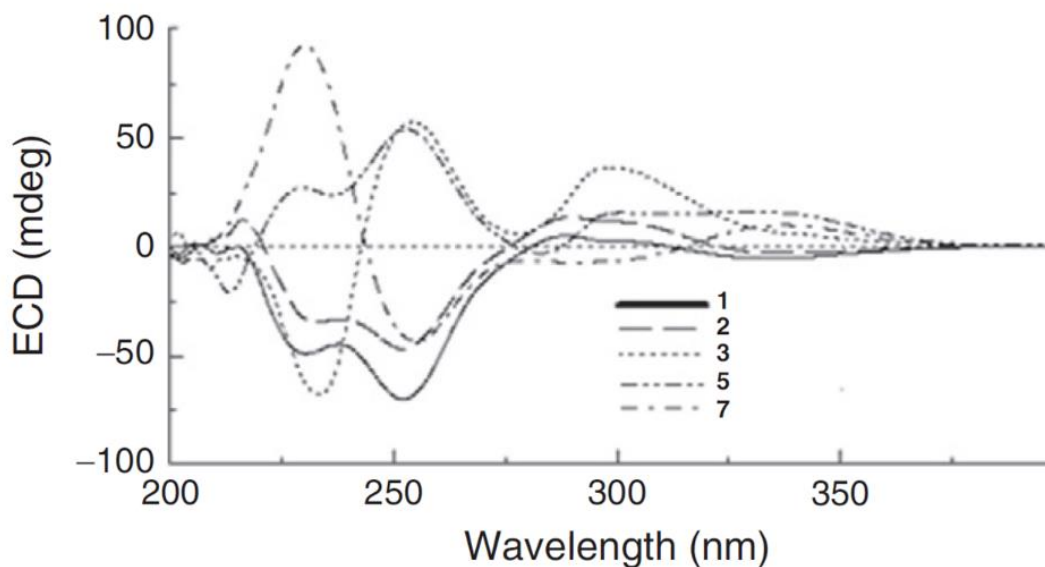


Fig. 2-3-28 Lignan compounds from Blechnaceae



Reprinted from *Fitoterapia*, 91, T. Murata, K Oyama, M Fujiyama, *et al.* Diastereomers of lithospermic acid and lithospermic acid B from *Monarda fistulosa* and *Lithospermum erythrorhizon*, 51-58., Copyright (2013), with permission from Elsevier

Fig. 2-3-29 ECD spectra of monardic acids and lithospermic acids

The number in the figure indicate as follows; 1, monardic acid A; 2, monardic acid B; 3, monardic acid C; 5, lithospermic acid A; 7, lithospermic acid C. See Fig. 2-3-29-1 for the structures of 1-7.

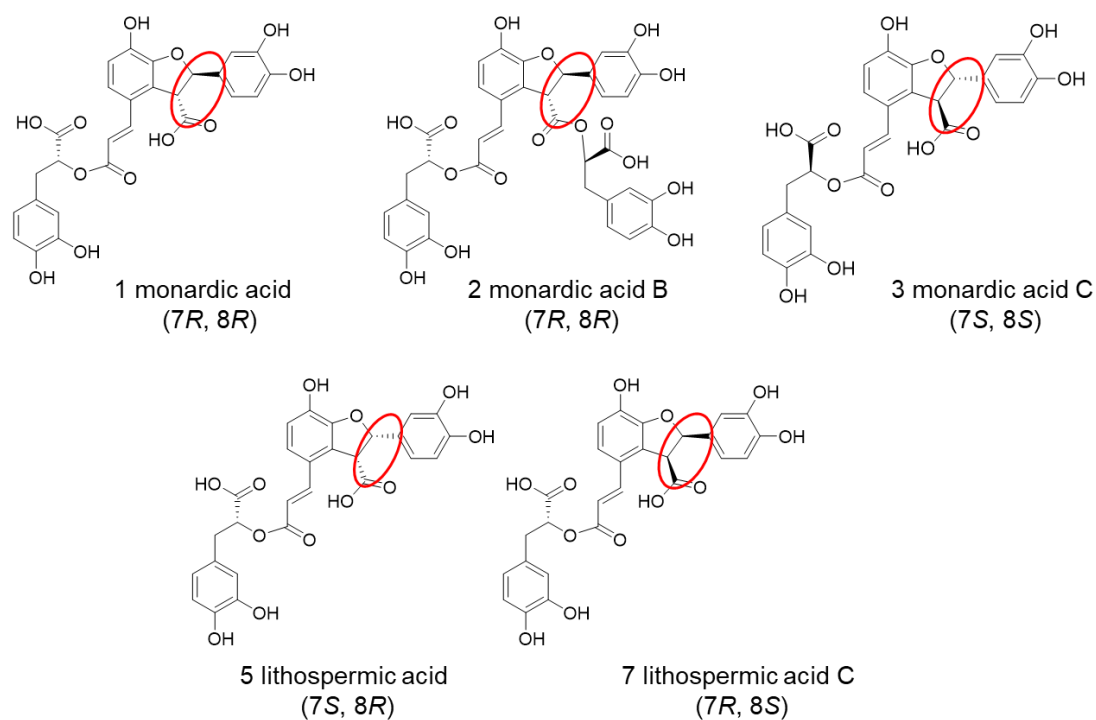


Fig. 2-3-29-1 Structures of 1-7

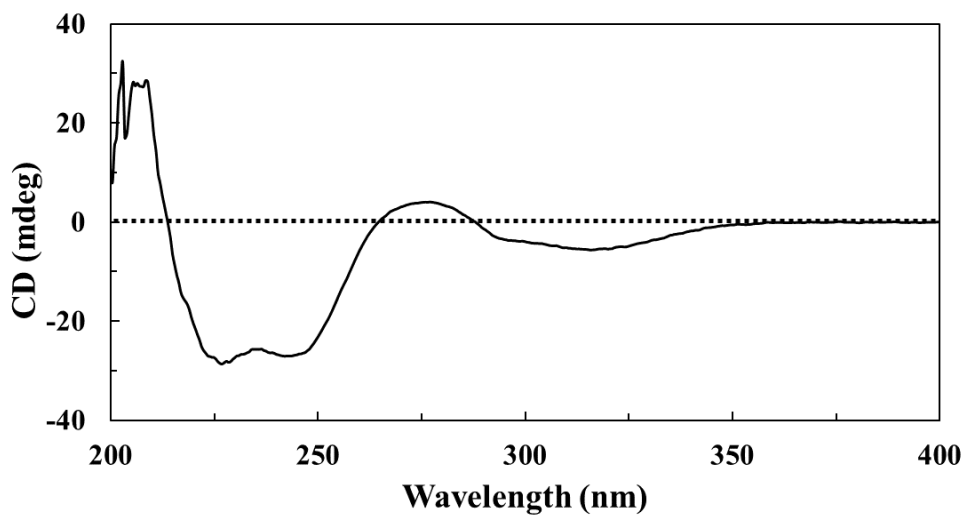


Fig. 2-3-30 CD spectrum of Comp. 12

Measurement condition were as follows: temperature, 25 °C; solvent, MeOH;
concentration, 0.07 mg /mL

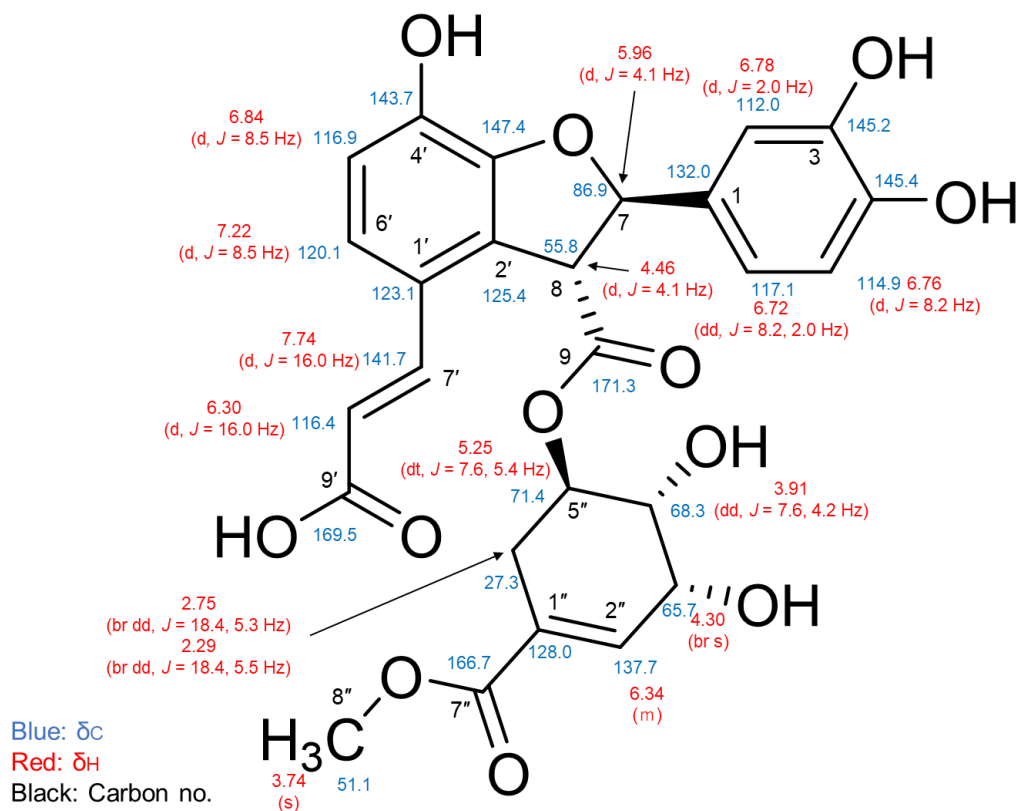


Fig. 2-3-31 Structure and chemical shifts of Comp.12

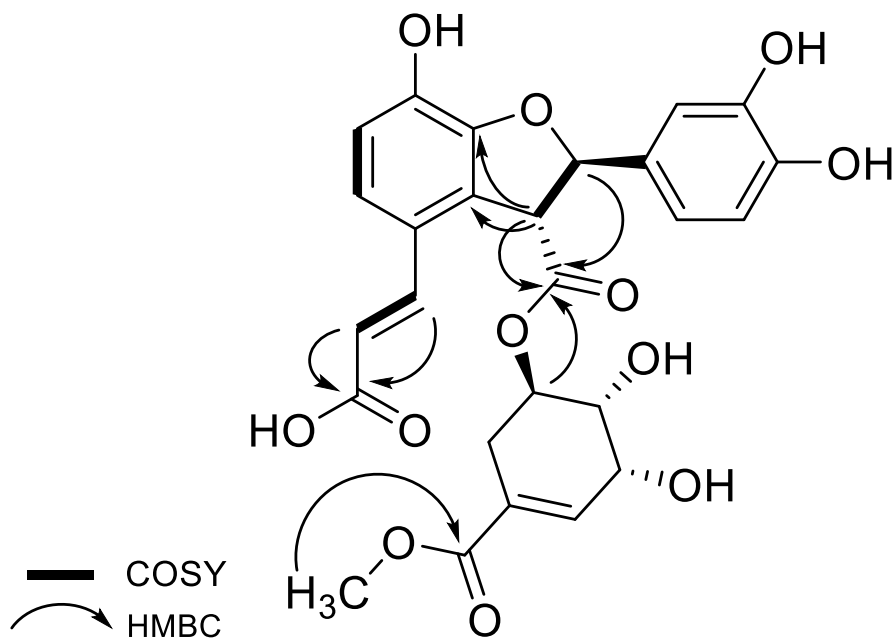


Fig. 2-3-32 Key correlations of HMBC, COSY of Comp.12

Comp.13, Comp.14, Comp.15

Comp.13、Comp.14、Comp.15 はいずれも TLC 上希硫酸噴霧加熱条件にてオレンジ色のスポットを与えた。HRESIMS の測定結果より Comp.13 と 15 は分子式 $C_{18}H_{14}O_8$ 、Comp.14 は分子式 $C_{25}H_{22}O_{12}$ であることが示唆された。

Comp.13、Comp.14、Comp.15 は 1H -NMR のケミカルシフトから *trans*-オレフィン [δ_H 7.5 及び 6.3 付近]、1,2,4-置換ベンゼン [δ_H 6.7-6.8 付近]、及びオルト位同士のプロトンのカップリング (1,2,3,4-置換ベンゼン) [δ_H 7.3 及び 6.8 付近]、一方に酸素原子が結合した 2 つの 3 級 sp^3 炭素からなる部分構造を示すプロトンの存在が示唆された。Comp.14 については更に shikimic acid の存在が推定された。また ^{13}C -NMR スペクトルから Comp.13 と Comp.15 は 2 本の、Comp.14 は 3 本のカルボニル基を示すシグナルが検出された。これらのシグナルから判断し、Comp.13、14、15 は Comp.12 と同様 blechnic acid 類であることが予想された。

Comp.13 は前述の Comp.12 と共通の骨格を持つが、shikimic acid とメキシ基にあたるシグナルが見られなかったことから、epiblechnic acid であることが予想された。epiblechnic acid は Wada らより 7-エピ体の 7-epiblechnic acid と 8-エピ体 8-dpiblechnic acid の 2 種が単離されており、それぞれ比旋光度は $[\alpha]_D^{21}$ -145、 $[\alpha]_D^{21}$ +142 と報告されている[86]。今回単離した Comp.13 は比旋光度測定の結果、 $[\alpha]_D^{21}$ - 101.6 (*c* 1.0, MeOH)と負の値を示したことから、7-epiblechnic acid であることが判明した。Wada らの報告ではヒリュウシダの地上部からは 8-epiblechnic acid のみが単離されており、他のヒリュウシダ属の植物の地上部からは 7-epiblechnic acid のみが単離されている[86]。しかしタンジンの根のエキスからは 7-epiblechnic acid と 8-epiblechnic acid 両方の単離が報告されている例もある[111]。今回の結果、部位は異なるもののヒリュウシダ中にも両化合物が存在していることが判明した。

