

新鮮クワ葉の単細胞化製剤の抗糖尿病作用

久保道德^{*a}, 井戸康子^a, 松田秀秋^a, 三上 仁^b近畿大学薬学部^a, フェニックス製薬(株)^bAnti-Diabetic Effect of Protoplast Preparation
from Fresh Leaves of Mulberry (*Morus alba*)Michinori KUBO^{*a}, Yasuko IDO^a, Hideaki MATSUDA^a, Hitoshi MIKAMI^b^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577-8502, Japan^b Phenix Pharmacy Co. Ltd., 5-3-15, Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0022, Japan

(Received February 26, 2001)

Anti-diabetic effect of protoplast preparation (MA-pp) from fresh leaves of mulberry (*Morus alba*) was investigated in experimental models. MA-pp at doses of 200, 500 mg/kg inhibited the increase of blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. For examining the mechanism of the action, MA-pp was examined for insulin-like or antilipolytic activity. MA-pp suppressed adrenaline- or noradrenaline-induced lipolysis in fat cells from rat epididymal adipose tissues. Their efficacy of MA-pp was superior than that of 50% ethanol extract from the dried leaves of *Morus alba*.

Keywords : *Morus alba* ; protoplast ; anti-diabetic effect ; blood glucose ; insulin-like effect

クワ科のクワ *Morus spp.* は中国原産で、古くから栽培されており、我が国ではその根皮を「桑白皮」と称し、『第十三改正日本薬局方』¹⁾に鎮咳去痰薬として収載されている。桑白皮にはペペリジン型アルカロイドの 1-deoxynojirimycin (moranoline)^{2,3)}, フラボノイドの morusin⁴⁾, kuwanon⁵⁻¹¹⁾などが含まれ、そのエキスを鎮痛作用¹²⁾, 血圧降下作用¹³⁾, 抗炎症作用¹⁴⁾, 血糖降下作用¹⁵⁾などの薬理活性が報告され、また、その血糖降下作用成分として 1-deoxynojirimycin (moranoline)¹⁶⁾, moran A¹⁷⁾が明らかにされている。

葉は主に蚕の飼料に供される一方、医・本草学的考証から、葉、果実も薬用利用されていたようである。葉にはポリフェノールが多く含まれ、カルシウム、鉄などのミネラルの他にビタミン類なども多く含まれ¹⁸⁾, 抗高脂血症作用¹⁹⁾, 血糖降下作用^{14, 20)}, 二糖類の吸収抑制作用^{21, 22)}, α -グルコシダーゼ活性の阻害作用²³⁾などが報告されている。近年、生活習慣病の予防・改善を目的に、民間では健康茶として飲用され、機能性食品として期待されている素材である。

今回、我々の研究グループがクワ葉の単細胞化に成功し、さらに大久保らはXYZ系微弱発光法²⁴⁾を用いて活性酸素消去能を測定したところ、単細胞化クワ葉細胞に極めて強いSOD様作用を認めた(未発表)。本研究においては、このような方法で調製された単細胞化クワ葉細胞と一般的な方法で乾燥し、調製されたクワ葉抽出エキスの抗糖尿病作用を種々の実験モデルを用いて検討した。

本 論

1. 桑葉の医・本草学的考証

まず、桑葉の古来の用法を医・本草書を用いて精査した。中国では、漢の時代から桑葉を薬用に供し、唐代の『食療本草』²⁵⁾には「桑葉を茶に代えて飲めば、渴を止める」と記されている。「渴」とは糖尿病に伴う喉の渇きを意味しており、その頃から糖尿病に用いられていたようである。宋代の蘇頌は『本草図経』²⁶⁾に、「桑葉は常に服用される。四月に桑の葉が茂盛した

