

ブラジル産プロポリスのチロシナーゼ阻害物質

田澤 茂実, 藁科 力, 野呂 忠敬*

静岡県立大学

Tyrosinase Inhibitors of Brazilian Propolis

Shigemi Tazawa, Tsutomu Warashina, Tadataka Noro*

*Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka,
52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan*

(Received December 1, 2000)

The tyrosinase inhibitory activity was examined on the main constituents of Brazilian propolis. Artepillin C, (*E*)-3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid, (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2*H*-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid, kaempferol and kaempferide showed potent inhibitory activities, and had higher activities than those known for kojic acid or ascorbic acid as tyrosinase inhibitors. The type of inhibition by artepillin C with respect to L-tyrosine as substrate was characteristically noncompetitive. For the structure-activity relationships, the tyrosinase inhibitory activity tended to increase with the presence of the hydroxyl or the methoxyl group at position 4 of the aromatic ring. Furthermore addition of the prenyl group or the presence of the hydroxy group at position 7 of the flavonoid may play an important role for increasing the inhibition of tyrosinase. Brazilian propolis show lower activity than the propolis of other countries [China, Japan, Australia, Ukraine, Hungary, Uruguay]. It was suggested that the propolis of other countries contained various flavonoids which were responsible for the inhibitory activity.

Keywords: propolis; *Apis mellifera*; tyrosinase inhibitor; artepillin C; 3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid; (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2*H*-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid; kaempferol; kaempferide

皮膚にできるシミ, ソバカス, 黒色などの色素沈着は, 過剰のメラニンが生成されることにより生じる。このメラニンの生成に最も影響を与えるのが紫外線であり, その他に様々なホルモンも影響を与える。地上に届く紫外線は,

波長の長い UV-A (400~320nm)と波長の短い UV-B (320~280nm)があり, これらの紫外線により, 色素沈着や細胞障害, 光アレルギー反応, 皮膚がんなどが引き起こされる。UV-A は真皮まで到達し, 照射直後に皮膚の既存の還

元メラニンを黒化させる反応や、照射数日後に色素沈着を増強するサンタン(遅延型色素沈着)を起こす。UV-B は表皮にダメージを与え、ヒスタミンなどの炎症起因物質を産生させ、サンバーン(日光皮膚炎)を起こす¹⁾。この炎症起因物質がメラノサイト(色素形成細胞)中の酵素チロシナーゼを活性化し、その結果、生体内アミノ酸であるチロシンが酸化されてメラニンが生成される。その機構は、 $\text{tyrosine} \rightarrow \text{DOPAquinone} \rightarrow \text{DOPAchrome} \rightarrow 5,6\text{-dihydroxyindole} \rightarrow \text{indole-5,6-quinone}$ となり、これが重合してメラニンが生成される。そのうち tyrosine から DOPAchrome まではチロシナーゼが関与し、それ以降は自動酸化の寄与が大きいと言われ²⁾、この酵素活性又は自動酸化の進行を抑制するものとして様々な生薬³⁻⁷⁾や、フェノール性化合物などの成分が報告されている⁸⁻¹³⁾。

我々は、これまでにブラジル産プロポリスから、数多くのフェノール性化合物を単離報告してきた^{14,15)}。プロポリスとは、ミツバチが周辺の種々の植物の滲出物などから集めて作る膠状物質であり、古くから世界中の多くの地方で民間伝承薬として用いられ、抗菌作用、抗炎症作用、抗酸化作用、抗アレルギー作用、鎮痛作用など数多くの薬理学的作用が報告されている^{16,17)}。従って、フェノール性化合物を多く含むプロポリスは、チロシナーゼを阻害する物質を含み、美白作用や皮膚のトラブルの改善にも有効であるのではないかと期待された。我々はプロポリスの成分及びその効果を評価する基礎的研究の一環として、ブラジル産プロポリスに含まれる主な成分並びに、各地域(国)産プロポリスについてチロシナーゼ阻害活性の検討を行った。