Comp.14 と Comp.15 は ^{13}C -NMR のシグナルより Comp.12 及び Comp.13 と共通の骨格を持つが、H-7/H-8 のカップリング定数が $J = 9.8$ Hz を示したことから、blechnic acid 構造を持つことが予想された。更に Comp.14 は shikimic acid の 5-H と blechnic acid 9-C のカルボニル基との間に HMBC 相関が見られたことから、Comp.15 は *trans*-blechnic acid の shikimic acid エステル体である brainic acid、Comp.14 は *trans*-blechnic acid であると推定された。

Comp.13、Comp.14、Comp.15 のシグナルの帰属及び構造式を Table 2-3-7, 2-3-8,

Fig. 2-3-33 に示す。acetone- d_6 における ^{13}C -NMR のシグナル値は Wada らのデータとよく一致した (Table 2-3-7)。なお本文献には CD_3OD における ^{13}C -NMR のデータの記載はないが、スペクトル値は acetone- d_6 中のデータと大きな違いは見られなかった (Table 2-3-8)。以上の結果から Comp.13 を 7-epiblechnic acid、Comp.14 を brainic acid、Comp.15 を *trans*-blechnic acid と決定した。Comp.14 の brainic acid は Comp.12 の 7-エピマーから 7"-C のメチル基をなくした化合物である。

blechnic acid 類はヒリュウシダの他シシガシラ科ソテツワラビ (*Brainea insignis*)、イノモトソウ科ワラビ (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*)、シソ科タンジン (*Salvia miltiorrhiza*) から単離されている [99, 111, 112]。

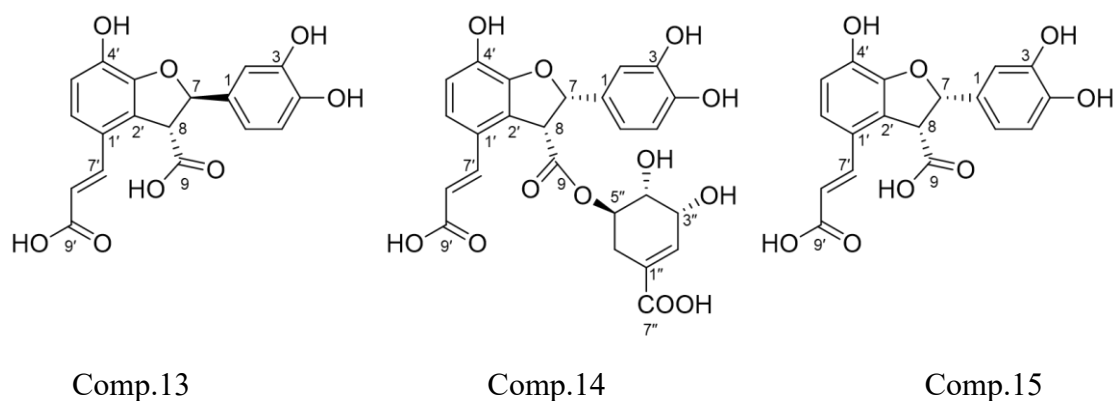


Fig. 2-3-33 Structures of Comp.13, 14, 15

Table 2-3-7. ^{13}C -NMR data for Comp.13, 14, 15 in acetone- d_6

Position	Comp.13	epiblechnic acid ^a	Comp.14	brainic acid ^a	Comp.15	<i>trans</i> -blechnic acid ^a
1	132.5	133.8	127.9	129.3	128.2	129.5
2	112.5	113.8	113.9	115.1	114.0	115.2
3	145.3	146.4	144.8	146.0	144.6	145.8
4	145.4	146.6	145.4	146.5	145.1	146.3
5	115.3	116.6	115.0	116.4	114.7	116.0
6	117.3	118.6	118.3	119.6	118.6	119.9
7	87.1	88.4	86.4	87.6	86.8	88.0
8	55.8	57.1	53.7	55.0	53.5	54.8
9	172.0	173.5	168.5	169.9	170.0	171.7
1'	123.7	125.0	123.2	124.4	123.3	124.5
2'	126.2	127.5	127.4	128.7	128.2	129.4
3'	147.5	148.8	148.2	149.5	148.2	149.4
4'	143.4	144.7	143.7	145.1	143.7	145.0
5'	117.3	118.6	117.2	118.5	117.0	118.4
6'	120.3	121.7	121.7	123.2	121.3	122.7
7'	141.6	143.2	141.3	143.1	141.5	143.1
8'	116.7	117.8	117.0	118.1	116.8	117.8
9'	167.0	169.0	167.0	169.3	167.0	169.2
1''			127.5	128.7		
2''			138.9	140.2		
3''			65.4	66.8		
4''			66.5	67.8		
5''			70.5	71.7		
6''			25.8	27.1		
7''			167.0	169.0		

^a) Reference [86]

Table 2-3-8. ¹³C-NMR and ¹H-NMR data for Comp.13, 14, 15 in CD₃OD

Position	Comp.13		Comp.14		Comp.15	
	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)
1	132.4		127.7		128.2	
2	111.9	6.80 (1H, d, 2.0)	113.5	6.92 (1H, d, 1.8)	114.0	6.98 (1H, d, 2.0)
3	145.2		144.8		144.6	
4	145.4		145.3		145.1	
5	114.9	6.77 (1H, d, 8.2)	114.8	6.80 (1H, d, 8.3)	114.7	6.77 (1H, d, 8.2)
6	116.8*	6.73 (1H, dd, 8.2, 2.0)	117.9	6.81 (1H, d, 8.3, 1.8)	118.6	6.86 (1H, dd, 8.2, 2.0)
7	87.4	5.90 (1H, d, 4.9)	86.5	6.00 (1H, d, 9.3)	86.8	5.96 (1H, d, 9.3)
8	56.2	4.34 (1H, d, 4.9)	53.9	4.72 (1H, d, 9.3)	53.5	4.62 (1H, d, 9.3)
9	173.6		169.2		170.0	
1'	123.3		122.9		123.3	
2'	125.9		127.0		128.2	
3'	143.6		148.2		148.2	
4'	147.4		143.9		143.7	
5'	116.8*	6.83 (1H, d, 8.5)	116.8	6.84 (1H, d, 8.3)	117.0	6.83 (1H, d, 8.4)
6'	120.1	7.21 (1H, d, 8.5)	121.6	7.15 (1H, d, 8.3)	121.3	7.16 (1H, d, 8.4)
7'	142.0	7.78 (1H, d, 15.9)	141.7	7.54 (1H, d, 16.0)	141.5	7.58 (1H, d, 16.0)
8'	116.1	6.30 (1H, d, 15.9)	116.6	6.24 (1H, d, 16.0)	116.8	6.28 (1H, d, 16.0)
9'	169.3		169.0		167.0	
1''			127.5			
2''			138.4	6.66 (1H, br s)		
3''			65.4	3.80 (1H, br d, 1.8)		
4''			66.3	3.31 (1H, br d, 4.5)		
5''			70.7	4.86 (1H, dt, 4.8, 2.7)		
6''			25.5	2.49 (br dt, 18.8, 2.3) 2.11 (1H, d, 18.8)		
7''			168.4			

* overlapped

Comp.16

Comp.16 は HRESIMS より分子式 $C_8H_8O_5$ が示された。 ^{13}C -NMR スペクトルより 1 つのカルボニル基 (δ_c 167.6)、4 本の芳香環炭素 (δ_c 145.1, 138.3, 120.0, 108.6)、1 本のメキシ基 (δ_c 50.9) シグナルの存在が示唆された。また 1H -NMR スペクトルよりシングレットの芳香環プロトン [δ_H 7.05 (2H, s)]、メキシ基プロトン [δ_H 3.83 (3H, s)] が見られた。これらの結果から、Comp.16 は 1, 3, 4, 5-置換芳香環とカルボニル基及びメキシ基を持ち、更に化合物内に対称軸を持つことが推定された。文献値[113]とも一致したことから Comp.16 は methyl gallate (Table 2-3-9, Fig. 2-3-34) であると決定した。

Table 2-3-9. ^{13}C -NMR and 1H -NMR
data for Comp.16 in CD_3OD

Position	δ_c	δ_H (J in Hz)
1	120.0	
2/6	108.6	7.05 (2H, s)
3/5	145.1	
4	138.3	
7	167.6	
8	50.9	3.83 (3H, s)

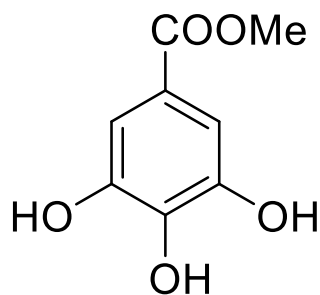


Fig. 2-3-34 Structure of Comp.16

第4章 単離化合物の酵素阻害活性について

背景と目的

前章では HAase 阻害活性を持つ植物として、コシダの地上部及びヒリュウシダの根茎抽出エキスから新規化合物を含め合計 14 種類の化合物を単離した。

本章では単離した化合物及びその関連化合物について、HAase 阻害活性試験を実施し、その阻害活性を比較し構造活性相関及び阻害様式について考察した。

実験方法

使用化合物

- Cinnamtannin B1 (Comp.1, 4)
- Aesculitannin B (Comp.2, 5)
- Brainicin (Comp.3)
- Protocatechuic acid (Comp.6)
- 5-O-Caffeoylshikimic acid (Comp.7)
- *trans*-Meliroside (Comp.8)
- 2-O-(β -D-glucopyranosyl)-2,3-dihydroxycinnamic acid (Comp.9)
- 7''-Methyl 7-epibrainate (Comp.12)
- 7-Epiblechnic acid (Comp.13)
- Brainic acid (Comp.14)
- (-)-*trans*-Blechnic acid (Comp.15)
- Methyl gallate (Comp.16)
- *trans*-Caffeic acid (東京化成、東京)
- Shikimic acid (東京化成、東京)
- (+)-Catechin hydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Chlorogenic acid (富士フィルム和光純薬、大阪)
- Rosmarinic acid (富士フィルム和光純薬、大阪)
- Gallic acid (富士フィルム和光純薬、大阪)
- グリチルリチン酸 2K (ポジティブコントロール) (富士フィルム和光純薬、大阪)

酵素阻害活性の測定

HAase 阻害活性の測定は前章と同様の方法で実施し、各化合物の IC₅₀ を 0.01%POE 存在・非存在下条件でそれぞれ算出した。界面活性剤である POE は化合物の凝集に起因する非特異的な酵素阻害反応を抑える働きがあるため、凝集に起因する非特異的な阻害活性が主となっている化合物の場合、POE を添加すると阻害活性は大幅に低下することが予想される。そこで、POE 非添加及び添加時の IC₅₀ を比較した。

酵素阻害様式の検討

cinnamtannin B1(1)、brainic acid(14)については化合物量が比較的多く得られたため、HAase に対する阻害様式の検討を実施した。各化合物について化合物非添加条件及び添加条件で HAase 活性測定を実施し、得られた結果から Lineweaver-Burk プロット及び Dixon プロットを作成し、HAase に対する阻害様式の検討を実施した。

logP 値の算出

アッセイに使用した化合物の logP の計算には ChemDraw Professional version 20.0.0.41 (PerkinElmer)を使用した。

結果及び考察

単離された化合物及びその関連化合物合計 19 化合物について HAase 阻害活性試験を行った結果を Table 2-4-1 に示す。試験を実施した化合物のうちポジティブコントロールを含む 9 化合物で濃度依存性の HAase 阻害活性作用が認められた。阻害活性の強さは IC₅₀ 値からタンニン類 > brainicin (3) > blechnic acid 類 > 5-O-caffeoylshikimic acid (7) であった。

次に比較的化合物量を確保できた cinnamtannin B1(1) 及び brainic acid (14)について HAase に対する阻害様式を Lineweaver-Burk プロット及び Dixon プロットにて検討した結果を Fig. 2-4-1 に示す。検討の結果、cinnamtannin B1 は拮抗阻害を示し、brainic acid は混合阻害を示した。Kuppusamy らは縮合タンニン及び 4 種のフラボノイドの HAase の阻害形式がいずれも拮抗型であることを報告しており[114]、タンニンで

ある cinnamtannin B1(1)の結果はこれを支持するものであった。cinnamtannin B1(1) と brainic acid (14)の阻害定数 (K_i) 値はそれぞれ 0.12 mM、1.3 mM と推定され、cinnamtannin B1(1)の方が HAase に対し強い親和性を示した。なお、ポジティブコントロールとして使用したグリチルリチン酸 2K は拮抗阻害の形式を示し、その阻害定数は 0.36 mM と推定された。

同じ *trans*-caffeic acid 構造を持つ化合物である 5-*O*-caffeoylshikimic acid (7)、chlorogenic acid、rosmarinic acid を比較すると、阻害活性は rosmarinic acid > 5-*O*-caffeoylshikimic acid (7) > chlorogenic acid であった。chlorogenic acid は 5-*O*-caffeoylshikimic acid (7)の shikimic acid が quinic acid に変わったものである。構造としては非常に近いものであるが、5 倍以上の活性の差が表れたことは非常に興味深い結果であった。