ときに採集し、神仙薬とする。粉末にして服用するか、水で煎じてお茶に代えて飲んでもよい」とあり、明代の『本草綱目』²⁶⁾には李時珍の意見として「桑葉は、茗(めい; お茶のこと)に代えれば、能く消渴を止める」と述べている。また、わが国では鎌倉時代に中国へ留学した経験のある栄西禅師は『喫茶養生記』²⁷⁾の中で、「桑葉を粉末にし、お湯を注ぎ、茶筴で立てて飲むと飲水病(糖尿病のこと)、中風、不食病、などによい」と述べ、桑葉をわが国の茶法の一つとして広めた。

以上のことから、クワ葉は消渴の病、すなわち糖尿病の予防・治療に用いられたことがうかがえる。特に、栄西禅師は桑葉を煎じると効果が低下するので、粉末をお湯に溶いて飲んだ方が効果的であると述べている。

2. ストレプトゾトシン誘発糖尿病

クワ葉の抗糖尿病作用については、宮原ら²⁰⁾はクワ葉混合飼料を自然発症糖尿病ラット(WBN/Kob雄性ラット)に摂取させ、血糖上昇抑制作用を見出している。また、同動物を用いて糖負荷試験が行われ、インスリンレベルが経時的に上昇することを見出している。さらに、満腹中枢破壊薬誘発肥満モデルにおいて血糖低下作用を見出し、さらに糖負荷試験において血糖値上昇の抑制およびインスリンレベルの上昇を見出している²³⁾。また、 α -グルコシダーゼ活性の阻害およびラット小腸からの二糖類の吸収阻害作用成分として1-deoxynojirimycinが報告²²⁾されている。

一方、李時珍や栄西禅師は桑葉を煎じて服用するよりも、粉末にして服用する方がより効果的であると述

べている。このことから、単細胞化クワ葉は通常の方法で乾燥したクワ葉よりもより効果的に抗糖尿病作用を発現する可能性が示唆される。そこで、島根県産の新鮮クワ葉から調製した単細胞化クワ葉と同産地のクワ葉を通常の方法で乾燥し、抽出したクワ葉エキスの抗糖尿病作用を比較検討した。

新鮮クワ葉に細胞間物質分解酵素を加え、攪拌して得た単細胞化クワ葉細胞懸濁液を凍結乾燥(以下、MA-ppと略記する)し、ラット体重1 kgあたり200, 500 mgの用量を4 mlの水に用時懸濁して経口投与した。乾燥クワ葉エキスは50%エタノール熱時抽出エキス(以下、MA-extと略記する)で、MA-ppと同様の方法で実験動物に経口投与した。

ラットに糖尿病誘発剤としてstreptozotocin (STZ)を50 mg/kgの用量で静脈内投与すると、2日後から体重が減少し、以後も漸次減少した(STZ処置直前の体重が30日間で50-60 g減少した)。MA-pp, MA-ext投与群にはその減少を抑制する作用が認められなかった。

血糖値はFig. 1に示したごとく、STZ処置2日後において無処置群のそれに比して約4倍に上昇し、それは30日後まで徐々に上昇した。

MA-ppは200 mg/kg用量においては10日後の血糖値の上昇を有意に抑制し、500 mg/kg用量では10および30日後の血糖値の上昇を有意に抑制した。一方、MA-extは500 mg/kg用量において10日後の血糖値の上昇を有意に抑制した。しかし、30日後のそれに対しては抑制傾向であった。