実験の部

1. 試薬

Kojic acid はナカライテスク(株)より、arbutin は東京化成工業(株)より、ascorbic acid, benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, 4-methoxycinnamic acid, caffeic acid, ferulic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, chrysin, apigenin, luteolin, galangin, kaempferol, quercetin, naringenin,

vanillin, L-tyrosine は、和光純薬工業(株)より購入した。Acacetin, kaempferide, pinocembrin, isosakuranetin, sakuranetin, caffeic acid phenethyl ester (CAPE)は、本学食品栄養科学部食品製造工学研究室熊澤茂則博士よりご恵与頂いたものを用いた。またこれらの他に、benzyl *p*-coumarate, phenethyl *p*-coumarate, drupanin, artepillin C, (*E*)-3-(2,2-dimethyl-2*H*-1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid, (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2*H*-1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid, (*E*)-3-(2,2-dimethyl-3,4-dihydro-3-hydroxy-8-prenyl-2*H*-1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid, (*E*)-3-[2,3-dihydro-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-7-prenyl-5-benzofuranyl]-2-propenoic acid, (*E*)-3-[2,3-dihydro-2-(1-methylethenyl)-7-prenyl-5-benzofuranyl]-2-propenoic acid, (*E*)-3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid は既報^{14,15)}により単離した化合物を用いた。

2. 各地域(国)産プロポリスの調製

各地域(国)産プロポリスは、前報¹⁸⁾において成分検討を行ったブラジル産(アレクリン系, ユーカリ系, パラナマツ系), 中国産, 日本産, オーストラリア産, ハンガリー産, ウクライナ産, ウルグアイ産プロポリスを用いた。これらの原塊 0.4 g を細かく砕き, 75% EtOH を 1 ml 加え, 2 時間攪拌させ抽出した。次に 3000 rpm で, 20 min 遠心分離後, 上澄液と固形物に分け, 上澄液を濃縮, 乾固したものを試料とした。

3. *Baccharis drucunculifolia* DC. の調製

ブラジル, サンパウロ市にて採集した *Baccharis drucunculifolia* DC. (Compositae) を風乾後, 葉と枝に分け粉碎し, それぞれを MeOH 還流下で 3 時間, 3 回抽出を行った。この抽出液をろ過し, 濃縮, 乾固したものを試料とした。

4. チロシナーゼ阻害試験

チロシナーゼ阻害試験は、奥村らの測定法¹⁹⁾を改変して行った。1/15 M リン酸緩衝液(pH 6.8) 2.0 ml, 試料を H₂O 又は 10% DMSO に溶かし, 各濃度(100, 50, 25, 10, 5,

2.5 µg/ml)に調整した試料溶液 2.0 ml, 150 units/ml の mushroom tyrosinase (Sigma chemical 社製, EC 1.14.18.1) 水溶液 0.5 ml, 基質として 0.5 mg/ml の L-tyrosine 水溶液 0.5 ml 加えたものを試験液として, 37℃で1時間インキュベートした. 反応後, 475 nm における吸光度から DOPachrome の生成量を測定した. 阻害率(%)は, 以下の式に従い算出を行い, 阻害率をプロットしたグラフを作成し 50%阻害濃度(IC₅₀)を求めた.

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(A-A') - [(B-B') - (C-C')]}{(A-A')} \times 100$$

A: absorbance at 475nm without test sample

A': absorbance at 475nm without test sample and enzyme

B: absorbance at 475nm with test sample

B': absorbance at 475nm with test sample, but without substrate

C: absorbance at 475nm with test sample, but without enzyme

C': absorbance at 475nm with test sample, but without enzyme and substrate

5. 酵素反応の阻害様式

酵素反応の阻害様式は, 基質の tyrosine 濃度を 0.5, 0.3, 0.2, 0.1 mg/ml に変え反応を行い, それぞれ1時間後の反応速度を測定した. これらの逆数をとり, 二重逆数 (Lineweaver-Burk)プロットをから阻害様式を調べた. また解離定数(Ki)は, 得られた反応速度式から算出した.

6. 測定装置

吸光度計は, U-1100 spectrophotometer (日立製作所製)を使用した.

結果及び考察

我々の単離したブラジル産プロポリスの主な成分及びプロポリスと関連のある物質 (*印は, ブラジル産からはまだ単離されていないもの) について, チロシナーゼの阻

害活性の結果を **Table 1** に示した. 阻害活性はDOPachrome の生成量を指標に, 前述のようにして 50%阻害濃度(IC₅₀)を算出し検討を行った.