また、類似構造を持つ、7"-methyl 7-epiblechnic acid (12)、7-epiblechnic acid (13)、brainic acid (14)、*trans*-blechnic acid (15)の 4 種に HAase 阻害活性が認められた。それぞれの IC_{50} は 0.39 ± 0.0097 、 0.57 ± 0.089 、 0.89 ± 0.063 、 1.0 ± 0.082 mM であり、今回の結果からは明らかな構造活性相関は認められなかった。Murata らはシソ科ヤグルマハッカより単離した monardic acid 類や lithospermic acid 類に HAase 阻害活性を報告している (Fig. 2-3-29-1) [109]。測定時の pH が異なるため阻害活性の単純比較はできないものの、これらの化合物は blechnic acid または epiblechnic acid 骨格を有している。これらのことから bleinic acid または epiblechnic acid 骨格を持つ化合物は広く HAase 阻害活性を持つ可能性が考えられる。今後同様の骨格を持つ化合物の幅広い構造活性相関を検討することが必要である。

今回単離した化合物はいずれも分子内にフェノール性水酸基やカルボン酸などの極性基を複数持っており、脂溶性の目安である logP 値は 1.2~-0.17 (HAase 阻害活性を示したタンニン類で 0.48、brainicin で 0.35、blechnic acid 類で 0.47-1.22、5-*O*-caffeoylshikimic acid で-0.17、rosmarinic acid で 1.10)と算出されたことから、全体的に極性及び水溶性を示す化合物であったと考えられた。フェノール性水酸基の増加は水溶性を増加させるのみではなく、反応性の高さも増加させる。タンニン類である cinnamtannin B1(1)及び aesculitannin B (2) の阻害活性は単量体の一種である(+)-catechin やフェノール性水酸基を持つ gallic acid や protocatechuic acid (6)と比較して

より強い活性を示した。フェノール性水酸基を含むカテコール構造は様々なアッセイで陽性を示してしまう可能性があることから、PAINS (pan assay interference compounds) とも呼ばれ、注意される構造でもある[115]。

HAase 阻害活性物質として報告されている難水溶性化合物であるインドメタシンやアスコルビン酸パルミテートについて、友原らは界面活性剤である Triton-X100 添加条件下で阻害活性が 10 分の 1 以下または消失することを示し、HAase に対する阻害活性は溶液中の凝集に起因するものであることを報告している。また同氏らは Triton-X100 の添加によって HAase 阻害活性が 20%~50%に低下した化合物 (glycyrrhizin, baicalin 等) について、DMSO 摂動条件下におけるその阻害活性の変化から、化合物の凝集に起因しない非特異的阻害作用を示している可能性を報告している[116]。今回シダ植物から単離した化合物の IC₅₀ 値は Triton-X100 の成分の一つである POE 添加条件下で 40%~60%程度に低下した (Table 2-4-1)。同化合物はある程度の水溶性も示す化合物であることから、阻害活性の主たるメカニズムは化合物の凝集ではないことが推定された。これらの化合物の HAase に対する阻害メカニズムについては、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

また、今回単離された化合物の IC₅₀ はいずれもクールド状態のエキスの IC₅₀ より弱いものであった。この理由の一つに化合物の単離精製を実施しなかった後半の分画に強い活性があった可能性が考えられた。コシダとヒリュウシダのエキスはどちらもフェノール系化合物の含量が非常に高く、特に Comp.1 から 5 の成分探索時の HPLC チャート上では分離されなかった多数の化合物の存在が示唆された。実際にはこれら様々な異性体が集まって相乗的に強い阻害活性を示していたものと考えられた。

Table 2-4-1. Hyaluronidase Inhibitory Activities of the Compounds isolated from *B. orientale* and *D. pedate* and Related Compounds

number	name	MW	Hyaluronidase inhibitory activity IC ₅₀ (mM)	
			without POE	with POE
1	Cinnamtannin B1	865.2	0.10 ± 0.0094	0.15 ± 0.010
2	Aesculitannin B	865.2	0.078 ± 0.0033	0.21 ± 0.0058
3	Brainicin	624.5	0.39 ± 0.028	0.94 ± 0.043
6	Protocatechic acid	154.1	> 5	> 5
7	5- <i>O</i> -Caffeoylshikimic acid	336.3	1.9 ± 0.057	4.0 ± 0.29
8	<i>trans</i> -Meliroside	326.3	> 5	> 5
9	2- <i>O</i> -(β-D-Glucopyranosyl)-2,3-dihydroxycinnamic acid	325.0	> 5	> 5

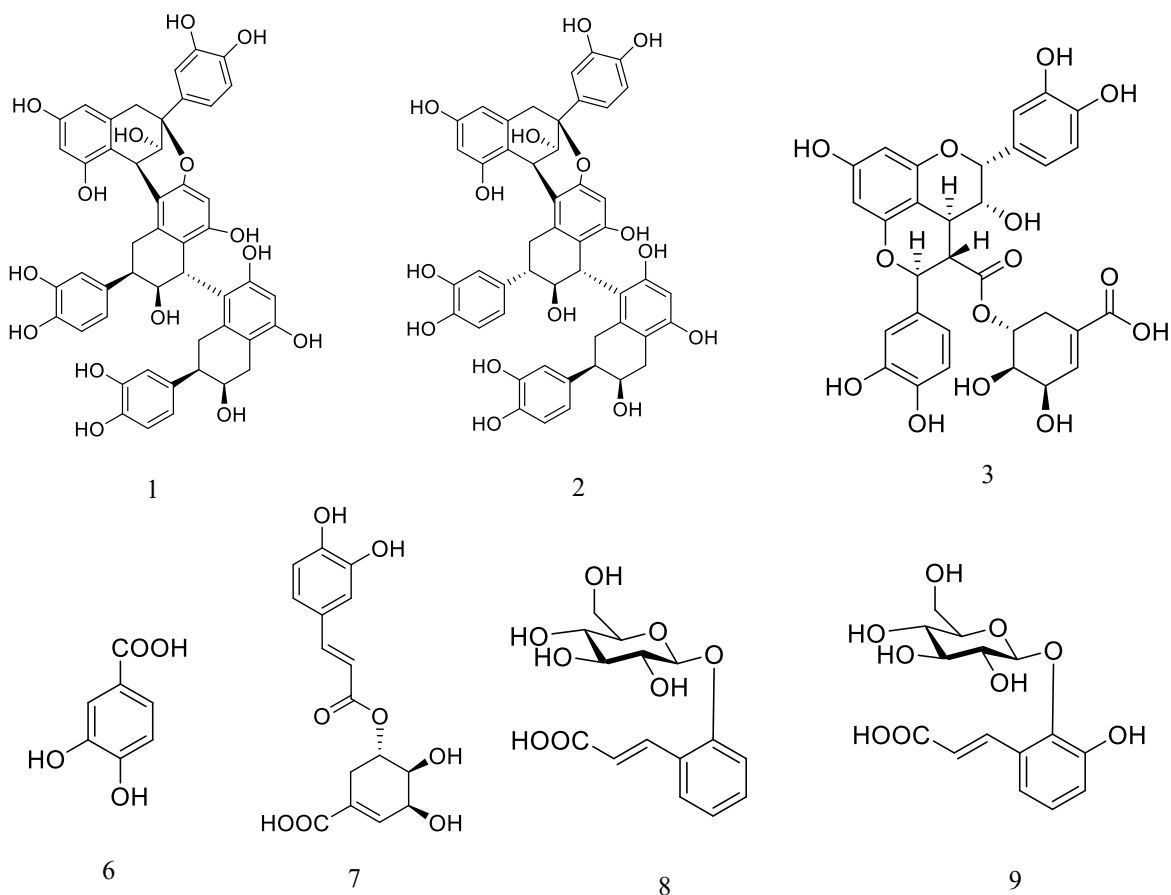


Table 2-4-1. (continued)

number	name	MW	Hyaluronidase inhibitory activity IC ₅₀ (mM)	
			without POE	with POE
12	7''-Methy 7-epibrainate	528.1	0.39 ± 0.0097	> 0.6
13	7-Epiblechnic acid	358.3	0.89 ± 0.063	1.8 ± 0.60
14	Brainic acid	514.4	1.0 ± 0.082	1.7 ± 0.27
15	<i>trans</i> -Blechnic acid	358.3	0.57 ± 0.089	1.1 ± 0.27
16	Metyl gallate	184.2	> 5	> 5

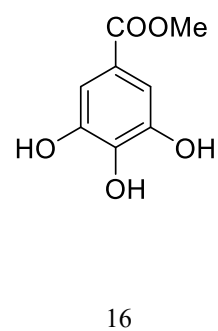
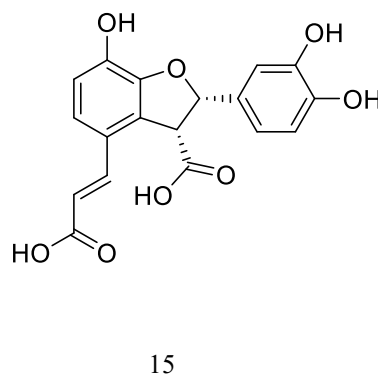
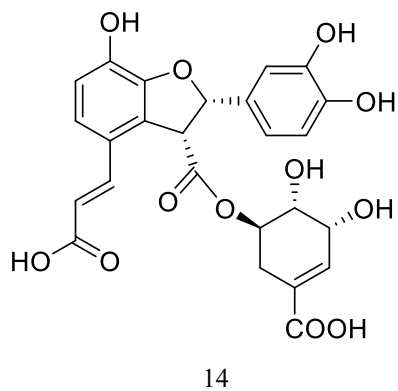
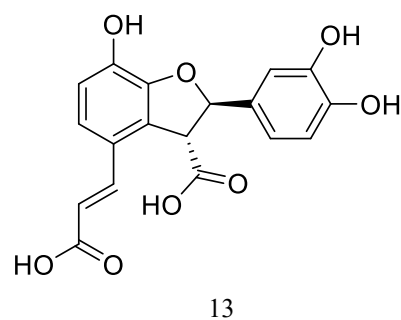
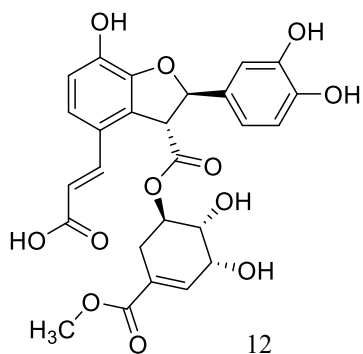
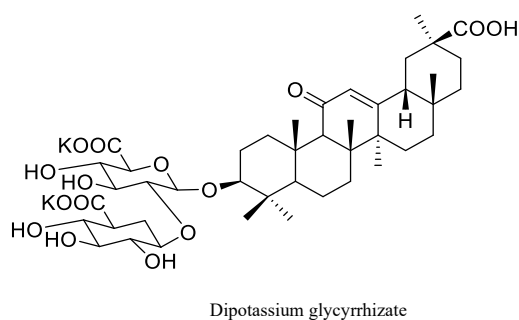
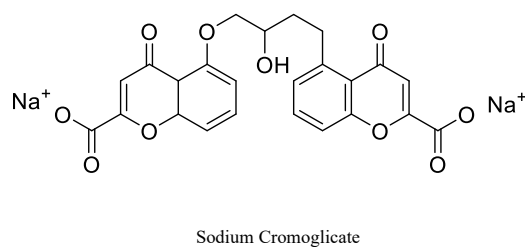
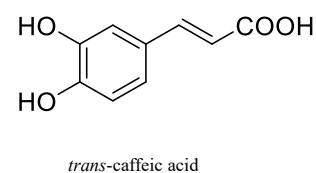
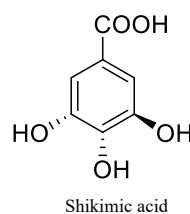
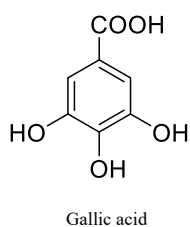
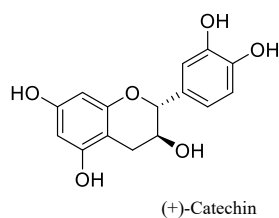
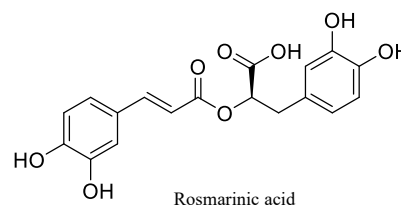
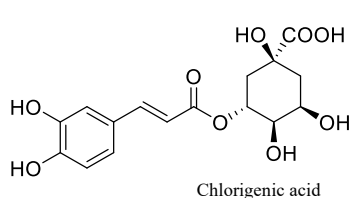


Table 2-4-1. (continued)

number	name	MW	Hyaluronidase inhibitory activity IC ₅₀ (mM)	
			without POE	with POE
-	Chlorogenic acid	354.3	> 5	> 5
-	Rosmarinic acid	360.3	0.85 ± 0.050	1.5 ± 0.11
-	(+)-Catechin	290.3	> 5	> 5
-	Gallic acid	170.1	> 5	> 5
-	Shikimic acid	174.2	> 5	> 5
-	<i>trans</i> -Caffeic acid	180.2	> 5	> 5
-	Sodium Cromoglicate	512.3	> 5	> 5
-	Dipotassium glycyrrhizate	899.1	0.64 ± 0.017	0.69 ± 0.0020