糖尿病は種々の随伴症状を誘発する疾患といわれている。そこで、血糖値以外にTable 1に示した血液

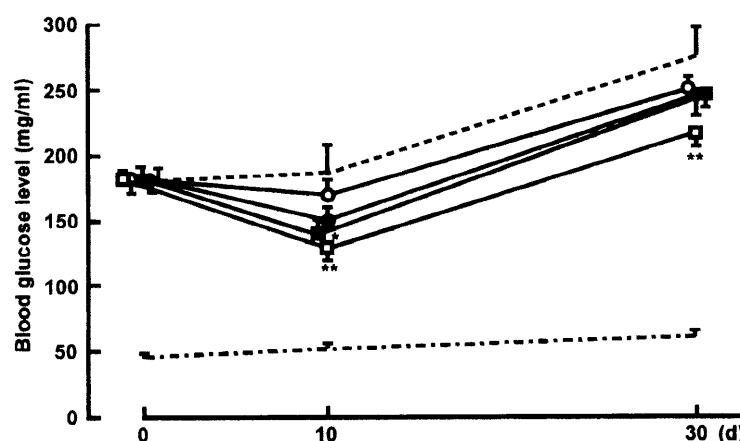


Fig. 1 Effects of 50% Ethanol Extract (MA-ext) and Protoplast Preparation (MA-pp) from Leaves of *Morus alba* on Changes of Blood Glucose Level in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Rats

--- : Normal, --- : Control, ● : MA-ext 200 mg/kg, ■ : MA-ext 500 mg/kg, ○ : MA-pp 200 mg/kg, □ : MA-pp 500 mg/kg.

Diabetes mellitus were induced by intravenously injection of 50 mg/kg of streptozotocin into the tail of the Wistar strain rats after 18 h fasting. After 2 d, each drug was given orally for 30 d once time/d. Blood sample were withdrawn from abdominal vein at 1 h after the administration and blood glucose level were measured. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 7-9 rats. Significantly different from the control group at * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

学的パラメータをを測定した。肝障害を反映するアスパラギンアミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アルカリフォスファターゼ (ALP), コリンエステラーゼ (ChE) 活性が上昇し, 肝, 腎機能障害を反映する総タンパク (TP), アルブミン (Alb) 値が低下した。また, 腎機能障害や消化管出血を反映する尿素窒素 (BUN) 値は上昇した。糖尿病罹患時に増加するといわれる中性脂肪 (TG) 値は上昇傾向, 総コレステロール (T-Ch) 値は増加した。HDL-コレステロール (HDL-C) 値および LDL-コレステロール (LDL-C) 値も上昇した。尿酸 (UA) 値は上昇する傾向を示した。遊離脂肪酸 (NEFA) 値

は低下した。これらの血液学的パラメータ値の変動から, 肝臓, 腎臓機能を含めた代謝系機能の異常が推察される。

MA-ppは500 mg/kg用量でALP活性の上昇を有意に抑制し, AST, ALTおよびChE活性の上昇を抑制する傾向を示した。TG, T-Ch, HDL-C値の上昇も有意に抑制し, LDL-C 値の上昇を抑制する傾向を示した。NEFA値の低下に対してはさらに低下させた。これらの血液学的パラメータ値の変動に対してMA-ppはMA-extよりも高い抑制作用を示した。よって, 糖尿病に伴う諸症状に対してもMA-ppにMA-extよりも高い有効性が期待される。

Table 1 Effects of 50% Ethanol Extract (MA-ext) and Protoplast Preparation (MA-pp) from Leaves of *Morus alba* on Serum Biochemical Parameters in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Rats

Treatment	Dose (mg/kg)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	ChE (Δ pH $\times$ 100)
Normal	—	123.4 $\pm$ 5.5	51.0 $\pm$ 2.9	365.9 $\pm$ 10.9	1.8 $\pm$ 0.2
Control	—	1120.5 $\pm$ 193.9 [#]	478.9 $\pm$ 61.3 [#]	2465.5 $\pm$ 347.0 [#]	2.7 $\pm$ 0.3
MA-ext	200	1050.3 $\pm$ 212.8	486.3 $\pm$ 103.7	1968.0 $\pm$ 106.4	2.9 $\pm$ 0.4
	500	1039.0 $\pm$ 294.5	462.8 $\pm$ 123.3	1929.6 $\pm$ 243.3	2.3 $\pm$ 0.3
MA-pp	200	920.0 $\pm$ 225.0	397.9 $\pm$ 83.2	1745.5 $\pm$ 153.3*	2.5 $\pm$ 0.4
	500	765.8 $\pm$ 185.0	374.8 $\pm$ 102.3	1793.7 $\pm$ 153.9*	1.7 $\pm$ 0.3