本研究において, プレニル桂皮酸誘導体の artepillin C (**12**) [IC₅₀: 10.5 µg/ml (0.070 mM)]や, (E)-3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid (**18**) [IC₅₀: 11.9 µg/ml (0.066mM)], (E)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2H-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (**14**) [IC₅₀: 13.7 µg/ml (0.092 mM)]及び, フラボノイドの kaempferol (**24**) [IC₅₀: 10.3 µg/ml (0.072 mM)]や kaempfride (**25**) [IC₅₀: 12.0 µg/ml (0.080 mM)], galangin * (**23**) [IC₅₀: 12.1 µg/ml (0.090 mM)], apigenin * (**20**) [IC₅₀: 12.2 µg/ml (0.090 mM)]が極めて高い阻害活性を示した. これらは従来より美白剤の素材として配合されている kojic acid [IC₅₀: 13.6 µg/ml (0.191 mM)]や ascorbic acid [IC₅₀: 16.4 µg/ml (0.186mM)], arbutin [IC₅₀: 23.4 µg/ml (0.172 mM)]より強い阻害活性を示した. また kojic acid より阻害活性は低かったが, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) (**40**)や p-coumaric acid phenethyl ester (**39**), p-coumaric acid benzyl ester (**38**), 及びフラボノイドの chrysin (**19**)や acacetin * (**21**), quercetin (**26**), luteolin * (**22**), naringenin (**28**), isosakuranetin (**29**)についても, 強い阻害活性を示した. 安息香酸誘導体や桂皮酸誘導体, キナ酸エステルの阻害活性は, いずれも弱いものであり, sakuranetin (**30**)と vanillin (**41**)については, 極めて弱いものであった.

類似化合物から構造活性相関を検討すると, 安息香酸誘導体, 桂皮酸誘導体, フラボノイドにおいて, ベンゼン環の4位又はフラボノイドのB環の4'位に水酸基若しくはメトキシル基が付加されると阻害活性が高くなる傾向が認められた. またベンゼン環の3位又はフラボノイドのB環の3'位に水酸基やメトキシル基が付加されると阻害活性はやや低くなり, ベンゼン環の3位, 4位又はフラボノイドのB環の3'位, 4'位共にメトキシル基に置換されると, 阻害活性は更に低下する傾向が認められた. このことから, ベンゼン環の4位又はフラボノイドのB環の4'位の水酸基の存在は, チロシナーゼの阻害活性を高める要因になることが示唆された. フラボノイドにおいて, C環の

Table 1 Tyrosinase Inhibitory Activity of The Main Constituents of Brazilian Propolis and Related Compounds

Compounds	IC ₅₀ ^{a)} μg/ml (mM)	Compounds	IC ₅₀ ^{a)} μg/ml (mM)
【Benzoic acid derivatives】		【Flavonoids】	
benzoic acid (1)	45.5 (0.754)	chrysin (19)	14.2 (0.112)
4-hydroxybenzoic acid (2)	27.1 (0.392)	apigenin * (20)	12.2 (0.090)
protocatechuic acid (3)	28.7 (0.372)	acacetin * (21)	15.5 (0.109)
vanillin acid (4)	35.9 (0.427)	luteolin * (22)	19.6 (0.137)
【Cinnamic acid derivatives】		galangin * (23)	12.1 (0.090)
cinnamic acid (5)	38.6 (0.521)	kaempferol (24)	10.3 (0.072)
<i>p</i> -coumaric acid (6)	26.4 (0.322)	kaempferide (25)	12.0 (0.080)
4-methoxycinnamic acid * (7)	27.9 (0.313)	quercetin (26)	16.4 (0.109)
caffeic acid (8)	30.9 (0.343)	pinocembrin (27)	21.9 (0.171)
ferulic acid (9)	34.5 (0.355)	naringenin (28)	18.8 (0.138)
3,4-dimethoxycinnamic acid * (10)	41.9 (0.402)	isosakuranetin (29)	20.1 (0.140)
【Prenylated cinnamic acid derivatives】		sakuranetin (30)	>100
drupanin (11)	40.5 (0.349)	dihydrokaempferol (31)	22.8 (0.151)
artepillin C (12)	10.5 (0.070)	【Quinic acid esters】	
(<i>E</i>)-3-(2,2-dimethyl-2 <i>H</i> -1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (13)	30.2 (0.263)	5-caffeoylquinic acid (32)	36.2 (0.204)
(<i>E</i>)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2 <i>H</i> -1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (14)	13.7 (0.092)	3-caffeoylquinic acid (33)	49.5 (0.279)
(<i>E</i>)-3-(2,2-dimethyl-3,4-dihydro-3-hydroxy-8-prenyl-2 <i>H</i> -1-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (15)	23.3 (0.147)	4-caffeoylquinic acid (34)	43.8 (0.247)
(<i>E</i>)-3-[2,3-dihydro-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-7-prenyl-5-benzofuranyl]-2-propenoic acid (16)	24.8 (0.157)	4,5-dicaffeoylquinic acid (35)	39.5 (0.153)
(<i>E</i>)-3-[2,3-dihydro-2-(1-methylethenyl)-7-prenyl-5-benzofuranyl]-2-propenoic acid (17)	30.1 (0.202)	3,5-dicaffeoylquinic acid (36)	50.4 (0.195)
(<i>E</i>)-3-prenyl-4-(dihydro-cinnamoyloxy)cinnamic acid (18)	11.9 (0.066)	3,4-dicaffeoylquinic acid (37)	46.8 (0.181)
		【Other compounds】	
		<i>p</i> -coumaric acid benzyl ester (38)	15.4 (0.135)
		<i>p</i> -coumaric acid phenethyl ester (39)	17.2 (0.113)
		caffeic acid phenethyl ester (40)	15.1 (0.108)
		vanillin (41)	>100
		【Standard】	
		kojic acid	13.6 (0.191)
		ascorbic acid	16.4 (0.186)
		arbutin	23.4 (0.172)