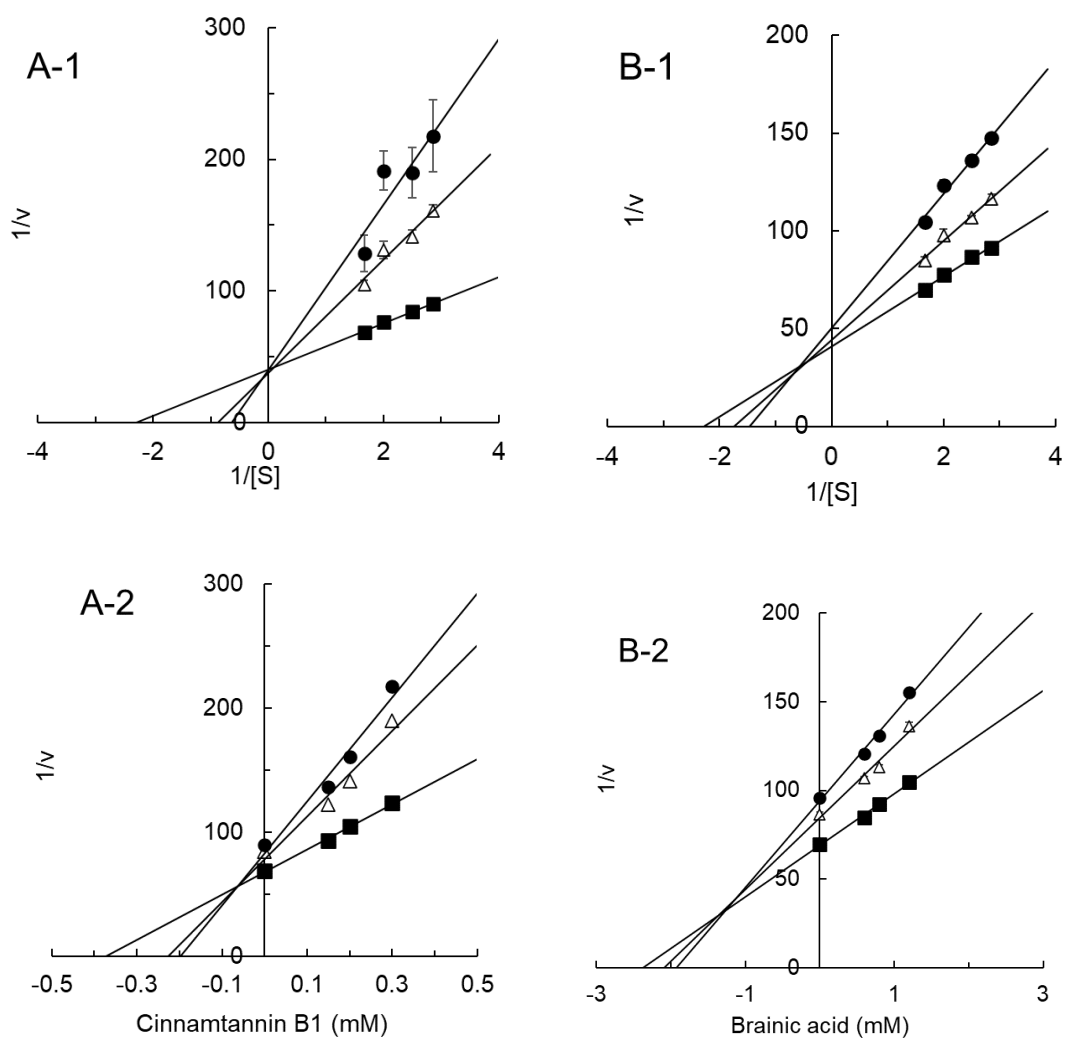


Fig. 2-4-1 Lineweaver-Burk plots (A-1, B-1) and Dixon plots (A-2, B-2) of HAase inhibition by compounds from ferns, (A) Cinnamtannin B1, (B) Brainic acid

Lineweaver-Burk plots (1). The concentrations of cinnamtannin B1 were 0 (■), 0.2 (△), 0.3 (●) mM, brainic acid were 0 (■), 0.6 (△), 1.2 (●) mM. HA concentrations were 0.35, 0.4, 0.5, 0.6 mg/mL.

Dixon plots (2). The concentrations of cinnamtannin B1 were 0, 0.15, 0.2, 0.3 mM, brainic acid were 0, 0.6, 0.8, 1.2 mM. HA concentrations were 0.35 (●), 0.4(△), 0.6(■) mg/mL.

第 2 部 小括

第 2 部では第 1 部で構築した植物エキスイブラリーを使用し、炎症やアレルギー反応に関連していると考えられる HAase に対する阻害活性を示す化合物の探索を実施した。

スクリーニング系の構築

植物エキスを使用した HAase のスクリーニングを実施するにあたり、スクリーニング系の適正化を検討した。まず、スクリーニングでは多数の検体を処理する必要があるため、HAase 阻害活性の測定は 1 枚のプレートで多数の検体の試験を実施できる比濁法を用いて実施した。試料となる植物エキスイブラリーのサンプルは幅広い極性の化合物を含む MeOH 抽出物であるため、主に水系溶媒への溶解性の低い化合物による、酵素に対する非特異的阻害作用に由来する *fales positive* を拾う可能性がある。そこで、*false positive* の割合を減らすため、非イオン系界面活性剤であるポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(POE)を添加し、DMSO 添加濃度の変化と溶解補助剤として MeOH を使用する場合における、HAase 活性を検討した。その結果、DMSO 終濃度 1%までの条件において、0.01%POE 添加により HA 分解率の向上が認められ、MeOH の使用は酵素活性及び測定に影響を及ぼすことから比濁法には適していないことが判明した。0.01%POE 添加・非添加条件における、スクリーニングで使用されるパラメーター(S/B 比、S/N 比、CV 値、Z'値)の比較を実施した。比較試験の結果 CV 値は問題の無い範囲であったが、S/B 比はどちらの条件でも 3 未満であり、POE 添加による Z'値の改善もわずかにとどまった。しかし、POE 非添加条件でも十分な Z'値が確保されていたことから、アッセイとして機能することが確認された。

次に、96 点の植物エキスサンプルを使用したプレスクリーニングを実施したところ、HAase 阻害活性と総フェノール量との間に相関が認められた。ここに 0.01% POE を添加したところ、総フェノール量の高いサンプルを中心に阻害活性の低下が認められ、HAase に対する特異性の高いものと低いものの分離が確認された。

シダ植物に着目した HAase 阻害活性成分の探索及び酵素阻害活性

シダ植物のエキス 389 点について 0.01% POE、エキス濃度 0.4 mg/mL の条件で HAase 阻害活性試験を実施したところ、6.2%のサンプルで酵素阻害活性が認められた。阻害活性を示したエキスはシシガシラ科、オシダ科等に集中し、イノモトソウ科やイワデンダ科の植物エキスには活性は認められなかった。また活性を示したエキスについて IC₅₀ を算出したところ全体として 0.050~0.17 mg/mL を示した。原料植物の入手のしやすさ等も考慮し、コシダの地上部及びヒリュウシダの根茎について成分探索を実施した。

コシダ地上部の MeOH 抽出エキスについて HAase 阻害活性を指標に分画を進めたところ、活性炭カラム通過分画中の有色分画及び MeOH 追加溶出分画に活性が集中した。さらに分画を進めた結果、cinnamtannin B1 (1)及び aesculitannin B (2)を単離した。同様にヒリュウシダの根茎 MeOH 抽出物についても分画を実施した結果、新規化合物 [2-O-(β-D-glucopyranosyl)-2,3-dihydroxycinnamic acid (9)、7"-methyl 7-epibrainate (12)]2 種と既知化合物 12 種を単離した。既知化合物はタンニン類、リグナン類、没食酸誘導体類等であった。

単離した化合物及び関連化合物について HAase 阻害活性試験を実施したところ、タンニン類及び blechnic acid 骨格を持つ化合物[7"-methyl 7-epibrainate (12)、7-epiblechnic acid (13)、brainic acid (14)、trans-blechnic acid(15)]に HAase 阻害活性が認められた。阻害活性の認められた化合物の内、cinnamtannin B1 (1)、brainic acid (14)の 2 種において HAase に対する阻害様式を Lineweaver-Burk プロット及び Dixon プロットにて検討したところ、cinnamtannin B1 は拮抗阻害型、brainic acid は混合阻害型であることが判明した。阻害係数 (*K_i*)は cinnamtannin B1 (1)で 0.12 mM、brainic acid (14)で 1.3 mM と推定された。

今回単離された化合物の中には blechnic acid または epiblechnic acid 骨格を持つ化合物が複数認められたものの、明確な構造活性相関を確認することはできなかった。しかし、文献調査の結果、blechnic acid と類似構造を持つ monardic acid 等にも HAase 阻害活性が報告されていることから、blechnic acid 骨格もしくは epiblechnic acid 骨格を持つ化合物は HAase 阻害活性を持つことが推定された。今後同条件で類似の化合物の比較をする必要があると考えられた。また、HAase 阻害活性を示した化合物の阻害活性は POE の添加により添加前の約 40~60%に低下が認められたものの、活性は

保持されていた。今回シダ植物から単離された化合物はある程度の水溶性も示す化合物であることから、阻害活性の主たるメカニズムは化合物の凝集によるものではないと考えられた。これらの化合物の HAase に対する阻害メカニズムについては、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

総括

人類は現在まで植物をはじめとした天然物から多くの恩恵を受けてきた。現代においても、天然物から有用な成分を探索するスクリーニングは活発に行われている。このことは、スクリーニングに使用されるライブラリーの重要性も同様に高まっていることを示すと考えられる。日本には約 7,500 種の植物が生育しているとされるが、中には現在未活用の種も多く存在している事が考えられる。特に海外からの天然資源の活用が限られる現在、これらは非常に魅力的な天然資源と言える。そこで本論文では植物エキスライブラリーの構築から、スクリーニングへの応用についての研究を実施した。

第 1 部ではハード面及びソフト面からのエキスライブラリーの整備を目的に①ライブラリーで使用する植物の採取及びエキスの作製、②エキス原料植物に対する食薬区分及び食経験情報の付加、③地下部を含むエキスのエンドトキシン活性情報の付加の 3 項目を実施した。

①エキスライブラリーの構築 植物エキスライブラリーには、日本国内の野外採取品、センター内で栽培した栽培品、国内流通している生薬、海外産植物を使用し 2020 年 10 月までに合計 12,573 点のエキス作製を実施した。サンプルの構成割合は現在のところ野外採取品 60%、栽培品 20%、生薬及び海外産植物が約 10%ずつとなっている。また、野外採取品、栽培品、生薬の 3 グループにおけるその多様性を Simpson の多様度指数及び分類学的多様度指数を用いて検討したところ、いずれのグループも高い多様度を持つことが示された。

②原料植物に対する食薬区分及び食経験情報の付加 エキス作製に使用した原料植物に対し、厚生労働省通知の「専医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト(専医)」、「医薬品的効能効果を標榜しない限り医薬品と判断しない成分本質(原材料)リスト(非医)」、並びに各種書籍の情報を収集及び付加を実施した。13,738 点のサンプルについて調査したところ、食薬区分に該当するものは全体の 27.2%、食経験の認められたものは全体の 39.2%であり、いずれの情報も確認されなかったエキスが約半数を占めた。食経験については使用した資料にも影響を受けるため、今後は情報の無い植物についての情報収集が課題となる。現在この情報に基づく分譲依頼は多く、ユーザーの関心の高さを表していると共に、今後の安定したサンプル提供体制を

整える必要が認められた。

③地下部を使用した植物エキス中のエンドトキシン活性情報の付加 エンドトキシンはグラム陰性菌の菌体表面に由来するリポ多糖であり、生体の発熱反応や免疫細胞の不活化等様々な活性を持つ非意図的な混入成分である。エキスライブラリーは植物から抽出したエキスが主体であるものの、多様な生物活性を持つエンドトキシンの混入は特に細胞等を使用した生物試験に影響を及ぼす可能性がある。よってエンドトキシンの活性情報はサンプルを使用した実験の正しい結果の担保、並びにライブラリーの品質向上のために必要な情報であると考えられる。なお、MeOH 抽出エキスについて大規模な調査を行った報告は本研究が初となる。

リムルス試薬を用いて地下部を使用した植物エキスのエンドトキシン活性を測定した結果、野外採取品のエンドトキシン検出率(> 0.05 EU/mL)が 48.3%だったのに対し、生薬由来のエキスは 4.0%と大きな差が表れた。この差はサンプルの調製過程による汚染の混入が主な原因と考えられた。検出されたエンドトキシン活性は DMSO エキス中の濃度換算で 0.05~50 EU/mL 以上とサンプルによってばらつきが非常に大きいものの、文献調査の結果、細胞等への影響を与えない程度であることが判明した。また生薬エキスについては他の検出報告と比較しても非常に検出率が低く、抽出溶媒の違いや DMSO への再溶解等の処理がエンドトキシンの活性に影響を与えた可能性がと考慮された。

一方で半数近くのサンプルで回収率の異常値または反応曲線の形状の異常が認められたため、その中の 3 種の植物エキス(ワレモコウ 根、メマツヨイグサ 根、エゾミンハギ 根由来エキス)を用いて複数の条件でリムルス試験を実施した。その結果、ポリフェノール化合物を吸着する樹脂であるポリビニルポリピロリドンでエキスを処理した場合に試験への影響が消失したことから、エキス中のポリフェノール化合物が影響を与えていたことが明らかになった。そこで、16 点の単体のポリフェノール化合物を用いてリムルス試験を実施したところ、*caffeic acid* 構造または没食子酸構造を持つ化合物に回収率の低下または反応曲線の形状異常が認められた。