Treatment	Dose (mg/kg)	T-Bil (mg/dl)	I-Bil (mg/dl)	D-Bil (mg/dl)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)
Normal	—	0.20 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	4.8 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1
Control	—	0.20 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	4.2 $\pm$ 0.1 [#]	1.8 $\pm$ 0.1 [#]
MA-ext	200	0.23 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02*	0.10 $\pm$ 0.00	4.2 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1
	500	0.21 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00	4.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0
MA-pp	200	0.20 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	4.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1
	500	0.21 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00	4.3 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1

Treatment	Dose (mg/kg)	BUN (mg/dl)	UA (mg/dl)	TG (mg/dl)	NEFA (μ Eq/L)
Normal	—	17.5 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.1	24.1 $\pm$ 1.3	902.0 $\pm$ 74.2
Control	—	97.8 $\pm$ 12.8 [#]	2.0 $\pm$ 0.4	72.2 $\pm$ 15.4 [#]	451.8 $\pm$ 62.1 [#]
MA-ext	200	80.1 $\pm$ 6.0	2.0 $\pm$ 0.6	70.5 $\pm$ 11.4	494.0 $\pm$ 74.2
	500	86.6 $\pm$ 11.9	1.8 $\pm$ 0.2	45.3 $\pm$ 9.0	552.9 $\pm$ 150.3
MA-pp	200	81.1 $\pm$ 6.9	1.9 $\pm$ 0.3	72.6 $\pm$ 21.0	550.8 $\pm$ 122.0
	500	82.7 $\pm$ 7.2	2.4 $\pm$ 0.5	30.0 $\pm$ 11.9*	275.0 $\pm$ 60.6

Treatment	Dose (mg/kg)	T-Ch (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
Normal	—	70.3 $\pm$ 3.2	35.0 $\pm$ 1.4	4.5 $\pm$ 0.5
Control	—	91.0 $\pm$ 6.2 [#]	52.2 $\pm$ 2.6 [#]	9.6 $\pm$ 1.0 [#]
MA-ext	200	91.6 $\pm$ 5.6	48.0 $\pm$ 1.8	9.6 $\pm$ 1.6
	500	94.0 $\pm$ 7.6	49.9 $\pm$ 3.1	8.9 $\pm$ 1.3
MA-pp	200	79.2 $\pm$ 5.7	43.3 $\pm$ 2.4**	7.3 $\pm$ 1.0
	500	73.7 $\pm$ 7.8*	43.0 $\pm$ 4.2*	8.0 $\pm$ 1.3

Diabetes mellitus were induced by intravenously injection of 50 mg/kg of streptozotocin into the tail of the Wistar strain rats after 18 h fasting. After 2 d, each drug was given orally for 30 d once time/d. Blood sample were withdrawn from abdominal vein at 1 h after the final administration. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 7-9 rats. Significantly different from normal group at [#]: $p<0.05$, [#][#]: $p<0.01$. Significantly different from the control group at *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

3. 脂肪動員試験

脂肪組織は生体内でエネルギー(中性脂肪)の貯蔵と分解を行う臓器で、ヒトでは全重量の約20%を占めることから、生体最大の臓器ともいえる。ヒトや動物は運動や飢餓などにより、生体のエネルギー源であるグルコースが枯渇すると、脂肪細胞内に貯えられた中性脂肪を分解し、遊離脂肪酸をエネルギー源とする。これが脂肪動員である。糖尿病時にも、糖代謝異常が起こり、エネルギー源であるグルコースが不足し、その結果、脂肪細胞内に蓄積された中性脂肪が分解され、遊離脂肪酸(FFA)をエネルギー源とするので体重減少が起こる。