Tyrosinase was incubate with the L-tyrosine and test substance at 37 °C for 60 min. The absorbance was read at 475nm. Each value represents the mean of five experiments. a) 50% inhibitory concentration.

* No report the isolation from Brazilian propolis.

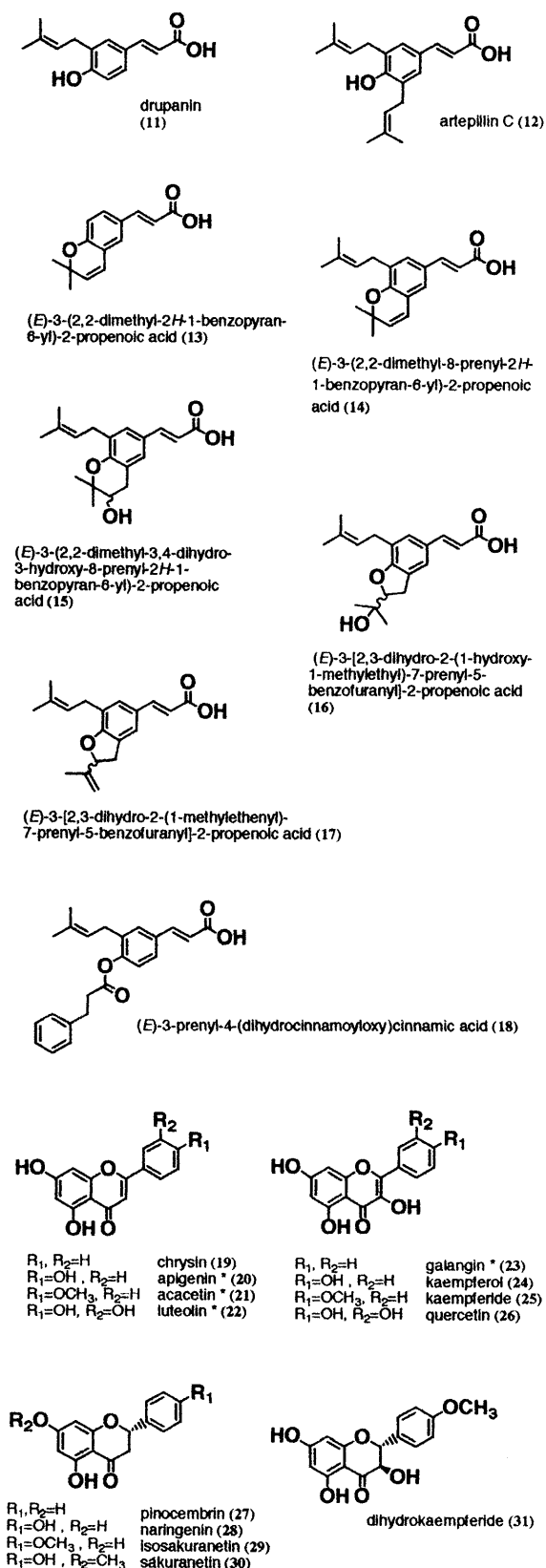


Chart 1. Structures of Isolated Compounds from Brazilian Propolis and Related Compounds