タンニンの構成ユニットの一つである(+)-catechin は、100 μ M でもリムルス試験への影響は認められなかった。しかし catechin 類が重合したタンニンでは分子当たりの水酸基が増えるため、タンパク質との相互作用が強くなることが予想される。また、タンニンを含むポリフェノール化合物は構造異性体も多いため、実際には様々な化合物が

相乗的に影響を及ぼしていたものと考えられた。

第2部では第1部で構築したエキブラリーを使用して、炎症やアレルギーに関連があるとされるヒアルロナーゼ (HAase) の阻害活性スクリーニングを実施した。

スクリーニングを実施するにあたり、まずスクリーニング系の適正化を試みた。植物エキブラリーは幅広い極性の化合物を含むため、水系溶媒への溶解性の悪い化合物を含む場合がある。そのような化合物は溶液中で凝集し、酵素に対し非特異的阻害反応に由来する **false positive** を示すことがある。非イオン系界面活性剤であるポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル (POE) を添加し、DMSO 添加濃度の変化と溶解補助剤として MeOH を使用する場合における、HAase 活性を検討した。その結果、DMSO 終濃度 1%までの条件において、0.01%POE 添加により HA 分解率の向上が認められ、MeOH の使用は酵素活性及び測定に影響を及ぼす事から比濁法には適していないことが判明した。そこで POE を 0.01%添加し、MeOH の添加は行わない条件でスクリーニングを実施することとした。

本スクリーニングは化合物の特異性を考え、シダ植物のエキスをターゲットに実施した。389 点のシダ植物エキスのスクリーニングを実施した結果、全体の 6.2%にあたる 24 点で HAase 阻害活性が認められた。主にシシガシラ科やオシダ科の植物エキスが阻害活性を示し、イワデンダ科やイノモトソウ科のエキスを阻害活性を示したものは認められなかった。HAase 阻害活性を示したエキスの IC_{50} は 0.050~0.17 mg/mL であった。この中から比較的強い活性を示し、植物体の入手が比較的容易であると考えられることから今回コシダの地上部並びにヒリュウシダの根茎について成分探索を実施した。

コシダはウラボシ科に属し、地上部からはフラボノイド配糖体やタンニン類が報告されており、日本国内では食用及び薬用の使用履歴は確認されなかった。今回地上部のエキスから2種のプロシアニジン化合物 **cinnamtannin B1(1)**及び **aesculitannin B (2)** を単離した。また抽出エキスはタンニン類の含量が非常に高いことが判明した。

ヒリュウシダはシシガシラ科ヒリュウシダ属の植物で、その根茎は生薬「貫衆」としても使用される例はあるものの、成分や生物活性に関する報告はほとんど確認されなかった。今回の研究では MeOH 抽出エキスの酢酸エチル分画より2種の新規化合物を含む14種の化合物を単離し、その構造を決定した。既知化合物はリグナン系化合物である **blechnic acid** 類 (*trans-blechnic acid*, *7-epiblechnic acid*, *brainic acid*) の他、**caffeoylshikimic acid** 類、**brainicin (3)**やタンニン類等が単離された。**brainicin (3)**はシ

シガシラ科ソテツワラビ、アカクキクサ科アカウキクサからの単離報告があるのみであった。いずれもシダ植物からの単離報告であることは非常に興味深い。新規化合物である 2-O-(β -D-glucopyranosyl)-2,3-dihydroxycinnamic acid (9) については、母核となっている 2,3-dihydroxycinnamic acid の単離報告が植物ではサジオモダカの種子及びローマカミツレのみであり、菌類の代謝産物由来の分と合わせても非常に少ないという珍しい骨格であった。菌類の代謝産物由来である可能性もあるものの、glucose 結合体の報告は初であった。またこちらも新規化合物である 7"-methyl 7-epibrainate (12) は、7-epiblechnic acid の methyl shikimate 結合体であった。これまでヒリュウシダには地上部に 8-epiblechnic acid のみが見いだされていたが、今回の研究により部位は異なるものの 7-epiblechnic acid 及びそのエステルも含まれていたことが判明した。また、今回構造解析には至らなかったものの、ヒリュウシダのエキス中には他にも類似の骨格を持つ化合物が存在していると考えられた。

単離した化合物及び関連化合物計 19 種について HAase 阻害活性試験を実施したところ、タンニン類、blechnic acid 及び epiblechnic acid 構造を持つ化合物類[7-epiblechnic acid (13)、brainic acid (14)など]などに HAase 阻害活性が認められた。タンニン類及び 7"-methyl 7-epibrainate (12)、trans-blechnic acid (15)にはポジティブコントロールであるグリチルリチン酸 2K よりも強い作用が認められ、その IC₅₀ は 0.080~0.57 mM を示した。阻害活性の認められた化合物の内、cinnamtannin B1 (1)、brainic acid (14)の 2 種において HAase に対する阻害様式を Lineweaver-Burk プロット及び Dixon プロットにて検討したところ、cinnamtannin B1 は拮抗阻害型、brainic acid は混合阻害型であることが判明した。阻害係数 (K_i) は cinnamtannin B1 (1) で 0.12 mM、brainic acid (14) で 1.3 mM と推定された。blechnic acid 及び epiblechnic acid 構造を持つ化合物類の HAase 阻害活性について、今回明確な構造活性相関は認められなかったものの、類似の構造を持つ lithospermic acid 類や monardic acid 類にも HAase 阻害活性が報告されていること、今回は使用した化合物が非常に限られていたことから、今後幅広い化合物を使用した構造活性相関を検討する必要があると考えられた。また、HAase 阻害活性を示した化合物の阻害活性は POE の添加により添加前の約 40~60% に低下が認められた。同化合物は logP 値等よりある程度の水溶性も示すと考えられることから、HAase に対する阻害活性の主たるメカニズムは化合物の凝集によるものではないことが推定された。これらの化合物の HAase に対する阻害メカニズムについては、

今後さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

今回ヒリュウシダの根茎について、メイン化合物 (blechnic acid、brainic acid 等) に HAase 阻害活性が見いだされた。これらの化合物は地上部にも含まれていることが報告されていることから、地上部も有用である可能性が高いと予想された。またコシダ及びヒリュウシダは南方では一般的にみられるシダ植物であり、空いた土地にいち早く侵入・成長することも報告されていることから、植物資源として今後の活用が期待される。本研究が両シダ植物の有用性を示す一つの事例となれば幸いである。

本研究で構築した植物エキスライブラリーは研究所内の資源としてのみではなく、公共性の高い側面を持ち、実社会にも応用されている。その点で植物の可能性を様々な分野へ生かすことのできる非常に稀有なエキスライブラリーであると言える。サンプルの作製及び細胞毒性試験や抗酸化活性等のエキス情報の蓄積作業は現在も継続しており、分譲も随時実施している。今後も本ライブラリーが社会へ還元できるより良いものとなるよう成長させていきたい。

謝辞

本研究に際し、多くの便宜と大学院進学の手を助けて頂きました大阪大学大学院 薬学研究科 教授(医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センターセンター長)川原 信夫 先生に感謝申し上げます。

この研究を通じて多くの有益なるご助言を賜りました大阪大学大学院 薬学研究科 平田 収政 教授、荒井 雅吉 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に終始ご指導、ご助言を頂きました 薬用植物資源研究センター 栽培研究室室長(大阪大学大学院 薬学研究科 准教授) 瀧野 裕之先生に厚く御礼申し上げます。

ヒリュウシダの採取にご同行頂きました同 育種生理研究室 河野 徳昭先生、技術専門員 山内 章弘様、本研究にご協力いただきました薬用植物資源研究センターの皆様感謝申し上げます。

そして終始あたたかくサポートをしてくれた 夫 強志、そして家族に感謝いたします。

河上 仁美

スペクトル値

Comp.1 and Comp.4: Cinnamtannin B1

Reddish brown amorphas solid

HRESIMS

$m/z = 887.18165 [M+Na]^+$ (ヒリュウシダ), $887.18217 [M+Na]^+$ (コシダ)

(calcd for $C_{45}H_{36}O_{18}Na$: 887.17939)

$[\alpha]_D^{21} +71.0$ (c 0.50, MeOH)

1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータは Table 2-3-1 を参照

Comp.2 and Comp. 5: Aesculitannin B

Brown amorphas solid

HRESIMS

$m/z = 887.18201 [M+Na]$ (ヒリュウシダ), $887.18179 [M+Na]$ (コシダ)

(calcd for $C_{45}H_{36}O_{18}Na$: 887.17939)

$[\alpha]_D^{21} +83.5$ (c 0.13, MeOH)

1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータは Table 2-3-2 を参照

Comp.3: Brainicin

Light brown amorphas solid

HRESIMS

$m/z = 625.15754 [M+H]^+$ (calcd for $C_{31}H_{29}O_{14}$: 625.15518)

$m/z = 647.13880 [M+Na]^+$ (calcd for $C_{31}H_{28}O_{14}Na$: 647.13713)

$[\alpha]_D^{21} + 106.8$ (c 0.98, MeOH)

1H -NMR, ^{13}C -NMR のデータは Table 2-3-3 を参照

Comp.6 Protocatechuic acid

Light brown amorphas solid

HRESIMS

$$m/z = 155.03373 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_7H_7O_4: 155.03389)$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-5 を参照

Comp.7: 5-O-Caffeoylsikimic acid

Yellowish amorphas solid

HRESIMS

$$m/z = 359.07434 [M+Na]^+ \text{ (calcd for } C_{16}H_{16}O_8Na: 359.07374)$$

$$m/z = 337.09245 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_{16}H_{17}O_8: 337.09179)$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-4 を参照

Comp.8: trans-Melirotoside

White amorphas solid

HRESIMS

$$m/z = 349.09048 [M+Na]^+ \text{ (calcd for } C_{15}H_{18}O_8Na: 349.08939)$$

$$[\alpha]_D^{21} - 69.6 \text{ (} c \text{ 1.0, MeOH)}$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-6 を参照

Comp.9: 2-O-(β-D-glucopyranosyl)-2,3-Dihydroxycinnamic acid

Yellowish amorphas solid

HRESIMS

$$m/z = 343.10303 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_{15}H_{19}O_9: 343.10236)$$

$$m/z = 365.08501 [M+Na]^+ \text{ (calcd for } C_{15}H_{18}O_9Na: 365.08430)$$

$$[\alpha]_D^{21} + 31.6 \text{ (} c \text{ 0.35, MeOH)}$$

UV λ_{max} nm MeOH (log ϵ) 218.0 (3.89), 274.5 (3.74)

¹H-NMR, ¹³C-NMR, NOE スペクトルは Fig. 2-3-22, 23, 24 を参照

Comp.9 構成糖の確認

Comp.9 (1.1mg)を 3% HCl 2mL に溶解させ、30 分間還流加熱した。室温まで冷却後、酢酸エチルで振り取り水層を濃縮乾固させ、HPLC-OR 及び GC-MS 分析に供した。

HPLC-OR 条件

ポンプ:PU-2080 plus (日本分光)

カラムオープン/インジェクター:CO-2060 plus (日本分光)

検出器:OR-2090 plus 旋光度検出器 (日本分光)

カラム:Carbohydrate Column 4.6 X 250 mm, particle size 4 μm (Waters)

測定条件

移動相:アセトニトリル/水 = 7/3

カラム温度:40℃

流速:1.0 mL/min

分離した糖は標準品 D-glucose と同様の正の旋光性及び保持時間 (t_R : 4.48 min) を示した。

GC-MS 条件

GC:GC-2010 Plus (Shimadzu)

MS:GCMS-QP2010 SE (Shimadzu)

カラム:SLB-5ms (SUPELCO)

(カラム長: 30.0 m, 内径: 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm)

測定条件

カラム流量:1.76mL (定圧力モード)

注入口温度:250℃

インターフェイス温度:250℃

イオン源温度:200℃

注入法:スプリットモード(スプリット比 1:20)

注入試料溶液量:1 μ L

カラムオーブンプログラム

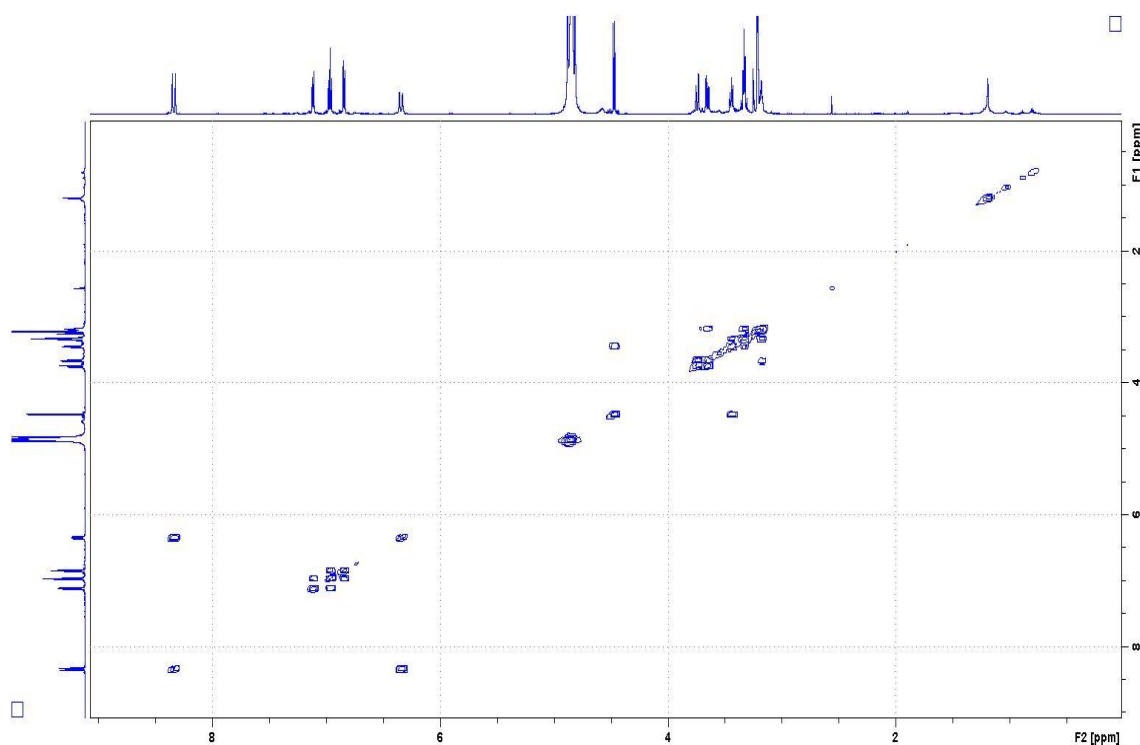
初期温度 90°Cで 1 分保持→150°Cまで 7°C/分で昇温→200°Cまで 5°C/分
で昇温→300°Cまで 10°C/分まで昇温→300°Cで 20 分保持