一方、ストレスが負荷されると抗ストレス性のカテコールアミンとしてノルアドレナリン、アドレナリンが副腎から分泌され、脂肪細胞に対しては脂肪動員を誘発する。インスリンはこの脂肪動員を抑制することから、ノルアドレナリン、アドレナリンはインスリン対抗ホルモンとも称される。

ラット副睾丸脂肪組織から調製された脂肪細胞に *noradrenaline*, *adrenaline* を作用させると、Fig. 2 に示したごとく、FFAが遊離した。この系にインスリンを共存させるとFFAの遊離が抑制された。MA-ppおよびMA-extはともに*adrenaline*による脂肪動員を抑制

した。*Noradrenaline*による脂肪動員に対しても、MA-ppは有意な脂肪動員抑制作用を示し、MA-extは抑制傾向を示した。

さらに、MA-ppとMA-extの活性強度をそれぞれの原料である生のクワ葉重量で比較すると、MA-ppはMA-extよりも生葉からの収率が約2倍あることから、同一生葉の活性で比較すると、MA-ppにはMA-extの約2倍の活性が期待できる。

以上のことから、クワ葉には抗糖尿病作用が期待され、その作用は単細胞化することによりその効果が高まることが明らかになった。その詳細な作用機序、有効成分については不明であるが、STZ誘発糖尿病モデルにおいて血糖値の上昇抑制と血液学的パラメータの変動抑制から、その随伴症状の発症を抑制する可能性が見出せたことは、クワ葉を単細胞化することが、単に乾燥しただけのものより、有効成分の損失も少なく、鮮やかなクワ葉の色を保持できることはその薬用および機能性食品としての素材価値を高めていることを強く示唆するものといえる。