2 位, 3 位に二重結合を有するフラボンは, 二重結合のないフラバノンより阻害活性が高くなり, 更にその 3 位に水酸基が付加したフラボノールでは, 阻害活性が更に高くなる傾向が認められた. またフラボノイドの 7 位にメトキシ基を有する sakuranetin (30) の阻害活性が著しく低かったことから, フラボノイドの 7 位の水酸基の存在はチロシナーゼの阻害活性の増加に重要であると考えられた. プレニル桂皮酸誘導体において, *p*-coumaric acid (6) の側鎖にプレニル基を 1 つ有する drupanin (11) は, 桂皮酸より阻害活性は落ちるが, プレニル基を 2 つ有する artemillin C (12) では逆に, 阻害活性は著しく上昇した. また artemillin C (12) のプレニル基の一方が分子内で環を巻いたベンゾピラン骨格の (E)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2H-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (14) になると, 阻害活性はやや低下し, これに H₂O が付加された (E)-3-(2,2-dimethyl-3,4-dihydro-3-hydroxy-8-prenyl-2H-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (15) では, 更に低下する傾向が認められた.

ブラジル産プロポリスの主成分であり¹⁸⁾, チロシナーゼの阻害活性が極めて高かった artemillin C (12) の Lineweaver-Burk プロットを Fig. 1 に示した. artemillin C (12) の酵素反応阻害型は, Fig. 1 に示したような典型的な非拮抗阻害を示した. また (E)-3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid (18) や kaempferol (24), caffeic acid phenethyl ester (40) についても同様の非拮抗阻害型を示した.

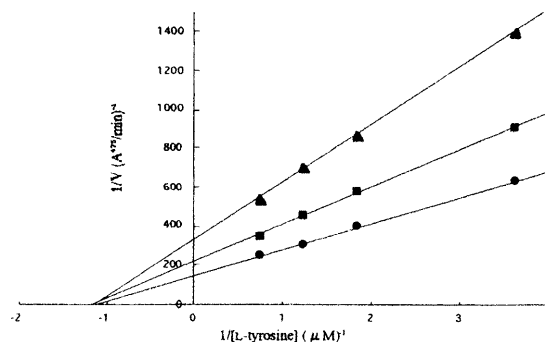


Fig. 1. Lineweaver-Burk Plots Showing Inhibitory Effect of Artemillin C (12) on Tyrosinase

● 0 μg/ml (0 μM), ■ 10 μg/ml (66.7 μM), ▲ 25 μg/ml (166.7 μM)

一方, *p*-hydroxybenzoic acid (2)や*p*-coumaric acid (6), caffeoylquinic acid (32-37)は, Fig. 2に示したような拮抗阻害型を示した. Artepillin C (12)及び(*E*)-3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid (18)の解離定数(K_i)は, それぞれ 1.48×10^{-4} , 1.23×10^{-4} であった.

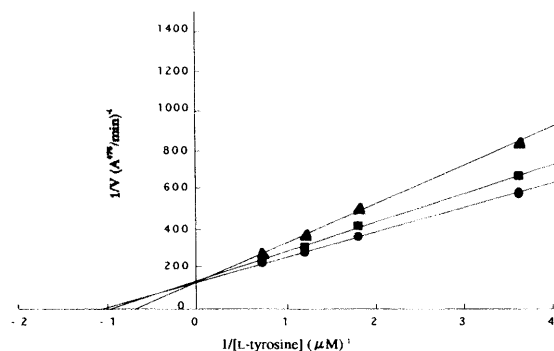


Fig.2. Lineweaver-Burk Plots Showing Inhibitory Effect of *p*-Hydroxybenzoic acid (2) on Tyrosinase

● 0 $\mu\text{g/ml}$ (0 μM), ■ 10 $\mu\text{g/ml}$ (144.9 μM), ▲ 25 $\mu\text{g/ml}$ (362.3 μM)