イオン化法:EI

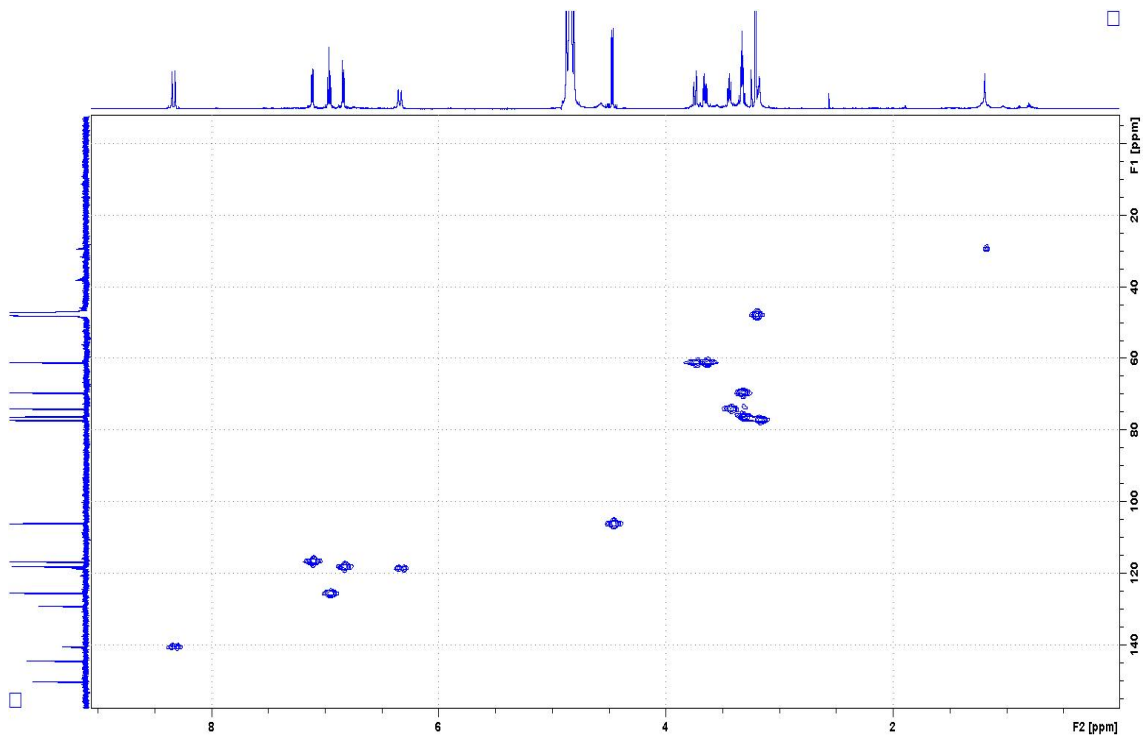
イオン化電圧:70eV

測定モード:スキャンモード(スキャン範囲: m/z 30 ~ 500)

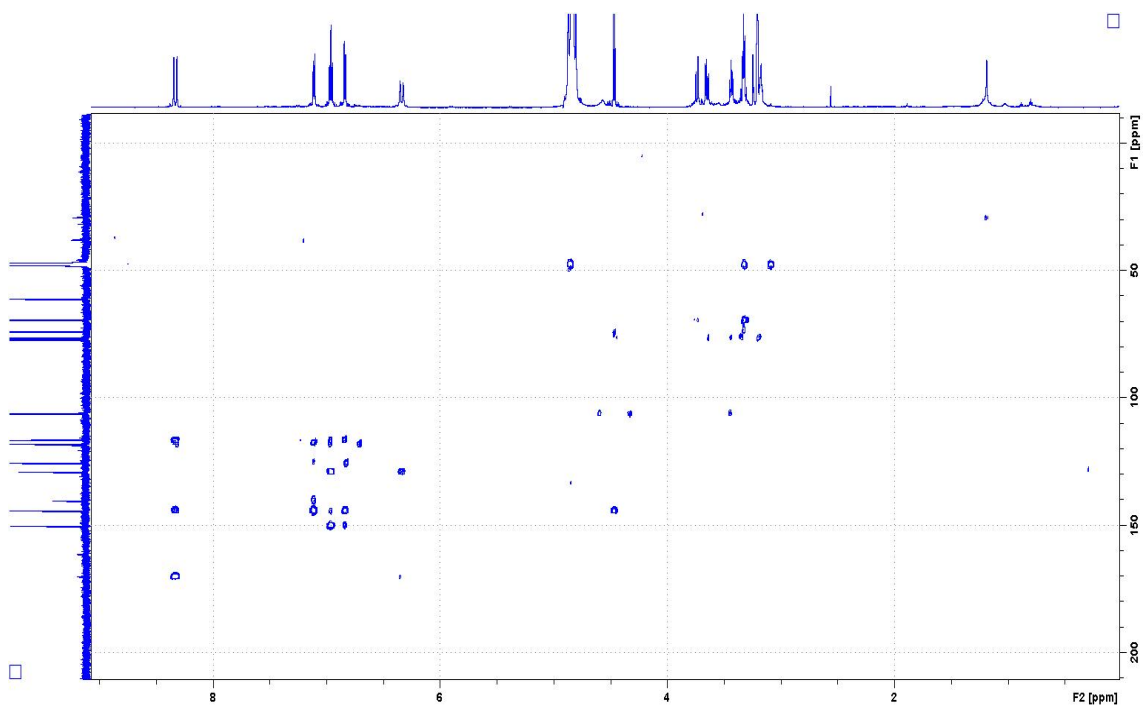
分離した糖に TMS 化試薬(TMS-HT:東京化成)を加えて処理し、上清を GC-MS 測定に供した。その保持時間は標準品 D-glucose (t_R : 18.960 min, 20.695 min)と一致し、MS パターンについても全て一致した。



COSY スペクトル



HMQC スペクトル



HMBC スペクトル

Comp.10: 4-O-Caffeoylsikimic acid

Light brown amorphas solid

HRESIMS

$$m/z = 337.09256 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_{16}H_{17}O_8: 337.09179)$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-4 を参照

Comp.11: 3-O-Caffeoylsikimic acid

Yellowish amorphas solid

HRESIMS

$$m/z = 337.09194 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_{16}H_{17}O_8: 337.09179)$$

$$m/z = 359.07395 [M+Na]^+ \text{ (calcd for } C_{16}H_{16}O_8Na: 359.07374)$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-4 を参照

Comp.12: 7''-methyl 7-epibrainate

Light brown amorphas powder

HRESIMS

$$m/z = 529.13726 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_{26}H_{25}O_{12}: 529.13405)$$

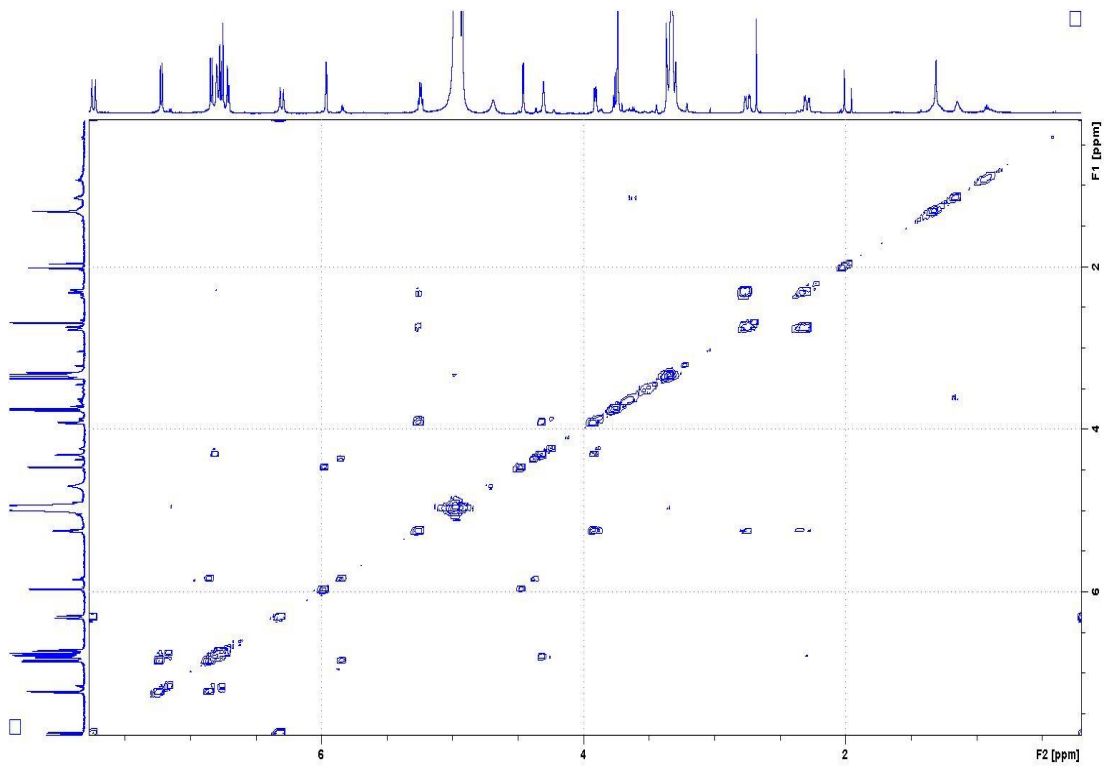
$$m/z = 551.11906 [M+Na]^+ \text{ (calcd for } C_{26}H_{24}O_{12}Na: 551.11600)$$

$[\alpha]_D^{21} -54.5$ (*c* 0.09, MeOH)

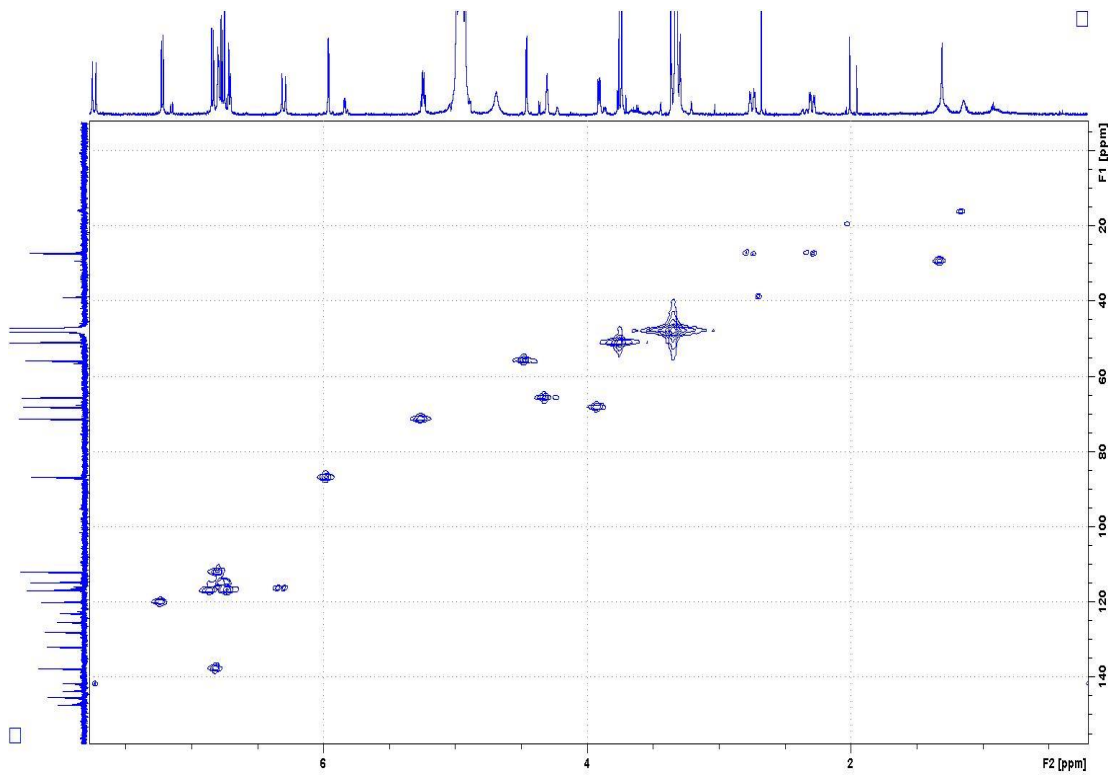
UV λ_{max} nm (log ϵ) 244(4.10), 287(3.97), 306.5(3.97), 328(3.82)