また、この単細胞化技術を生葉の修治法に導入することにより、生葉の効果を高めたり、新規な薬効の発現につながるものと思われる。

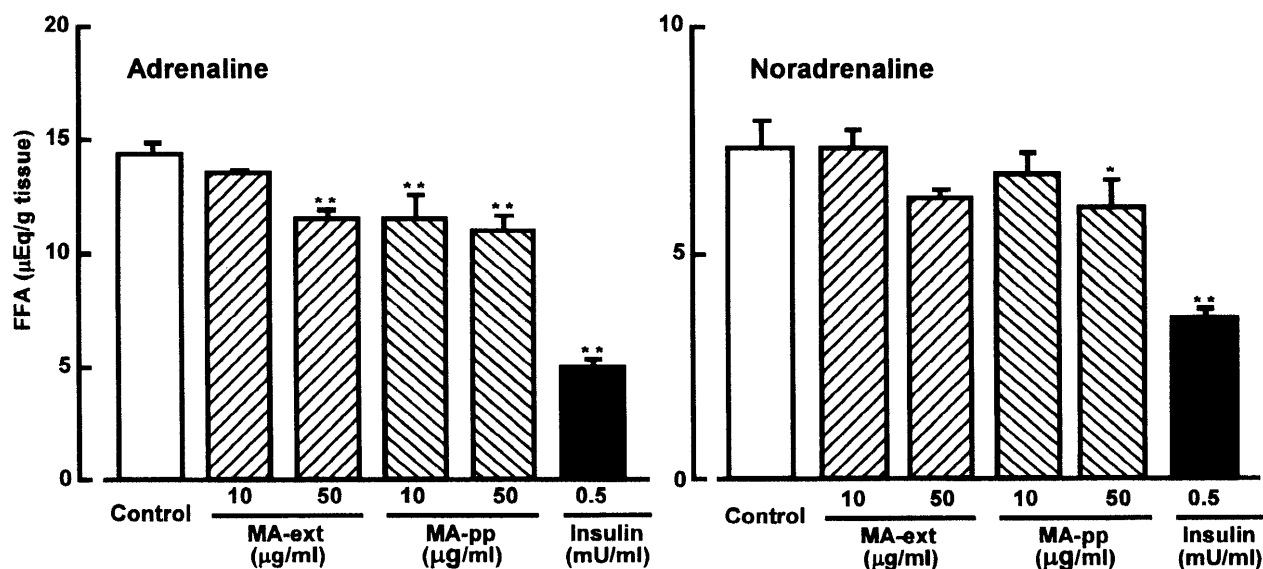


Fig. 2 Effects of 50% Ethanol Extract (MA-ext) and Protoplast Preparation (MA-pp) from Leaves of *Morus alba* and Insulin on Adrenaline- or Noradrenaline-Induced Lipolysis in Rat Epididymal Adipocyte

Adipocyte suspension were prepared from rat epididymal adipose tissue by the procedure of Rodbell. A mixture of adipocyte suspension (equivalent to 100 mg of adipose tissue), 1.0 μg of adrenaline or noradrenaline and test samples were incubated at 37°C for 2 h in a final volume of 1 ml HBSS (pH 7.4) containing 2.5% albumin. Free fatty acid was measured by NEFA Test Wako. Each value represents the mean ± S.E. of 5 experiments. Significantly different from the control group at *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

実験の部

1) 被検体の調製: クワ葉の単細胞化は下記のごとくに行った。1999年4月, 島根県邑智郡桜井町で栽培された新鮮クワ葉 (5630 g) を水洗後, ロウ質を除去するために40~50℃の0.5%水酸化ナトリウム水溶液中で3分間攪拌浸漬した。アルカリ除去するために水洗し, 90~95℃の温湯中で2分間プランチング後, 直ちに水冷し, 1~2 cm幅に細切した。細切したクワ葉に水8690 g, 細胞間物質分解酵素としてprotopectinaseを70 g加え, 25℃前後で3時間攪拌した。反応液を20メッシュの篩に通し, 残渣とろ液に分別した。残渣を20メッシュのナイロン袋にて圧搾脱汁し, 両者を合わせたものを単細胞化クワ葉懸濁液とした。単細胞化クワ葉懸濁液は濃緑色の液体で, pH 7.0であった。また, 懸濁液を顕微鏡下で観察すると, 細胞同士が接着することなく, 完全に分離していることが確認でき (Fig. 3), 細胞数はトーマの血球計を用いて測定すると, 懸濁液1 ml中に 10^6 個存在した。なお, 実験に際しては懸濁液を凍結乾燥して得た粉末 (MA-pp, 568 g) を用時溶媒に懸濁して用いた。

また, 同産地, 同時期に収穫した新鮮クワ葉を水洗後, 細切し, 日陰で乾燥させた乾燥クワ葉400 gを20倍量の50%エタノールにて, 80℃, 2時間2回抽出した後, 熱時ろ過し, 減圧下でエタノールを留去した。その後, 凍結乾燥を施し, エキス末 (MA-ext, 114 g) を得た。生葉あるいは乾燥葉からのそれぞれの収率はTable 2に示した。

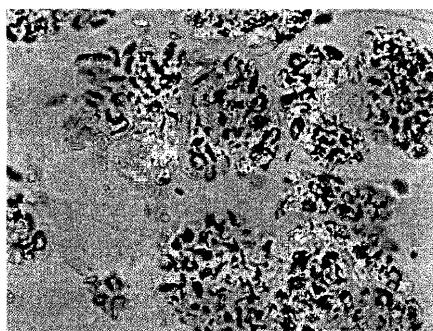


Fig. 3 Photograph of Protoplast Suspension Prepared from Leaves of *Morus alba*

Table 2 Yield of 50% Ethanol Extract (MA-ext) and Protoplast Preparation (MA-pp) from Fresh Leaves of *Morus alba*

Sample	Yield (%)	
	Dry leaves	Fresh leaves
50% Ethanol Extract (MA-ext)	28.4	4.7
Protoplast Preparation (MA-pp)	—	10.1