各地域(国)産のプロポリスの抽出エキス及び, ブラジル産(アレクリン系)プロポリスの起源植物の1つと考えられ artepillin C (12)などのプレニル桂皮酸誘導体を含むする *Baccharis dracunculifolia* DC.²⁰⁾の抽出エキスについて, チロシナーゼの阻害活性の結果を Table 2 に示した. ブラジ

ル産(アレクリン系, ユーカリ系)プロポリス及び *Baccharis dracunculifolia* DC.の葉と枝の抽出エキスは, ブラジル産(パラナマツ系), 中国産, 日本産, オーストラリア産, ウクライナ産, ハンガリー産, ウルグアイ産プロポリスに比べ弱い阻害活性を示した. 我々は前報において¹⁸⁾, ブラジル産プロポリスは, artepillin C (12)や drupanin (11), (*E*)-3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)cinnamic acid (18), (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2*H*-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (14)などが主な成分である桂皮酸誘導体中心のタイプであり, 一方, ブラジル産以外の中国産, オーストラリア産, ヨーロッパ産, ウルグアイ産プロポリスは, chrisin (19)や pinocembrin (27), galangin (23), pinobanksin-3-acetate などが主な成分であるフラボノイド中心のタイプであるという結果を報告¹⁸⁾している. これらのことより, ブラジル産(アレクリン系, ユーカリ系)プロポリスに比べ, 中国やオーストラリア産, ヨーロッパ産などのプロポリスが高い阻害活性を示すのは, 本研究において強い阻害活性を示したフラボノイドの絶対的な含有量の違いが大きいと推測される. また, 同じブラジル産プロポリスでもアレクリン系, ユーカリ系のものはフラボノイド含有量が少なく, パラナマツ系はフラボノイドの含

Table 2 The Tyrosinase Inhibitory Activity of the Extracts from Propolis of Each Country

Propolis of each country	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	Tyrosinase inhibition (%) ^{b)}
Brazilian propolis (Alecrim origin)	57.1	61.16 $\pm$ 0.72
Brazilian propolis (Eucalyptus origin)	72.8	55.76 $\pm$ 0.39
Brazilian propolis (Parana pine origin)	47.2	70.99 $\pm$ 1.00
Chinese propolis	42.9	82.50 $\pm$ 1.58
Japanese propolis	39.9	83.37 $\pm$ 0.50
Australian propolis	49.6	83.05 $\pm$ 0.72
Ukrainian propolis	33.3	76.81 $\pm$ 1.75
Hungarian propolis	28.2	85.71 $\pm$ 1.02
Uruguayan propolis	48.6	74.92 $\pm$ 1.55
Leaf of <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	>100	47.05 $\pm$ 0.89
Branch of <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	80.6	53.20 $\pm$ 0.25

a) 50% inhibitory concentration. b) Each extract was dissolved in 10% DMSO (100 $\mu\text{g/ml}$) before the assay. The percent inhibition of tyrosinase was calculated as described in the experimental section. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments.

有量や種類が共に多いという我々の HPLC 分析結果¹⁸⁾からもこのことが示唆された。

結論

我々は、皮膚の色素沈着の原因であるメラニンの生成過程において、重要な key enzyme であるチロシナーゼの阻害活性を指標として研究を行った。その結果、ブラジル産プロポリスから極めて高い阻害活性を有する artepillin C (12) や (*E*)-3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)-cinnamic acid (18), (*E*)-3-(2,2-dimethyl-8-prenyl-2H-benzopyran-6-yl)-2-propenoic acid (14), 及び kaempferol (24), kaempferide (25) を見いだした。これらは、チロシナーゼ阻害物質として現在、美白剤に最も使われている kojic acid や ascorbic acid より強い阻害活性を示し、美白効果をもたらす物質であることが示唆された。

構造活性相関において、ベンゼン環の 4 位又はフラボノイドの B 環の 4' 位への水酸基若しくはメトキシ基の付加は、チロシナーゼの阻害活性を上昇させる傾向が示された。また、フラボノイドの C 環の 2 位, 3 位の二重結合及び 3 位の水酸基の有無により、フラバノン<フラボン<フラボノールの順で、阻害活性を高める傾向が示された。更に、2 つのプレニル基の付加や、フラボノイドの 7 位の水酸基の存在は、チロシナーゼの阻害活性を高めるのに重要な役割を果たしていることが明らかになった。