CD (*c* 0.007, MeOH) nm ($\Delta\epsilon$) 227 (- 6.56), 243 (- 6.22), 277 (+ 0.93), 294 (- 0.84), 316 (- 1.40)

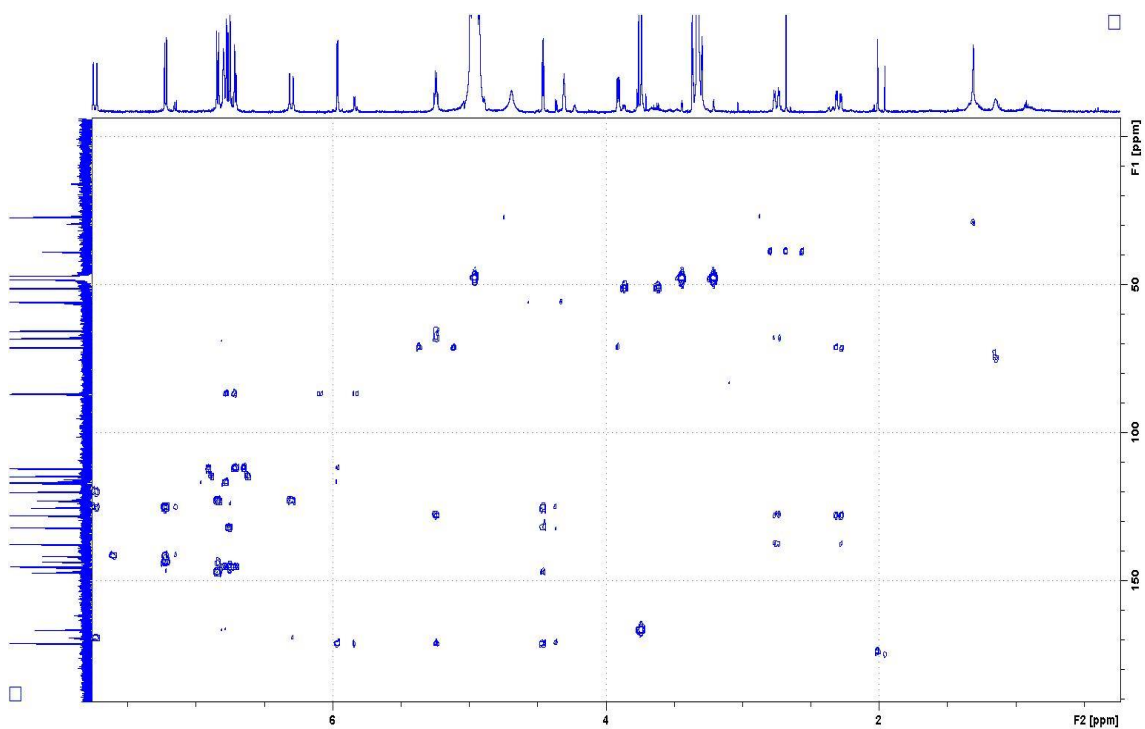
¹H-NMR 及び ¹³C-NMR は Fig. 2-3-31 を参照。



COSY スペクトル



HMQC スペクトル



HMBC スペクトル

Comp.13: 7-Epiblechnic acid

Yellow amorphas powder

HRESIMS

$$m/z = 359.07694 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_{18}H_{15}O_8: 359.07614)$$

$$[\alpha]_D^{21} - 101.6 (c 1.0, MeOH)$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-7, 2-3-8 を参照

Comp.14: Brainic acid

Yellowish amorphas powder

HRESIMS

$$m/z = 515.11894 [M+H]^+ \text{ (calcd } C_{25}H_{23}O_{12}: 515.11840)$$

$$m/z = 537.10056 [M+Na]^+ \text{ (calcd } C_{25}H_{22}O_{12}Na: 537.10035)$$

$$[\alpha]_D^{21} - 36.4 \text{ (} c \text{ 1.0, MeOH)}$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-7, 2-3-8 を参照

Comp.15: *trans*-Blechnic acid

Yellow amorphas powder

HRESIMS

$$m/z = 359.07697[M+H]^+ \text{ (calcd for } C_{18}H_{15}O_8: 359.07614)$$

$$m/z = 381.05883 [M+Na]^+ \text{ (calcd for } C_{18}H_{14}O_8Na: 381.05809)$$

$$[\alpha]_D^{21} - 25.8 \text{ (} c \text{ 0.50, MeOH)}$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-7, 2-3-8 を参照

Comp.16: Methyl gallate

Light brown amorphas powder

HRESIMS

$$m/z = 185.04528 [M+H]^+ \text{ (calcd for } C_8H_9O_5: 185.04445)$$

¹H-NMR, ¹³C-NMR のデータは Table 2-3-9 を参照

引用文献

1. Newman DJ. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? *J Med Chem.* **51**(9), 2589-2599 (2008).
2. 東京大学創薬機構 <<https://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/>> accessed 11. August. 2020
3. 理化学研究所 環境資源科学研究センター <<http://www.cbrg.riken.jp/npdepo/ja/>> accessed 11. August. 2020
4. 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム <<https://www.jbic.or.jp/>> accessed 11. August. 2020
5. Fuchino H, Kawakami H, Yoneyama T, Kawahara N. Recent Research Progress of Research Center for Medical Plant Resources, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (Part 3) - Research Project on Medical Plant Resources for Drug Discovery-. *PMDRS*, **47**, 787-791 (2016).
6. Judd WS. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, Second Ed. 2002 Sinauer, Massachusetts U.S.A(2002).
7. 加藤 雅啓, 海老原 淳. 日本の固有植物. 東海大学出版会; 2011.
8. Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites, pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol.* **58**(3), 188-194 (2014).
9. Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, Fujita K, Itoh Y, Nakamura M, Fuchino H, Kawahara N, Fukui N, Watanabe A, Kimura T, Tsumaki N. Pterosin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting *Sik3*. *Nat Commun.* **7**, 10959 (2016).
10. Murakami T. Tanaka N. Occurrence, Structure and Taxonomic Implications of Fern Constituents, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1988 Springer-Verlag.
11. 瀧野裕之, 河上仁美, 米山達朗, 杉村康司, 川原信夫. 薬用植物スクリーニングプロジェクトにおける植物エキスライブラリーの基盤構築とその多様性について, 日本生薬学会 64 回年会, 千葉, 2017 年 9 月

12. 津田喜典. 溶媒抽出. 分析化学. 22 ,934-942 (1973).
13. Ina K, Nobukuni M, Sano A, Kishima I. Stability of Allyl Isothiocyanate (Studies on the Volatile Components of Wasabi and Horse Radish Part III). *Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **28**, 627-631, 1981.
14. Johansen HN, Glitsø V, Bach Knudsen KE. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.*, **44**, 470-474 (1996).
15. Warwick RM, Clarke KR. New biodiversity measures reveal a decrease in taxonomic distinctness with increasing stress. *MEPS*, **129**, 301-305(1995).
16. Simpson EH. Measurement of Diversity, *Nature*, **163**, 688 (1949).
17. Jost L. Entropy and Diversity, *Oikos*, **113**, 363-375 (2012).
18. 海老原淳著. 日本産シダ植標準図鑑. 学研プラス; 2017.
19. Willis, K.J. (ed.) State of the World's Plants 2017. Report. Royal Botanic Gardens, Kew. (2017) < https://stateoftheworldsplants.org/2017/report/SOTWP_2017.pdf> accessed 12. October. 2020
20. 厚生労働省医薬・生活衛生局監視指導・麻薬対策課長通知: 食薬区分における成分本質(原材料)の取扱いの例示 (令和 2 年 7 月 9 日一部改正), 薬生監麻発 0331 第 9 号, 令和 2 年 3 月 31 日
<https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc4935&dataType=1>, accessed 13. October. 2020
21. 米倉浩司・梶田忠 (2003-) 「BG Plants 和名ー学名インデックス」(YList), <<http://ylist.info>>, accessed 29. September. 2020
22. 関田節子、大濱宏文、池田秀子. 学名で引く食薬区分リスト. 薬事日報社; 2014.
23. 佐竹元吉、黒柳正典、正山征洋、和仁皓明. 健康・機能性食品の基原植物辞典. 中央法規; 2016.
24. 星川清親、千原光男. 食用植物図説. 女子栄養大学出版部; 1991.
25. 高野昭人. 新版 おいしく食べる山菜・野草. 世界文化社; 2014.
26. 大海淳. 今すぐ使える山菜取りナビ図鑑. 大泉書店; 2009.
27. 岡田恭子. 食べる野草図鑑. 日東書院本社 ; 2017.
28. 渡邊高志. 高知県有用植物ガイドブック. 高知工科大学; 2016.

29. 橋本郁三. 食べられる野生植物大辞典 草木・木本・シダ 新装版. 柏書房; 2007.
30. 今井國勝、今井万岐子. よくわかる山菜大図鑑. 永岡書店; 2017.
31. 橋本郁三. 野生植物食用図鑑 南九州－琉球の草木. 南方新社; 2012.
32. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 食品衛生法第4条の2第2項の規定に基づく「サウロパス・アンドロジナス(別名アマメシバ)」を含む粉末剤、錠剤等の剤形の加工食品」の販売禁止について, 食安発第0912001号, 平成15年9月12日
33. 医薬・生活衛生局食品監視安全課輸入食品安全対策室: シアン化合物を含有する食品の取扱いについて, 事務連絡, 平成29年11月6日
34. Tanamoto K. Endotoxin and the quality control of medicine. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **126**, 19–33 (2008).
35. 土谷正和. 改訂第2版 エンドトキシン. 試験情報機構; 2015.
36. Kirikae T, Kirikae F, Uemura Y, Nakano M. Endotoxin contamination in fetal bovine serum and its influence on tumor necrosis factor production by macrophage-like cells J774.1 cultured in the presence of the serum. *Int. J. Immunopharmacol.*, **19**, 255–262 (1997).
37. Gao B, Tsan MF. Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **317**, 1149–1154 (2004).
38. Khan SM, Coulibaly S, Abe M, Furukawa N, Kubo Y, Nakaoji Y, Kawase Y, Matsumoto T, Hasei T, Deguchi Y, Nagaoka H, Yamagishi N, Watanabe M, Honda N, Wakabayashi K, Watanabe T. Seasonal fluctuation of endotoxin and protein, concentrations in outdoor air in Sasebo, Japan. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 115–122 (2018).
39. Ohnishi T. Detection of endotoxin in Japanese mineral water for microbiological assessment of the water source and the factories. *J. Food Microbiol.*, **27**, 141–145 (2010).
40. Brooks JP, Maxwell SL, Rensing C, Gerba CP, Pepper IL. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. *Can. J. Microbiol.*, **53**, 616–622 (2007).
41. Kandra L, Gyémánt G, Zajác Á, and Batta G. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochem Biophys Res Commun.*, **139**, 1265–1271 (2004).

42. Park DH, Park SJ, Kim JM, Jung WY, Ryu JH. Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia.*, **81**, 644-648 (2010).
43. Niwa M, Milner KC, Ribic E, Rudbach JA. Alteration of physical, chemical, and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali. *J. Bacteriol.*, **97**, 1069–1077 (1969).
44. Fujita N, Saito Y, Nitto Y, Ito T, Mizuguchi H, Endo M, Ogata T. Folin-Chiocalteu colorimetric analysis using a scanner for rapid determination of total polyphenol content in many test samples. *Stud. Sci. Technol.*, **1**, 139–144 (2012).
45. World Health Organization. “WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants”:
<<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42783/9241546271.pdf>>, accessed 8 May, 2020.
46. Inagawa H, Nishizawa T, Tsukioka D, Suda T, Chiba Y, Okutomi, Morikawa A, Soma G, Mizuno D. Homeostasis regulated by activated macrophage. II. LPS of origin other than wheat flour and their concomitant bacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 994–997 (1992).
47. Hsu YH, Fu SL. Detection of endotoxin contamination in Chinese herbs by NF- κ B activity-based reporter assays. *J. Food Drug Anal.*, **12**, 34–39 (2004).
48. Guo C, Yuan L, Wang J, Wang F, Yang X, Zhang F, Song J, Ma X Cheng Q, Song G. Lipopolysaccharide (LPS) induces the apoptosis and inhibits osteoblast differentiation through JNK pathway in MC3T3-E1 cells. *Inflammation.*, **37**, 621–631 (2014).
49. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z. Lipopolysaccharide stimulate platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J. Immunol.*, **182**, 7997–8004 (2009).
50. Yang H, Kaneko M, He C, Hughes MA, Cherry GW. Effect of a lipopolysaccharide from *E. coli* on the proliferation of fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. *Phytother. Res.*, **16**, 43–47 (2002).
51. Goodier MR, Londei M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human