2) 試薬: 試薬にはbovine serum albumin (Fr. V, BSA), collagenase (Type II), insulin (bovine pancreas), streptozotocin (STZ, Sigma), グルコースCII-テストワコー, NEFA-テストワコー (和光純薬工業), ボスミン®注 (adrenaline, 第一製薬), ノルエピネフリン® (noradrenaline, 三共) を用いた。

3) 実験動物: 実験動物にはSlc: Wistar系雄性ラット (170-180 g, 180-200 g) を用いた。飼育環境は恒温恒湿, 12時間明/12時間暗のサイクルの実験動物飼育室で, 市販の固形飼料 (ラボMRストック, 日本農産) を用い, 自由に水を摂取させ, 購入後, 実験に供するまで, 1週間予備飼育し, 健常なものを用いた。

4) STZ誘発糖尿病モデルの作成²⁸⁾: 18時間絶食したWistar系雄性ラット (7週齢, 180-200 g) にSTZ (pH 4.5, クエン酸緩衝液に溶解) を50 mg/kgの用量で静脈内投与した。その2日後に尾静脈から採血し, 各群の血糖値の平均値がほぼ同等になるように再群構成した後, 被検体の経口投与を開始し, 1日1回30日間, 連日経口投与した。体重は3日間隔で測定した。また, 血糖値の変動を観察するために, 投与開始10日後に尾静脈から採血し, 空腹時血糖値を測定した。さらに, 最終投与の1時間後にpentobarbital (44.2 mg/kg, i.p.) 麻酔下で腹部大静脈から採血し, 血漿および血清を分離し, 血糖値 (血漿グルコース量) はグルコースCII-テストワコーを用いて測定した。

また, AST, ALT, ALP, ChE, 総ビリルビン (T-Bil), 間接ビリルビン (I-Bil), 直接ビリルビン (D-Bil), TP, Alb, BUN, TG, T-Ch, HDL-CおよびUAは多項目自動分析装置オリンパスAU5200を用い, LDL-CおよびNEFAは多項目自動分析装置オリンパスAU800を用いて測定した。

5) ラット副睾丸脂肪細胞を用いた脂肪動員試験

1) ラット副睾丸脂肪組織からの脂肪細胞の調製: Rodbell²⁹⁾の方法に準じて行った。すなわち, Wistar系雄性ラット (6週齢, 170-180 g) の精巣上体 (副睾丸) の脂肪組織を摘出し, 重量を測定後, 細切

し、4% BSA, collagenase (3 mg/ml) を含む Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, pH7.4) 2.5 ml/ g tissue となるように加え、37℃で1.5時間インキュベートし、組織を消化した後、250 μ m のナイロンメッシュにてろ過し、遠心分離 (25℃, 500 rpm, 30 sec) し、脂肪細胞を得た。その脂肪細胞を 37℃に保温した collagenase 不含 HBSS (4% BSA を含む) を用いて、3 回遠心洗浄 (25℃, 500 rpm, 30 sec) し、2.5% BSA 含有 HBSS に 400 mg tissue/ml となるように懸濁し、脂肪細胞懸濁液とした。

2) 脂肪動員試験³⁰⁾: 脂肪細胞懸濁液 0.25 ml に 4% BSA を含む HBSS 0.25 ml, 被検体 (HBSS に溶解) 0.25 ml および adrenaline あるいは noradrenaline (最終濃度: 1.0 μ g/ml) 0.25 ml を添加し、37℃, 2 時間インキュベートし、脂肪分解反応液中の遊離脂肪酸 (FFA) 量を NEFA-テストワコーを用いて測定した。