各地域(国)産プロポリスにおいて、ブラジル産(アレクリン系, ユーカリ系)は、中国やオーストラリア, ヨーロッパ産などに比べ弱い阻害活性を示したが、これは含有成分の違い、特に高い阻害活性を示した種々のフラボノイドの含有量と種類によるものと推測された。

プロポリスは、抗菌作用や抗酸化作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用など数多くの薬理学的効果が知られており、ヨーロッパなどでは皮膚の疾患などにもプロポリスが使われている¹⁷⁾。紫外線は皮膚への色素沈着と共に、発赤、疼痛、腫脹、血管透過性亢進などの炎症反応も引き起こすが、プロポリスの多岐にわたる効果から、還元

メラニンの酸化抑制や、このような炎症反応にも有効であるのではないかと期待される。今後、培養細胞を用いたメラニン生成抑制試験や紫外線惹起色素沈着抑制試験並びに、紫外線紅斑試験など抗炎症作用を含めた総合的なプロポリスの評価が望まれる。

謝辞：本研究にあたり、フラボノイド標準品およびプロポリスに関する情報をご提供いただきました本学食品栄養科学部食品機能学研究室中山勉教授、熊澤茂則博士に深謝いたします。またプロポリスの試料の一部をご供与いただきました日本プロポリス協議会に感謝いたします。

引用文献

- 1) Sato Y., "Shigaisen Ga Watashitachi Wo Neratteiru" ed. by Nihon Yakugakkai, Maruzen, Tokyo, 1999, pp.2-18.
- 2) Oikawa A., *Seikagaku*, **48**(9), 872-888 (1976).
- 3) Matsuda H., Sato N., Ido Y., Iinuma M. and Kubo M., *Nat. Med.*, **52**(3), 226-231 (1998).
- 4) Iida K., Hase K., Shimomura K., Sudo S., Kadota S. and Namba T., *Planta Med.*, **61**, 425-428 (1995).
- 5) Matsuda H., Nakamura S. and Kubo M., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**(10), 1417-1420 (1994).
- 6) Shiota S., Miyazaki K., Aiyama R., Ichioka M. and Yokokura T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**(2), 266-269 (1994).
- 7) Fukushima M. and Kimura S., *Shoyakugaku Zasshi*, **43**(2), 142-147 (1989).
- 8) Takagi K., Shimomura K., Koizumi Y., Mitsunaga T. and Abe I., *Nat. Med.*, **53**(1), 15-21 (1999).
- 9) Shimizu K., Kondo R. and Sakai K., *Planta Med.*, **66**, 11-15 (1999).
- 10) Kubo I. and Kinst-Hori I., *Planta Med.*, **65**, 19-22 (1999).
- 11) Matsuo K., Kobayashi M., Takuno Y., Kuwajima H., Ito H. and Yoshida T., *Yakugaku Zasshi*, **117**(12), 1028-1032 (1997).

- 12) Kubo I., Yokokawa Y. and Kinst-Hori I., *J. Nat. Prod.*, **58**(5), 739-743 (1995).
- 13) Misasa H., Matsui Y., Uehara H., Tanaka H., Ishihara M. and Shibata H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**(10), 1660-1661 (1992).
- 14) Tazawa S., Warashina T., Noro T. and Miyase T., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**(9), 1477-1479 (1998).
- 15) Tazawa S., Warashina T. and Noro T., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**(10), 1388-1392 (1999).
- 16) Burdock G.A., *Food Chem. Toxicol.*, **36**(4), 347-363 (1998).
- 17) Mateescu C., *Mitsubachi Kagaku*, **20**(2), 53-63 (1999).
- 18) Tazawa S., Warashina T. and Noro T., *Nat. Med.*, **54**(6), 164-168 (2000).
- 19) Okamura N., Hine N., Harada S., Fujioka T., Mihashi K. and Yagi A., *Phytochem.*, **43**(2), 495- 498 (1996).
- 20) Bankova V., Boudourova-K., Sforcin J.M., Frete X., Kujumgiev A., Maimoni-Rodella R. and Popov S., *Z. Naturforsch.*, **54C**, 401-405 (1999).