- CD56⁺CD3⁻ NK Cells: A regulatory role of monocytes and IL-10. *J. Immunol.*, **165**, 139–147 (2000).
52. Hwa CH, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells.*, **24**, 2744–2752 (2006).
53. Ohkouchi Y, Ishikawa S, Takahashi K, Itoh S. Factors associated with endotoxin fluctuation in aquatic environment and characterization of endotoxin removal in water treatment process. *Environ. Eng. Res.*, **44**, 247–254 (2007).
54. Ribi E, Anacker RL, Brown R, Haskins WT, Malmgren B, Milner KC, Rudbach JA. Reaction of endotoxin and surfactants. *J. Bacteriol.*, **92**, 1493–1509 (1966).
55. Fujita Y, Nabetani T. Iron sulfate inhibits Limulus activity by induction of structural and qualitative changes in lipid A. *J. Appl. Microbiol.*, **116**, 89–99 (2014).
56. Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 268–292 (1995).
57. He Q, Lv Y, Yao K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem.*, **101**, 1178–1182 (2007).
58. Pohjala L, Tammela P. Aggregating behavior of phenolic compounds - A source of false bioassay results? *Molecules*, **17**, 10774–10790 (2012).
59. Granica S, Piwowarski JP, Czerwińska ME, Kiss AK. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. *J Ethnopharmacol.*, **156**, 316-346 (2014).
60. Granica S, Czerwińska ME, Piwowarski JP, Ziaja M, Kiss AK. Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. *J Agric Food Chem.*, **6**, 801-810 (2013).
61. Srećković N, Stanković JSK, Matić S, Mihailović NR, Imbimbo P, Monti DM, Mihailović V. *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) as a promising source of phenolic compounds in the modulation of oxidative stress: Comparison between aerial parts and root extracts. *Ind Crops Prod.*, **155**, 112781 (2020).
62. Mohamed IH, Giorgio C, Bruni R, Flammini L, Barocelli E, Rossi D, Domenichini G, Poli F, Tognolini M. Polyphenol rich botanicals used as food supplements interfere

- with EphA2-ephrinA1 system. *Pharmacol Res.*, **64**, 464-470 (2011).
63. Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry*, **13**, 813–818 (1976).
64. Tsuchiya M, Oishi H, Takaoka A, Fusamoto M, Matsuura S. Discrimination between endotoxin and (1→3)-β-D-glucan using turbidimetric kinetic assay with *Limulus* amoebocyte lysate. *Chem. Pharma. Bull.*, **38**, 2523-2526 (1990).
65. 吉田隆志, 有井雅幸. 植物ポリフェノール含有素材の開発その機能性と安全性. シーエムシー出版; 2007.
66. Su XD, Guo RH, Li HX, Ma JY, Kim YR, Kim YH, Yang SY. Anti-allergic inflammatory components from *Sanguisorba officinalis* L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **28**, 2210–2216 (2018).
67. Ahmad A, Ali M, Tandon S. New oenotheralanosterol A and B constituents from the *Oenothera biennis* roots. *Chin. J. Chem.*, **28**, 2474–2478 (2010).
68. Rauha JP, Wolfender JL, Salminen JP, Pihlaja K, Hostettmann K, Vuorela H. Characterization of the polyphenolic composition of Purple Loosestrife (*Lythrum salicaria*). *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.*, **56**, 13–20 (2001).
69. 厚生科学審議会疾病対策部会 リウマチ・アレルギー対策委員会: リウマチ・アレルギー対策委員会 報告書 (2011) < <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r985200001nes4-att/2r9852000001newa.pdf> > accessed 13. September. 2020.
70. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.*, **85**, 699-715(2006).
71. Kohi S, Sato N, Koga A, Hirata K, Harunari E, Igarashi Y. Hyaluromycin, a Novel Hyaluronidase Inhibitor, Attenuates Pancreatic Cancer Cell Migration and Proliferation. *J Oncol.*, 2016, 9063087 (2016).
72. Girish KS, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath BS. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr Med Chem.*, **16** (18), 2261-2288 (2009).
73. Kakegawa H, Matsumoto H, Endo K, Ssatoh T, Nonaka G, Nishioka I. Inhibitory Effects of Tannins on Hyaluronidase Activation and on the Degranulation from Rat Mesentery Mast Cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **33** (11), 5079-5082 (1985).
74. Jadhav A, Ferreira RS, Klumpp C, Mott BT, Austin CP, Inglese J, et al. Quantitative

- analyses of aggregation, autofluorescence, and reactivity artifacts in a screen for inhibitors of a thiol protease. *J Med Chem.* **53**,37–51 (2010).
75. Kumagai K. Chemical library screening in academia How to avoid false positives. *Exp Med.*, **32**(2), 6-43 (2014).
76. Auld DS, Inglese J, Dahlin JL. (2017) Assay Interference by Aggregation. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, *et al.*, (eds) *Assay Guidance Manual*, [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442297/>> accessed 28. October. 2020
77. McGovern SL, Helfand BT, Feng B, Shoichet BK. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J Med Chem.*, **46**(20), 4265-4272 (2003).
78. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and Hyaluronidase Activity. *J Biol Chem.*, **1**, 303-306 (1956).
79. 長野哲雄. 創薬化学—メディシナルケミストへの道—. 東京化学同人; 2018.
80. 上海科学技出版社. 中薬大事典 第四卷. 小学館; 1985.
81. Raja DP, Manickam VS, Britto AJ, Gopalakrishnan S, Ushioda T, Satoh M, Tanimura A, Fuchino H, Tanaka N. Chemical and Chemotaxonomical Studies on Dicranopteris Species. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**(10), 1800-1803 (1995).
82. Li X, Yang L, Zhao Y, Wang R, Xu G, Zheng Y, Tu L, Peng L, Cheng X, Qin-Shi Zhao Q. Tetranorclerodanes and Clerodane-Type Diterpene Glycosides from *Dicranopteris dichotoma*. *J. Nat. Prod.*, **70**, 265-268 (2007).
83. Pang C, Ma XK, Lo JP, Hung TT, Hau BC. Vegetation succession on landslides in Hong Kong: Plant regeneration, survivorship and constraints to restoration. *Glob Ecol Conserv.*, **15**, e00428 (2008).
84. 朝日新聞社. 植物の世界 12. 朝日新聞社; 1997.
85. 上海科学技出版社. 中薬大事典 第三卷. 小学館; 1985.
86. Wada H, Kida T, Tanaka N, Murakami T, Saik Y, Chen CM. Chemical and Chemotaxonomical Studies of Ferns. LXXXI. Characteristic Lignans of Blechnaceous Ferns. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**(8), 2099-2101(1992).
87. Lai HY, Lim YY, Kim KH. Isolation and characterization of a proanthocyanidin with

- antioxidative, antibacterial and anti-cancer properties from fern *Blechnum orientale*. *Pharmacogn Mag.*, **13**(49), 31-37 (2017).
88. Chiu PL, Patterson WG, Salt TA. Sterol Composition of Pteridophytes. *Phytochemistry*, **27**(3), 819-822 (1988).
 89. Bohm AB. Phenolic compounds in ferns—III: An examination of some ferns for caffeic acid derivatives. *Phytochemistry.*, **7**(10), 1825-1830 (1986).
 90. Hesse M., Meier H., Zeeh B., 著. 野村正勝 監訳. 有機化学のためのスペクトル解析法[第2版]. 化学同人; 2017.
 91. Jang DS. Lee GY. Lee YM. Kim YS. Sun H. Kim D. Kim JS, Flavan-3-ols having a γ -lactam from the root of *Actinidia arguta* inhibit the formation of advanced glycation end products in vitro. *Chem. Pharma. Bull.* **57**. 397-400 (2009).
 92. Hemingway RW, Tobiason FL, McGraw GW, Steynberg JP. Conformation and complexation of tannins: NMR spectra and molecular search modeling of flavan-3-ols. *Magn Reson Chem.* **34**, 424-433 (1996).
 93. Kamiya K, Watanabe C, Endang H, Umar M, Satake T. Studies on the constituents of bark of *Parameria laevigata* Moldenke. *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 551-557 (2001).
 94. Nonaka, G, Morimoto S, Nishioka I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 2139-2145 (1983).
 95. Morimoto S, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and Related Compounds. LIX. Aesculitannins, Novel Proanthocyanidins with Doubly-Bonded Structures from *Aesculus hippocastanum* L. *Chem Pharm Bull.*, **35**(12), 4717-4729 (1987).
 96. Virtbauer J, Krenna L, Kählig H, Hüfner A, Donatha O, Mariand B. Chemical and Pharmacological Investigations of *Metaxya rostrata*. *Z. Naturforsch.* **63c**, 469-475 (2008).
 97. Kashiwada Y, Morita M, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and Related Compounds. XCI. Isolation and Characterization of Proanthocyanidins with an Intramolecularly Doubly-Linked Unit from the Fern, *Dicranopteris pedata* HOUTT. *Chem Pharm Bull.*, **38**(4), 856-860 (1990).
 98. López JJ, Jardín I, Salido GM, Rosado JA. Cinnamtannin B-1 as an antioxidant and platelet aggregation inhibitor. *Life Sci.*, **82**(19-20), 977-982 (2008).

99. Fujita K, Kuge K, Ozawa N, Sahara S, Zaiki K, Nakaoji K, Hamada K, Takenaka Y, Tanahashi T, Tamai K, Kaneda Y, Maeda A. Cinnamtannin B-1 Promotes Migration of Mesenchymal Stem Cells and Accelerates Wound Healing in Mice. *PLOS ONE*, **10**(12), e0144166 (2015).
100. Wang K, Li MM, Chen XQ, Peng LY, Cheng X, Li Y, Zhao QS. Phenolic constituents from *Brainea insignis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 868-871 (2010). Brainicin
101. Qian W, Wu W, Kang Y, Wang Y, Yang P, Deng Y, Ni C, Huang J. Comprehensive identification of minor components and bioassay-guided isolation of an unusual antioxidant from *Azolla imbricata* using ultra-high performance liquid chromatography—quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with multicomponent knockout and bioactivity evaluation. *J Chromatogr A.*, 1609, 460435 (2020).
102. Saito T, Yamane H, Murofushi N, Takahashi N, Phinney BO. 4-*O*-Caffeoylshikimic and 4-*O*-(*p*-Coumaroyl) shikimic Acids from the Dwarf Tree Fern, *Dicksonia antarctica*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **61**(8), 1397–1398 (1997).
103. Fukuoka M. Chemical and Toxicological Studies on Bracken Fern, *Pteridium aquilium* var. *latiusculum*. VI. Isolation of 5-*O*-Caffeoylshikimid acid as an Antithiamine Factor. *Chem. Pharma. Bull.*, **30**, 3219-3224 (1982).
104. Hur JM, Park JG, Yang KH, Park JC, Park JR, Chun SS, Choi JS, Choi JW. Effect of Methanol Extract of *Zanthoxylum piperitum* Leaves and of Its Compound, Protocatechuic Acid, on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes and Lipid Peroxidation in Rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **67**(5), 945–50 (2003).
105. Canuto KM, Silveira ER, Bezerra AME. Phytochemical analysis of cultivated specimens of cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith.). *Quim. Nova.*, **33**(3), 662-666 (2010).
106. Manangeeswaran M, Ramalingam VV, Kumar K, Mohan N. Degradation of indulin, a kraft pine lignin, by *Serratia marcescens*, *J. Environ. Sci. Health B*, **42**(3), 321-327 (2007).
107. Herisset A, Chaumont JP, Paris RR. Roman camomile (*Anthemis nobilis*) polyphenols, *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. **4**(3), 189-200 (1970).

108. Zhao M, Chen JY, Xu LJ, Goedecke T, Zhang XQ, Duan JA, Che CT. *cis*-aconitic anhydride ethyl ester and phenolic compounds from the seeds of *Alisma orientale*. *Nat Prod Commun.*, **7**(6), 785-787 (2012).
109. Murata T, Oyama K, Fujiyama M, Oobayashi B, Umehara K, Miyase T, Yoshizaki F. Diastereomers of lithospermic acid and lithospermic acid B from *Monarda fistulosa* and *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia.*, **91**, 51-59 (2013).
110. Choi HG, Tran PT, Lee JH, Min BS, Kim JA. Anti-inflammatory activity of caffeic acid derivatives isolated from the roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Arch Pharm Res.*, **41**(1), 64-70 (2018).
111. Si Y, Li N, Tong L, Lin B, Wang W, Xing Y, Liu X, Yue H, Xu J, Ju A. Bioactive minor components of the total salvianolic acids injection prepared from *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Bioorganic Med Chem Lett.*, **26**(1) 82-86 (2016).
112. Tian S, Li N, Wang L, Wang K. Chemical Constituents from *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Chin. Pharm. J.*, **46**(16), 1238-1241 (2011).
113. Hwang JL, Hyun SK, Kyung DL, Sang HN, Ki HP, Min SY. Comparison of Tyrosinase Inhibitory Effect of the Natural Antioxidants from *Cedrela sinensis*. *Agric Chem Biotechnol.*, **48**(3), 144–7 (2005).
114. Kuppasamy UR, Khoo HE, Das NP. Structure-activity of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol.*, **40**(2), 397-401(1990).
115. Baell JB, Holloway GA. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem.* **53**, 2719–40 (2010).
116. Tomohara K, Ito T, Onikata S, Furusawa K, Kato A, Adachi I. Interpreting the behavior of concentration-response curves of hyaluronidase inhibitors under DMSO-perturbed assay conditions. *Bioorganic Med Chem Lett.* **26**, 3153–3157 (2016).

付録

主論文

Kawakami H, Fuchino H, Kawahara N. Endotoxin Contamination and Reaction Interfering Substances in the Plant Extract Library. *Biol Pharm Bull.* **43**, 1767-1775 (2020).

参考論文

Fuchino H, Kawakami H, Yoneyama T, Kawahara N. Recent Research Progress of Research Center for Medical Plant Resources, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (Part 3) - Research Project on Medical Plant Resources for Drug Discovery-. *PMDRS*, **47**, 787–791 (2016).

Arita M, Fuchino H, Kawakami H, Ezaki M, and Kawahara N. Characterization of a New Antienterovirus D68 Compound Purified from Avocado. *ACS Infect. Dis.* **6**, 2291-2300 (2020).