6) 統計学的処理

実験結果は平均±標準誤差で表し、有意差検定には Bonferroni/Dunn の多重比較検定 (Multiple range test) を用いた。

引用文献

- 1) Nihon Kouteisho Kyokai, "The 13th Japanese Pharmacopeia Kaisetsusho", Hirokawa Publishing Co. Ltd., Tokyo, 1996, pp. D-629-631.
- 2) Yoshikuni Y., *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 121-128 (1988).
- 3) Yagi M., Kawano T., Aoyanagi Y., Murai H., *Nippon Nogei-kagaku Kaishi*, **50**, 571-572 (1976).
- 4) Nomura T., Fukai T., Yamada S., Katayanagi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1394-1402 (1978).
- 5) Nomura T., Fukai T., Tatayanagi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1453-1458 (1978).
- 6) Nomura T., Fukai T., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2548-2552 (1980).
- 7) Hano Y., Hirakura K., Nomura T., Terada S., Fukushima K., *Planta Med.*, **50**, 127-130 (1984).
- 8) Hano Y., Takizawa S., Mizuno E., Nomura T., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2936-2939 (1983).
- 9) Hirakura K., Hano Y., Fukai T., Nomura T., Uzawa J., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1088-1096 (1985).
- 10) Hirakura K., Fukai T., Hano Y., Nomura T., *Phytochemistry*, **24**, 159-161 (1985).
- 11) Hano Y., Tsubura H., Nomura T., *Heterocycles*, **24**, 2603-2610 (1986).
- 12) Yamatake Y., Shibata M., Nagai M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **26**, 461-469 (1976).
- 13) Nomura T., *JUSHP*, **30**, 1462-1463 (1994).
- 14) Chatterjee G. K., Burman T. K., Nagchaudhuri A. K., *Planta Med.*, **48**, 116-119 (1983).
- 15) Chen F., Nakajima N., Kimura I., Kimura M., *Yakugaku Zasshi*, **115**, 476-482 (1995).
- 16) Yoshikuni Y., *TIGG*, **3**, 184-192 (1991).
- 17) Hikino H., Mizuno T., Oshima Y., Konno C., *Planta Med.*, **51**, 159-161 (1985).
- 18) Noda S., *Food Style*, **21(2)**, 50-55 (1998).
- 19) Doi K., Kojima T., Harada M., Horiguchi Y., *NESGDC*, **47**, 15-22 (1994).
- 20) Miyahara C., Sato S., Miyazawa M., Kishi M., Sakai A., Abstracts of papers, 118th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March, 1998, No. 2, p. 120.
- 21) Sato S., Miyazawa M., Miyahara C., Kishi M., Shimura S., Sakai A., Abstracts of papers, 117th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March, 1997, No. 2, p. 142.
- 22) Sato S., Miyazawa M., Miyahara C., Kishi M., Sakai A., Abstracts of papers, 118th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March, 1998, No. 2, p. 120.
- 23) Yamada H., Oya I., Nagai T., Matsumoto T., Kiyohara H., Omura S., *Syoyakugaku Zasshi*, **47**, 47-55 (1993).
- 24) Okubo K., Yoshiki Y., *Japan Food Science*, **38(8)**, 18-21 (1999).
- 25) Tang S., "Zhouxiuzhenghe Jingshizhenglei Beiyong Bencao (1108)", Kan 13 Mokubu Chubon, Jinmin Eisei Shuppansha Beijing, 1957, p. 315.
- 26) Li S., "Bencao Gangmu (1596)", Kan 36 Mokubu, Bencao Gangmu (6), Orieno Shuppansha, Osaka, 1992, p. 12.
- 27) Hayashi S., Yasui K., "Cha Kyo", Meitoku Syuppan, Tokyo, 1974, pp. 201-202.
- 28) Ichikawa A., Oka T., "Experimental Manuals for Bio-pharmaceutical Sciences 9, Hormones and Biological Active Compounds I", Hirokawa Publishing Co. Ltd., Tokyo, 1996, pp. 111-119.
- 29) Rodbell M., *J. Biol. Chem.*, **239**, 375-380 (1964).
- 30) Nihon Seika Gakkai, "Seikagaku-Jikken-Kozo 9, Shishitsu No Taisya" ed. by Okuda H., Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1975, pp. 461-465.