

大阪薬科大学紀要

2009 Vol.3

Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences **3**



大阪薬科大学
Osaka University of Pharmaceutical Sciences

大阪薬科大学紀要

2009 Vol.3

Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences **3**



大阪薬科大学
Osaka University of Pharmaceutical Sciences

大阪薬科大学紀要

Vol.3 (2009)

目次

第1部 (総合科学系)

論文

言語科学の今日的課題をめぐって-----藤 本 幸 治 9

「ジェンダーの倫理学」の可能性について -----伊 藤 信 也 19

水球競技の初心者指導2 -----当 麻 成 人 31

第2部 (薬学系)

論文

Synthetic Study of 4-Aza-4-deoxypodophyllotoxins
-----有 本 正 生, 宮 本 篤 史, 中 山 博 文, 岡 野 正,
三 好 晴 子, 岩 井 亜寿沙, 山 中 昌 子, 平 野 史 恵,
田 坂 文 香, 大 黒 亜 美, 市 川 隼 人, 宇佐美 吉 英 39

New lanostane triterpenoids, inonotsutriols D, and E from *Inonotus obliquus*
-----中 田 智 子, 田 路 さやか, 山 田 剛 司, 田 中 麗 子 53

総説

ヒスタミン H₄ 受容体リガンドの開発とその現状-----春 沢 信 哉, 荒 木 理 佐 65

錐体外路系運動障害治療におけるセロトニン 5-HT_{1A} 受容体の役割
-----大 野 行 弘, 清 水 佐 紀, 今 木 淳 太 79

天然物由来食品・医薬品原料の電子線殺菌処理に関する研究
ー電子スピン共鳴による照射処理生薬の検知ー -----山 沖 留 美 91

虚血性急性腎不全における性差発現に関する研究
-----高 山 淳 二, 高 岡 昌 徳, 松 村 靖 夫 101

虚血性急性腎不全の発症における腎交感神経系の役割に関する研究
-----藤 井 俊 秀, 高 岡 昌 徳, 松 村 靖 夫 111

LPS および CpG-DNA 投与ラットにおける digoxin 体内動態の変動
-----加 藤 隆 児, 井 尻 好 雄, 田 中 一 彦 119

The Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences
Vol. 3 (2009)

CONTENTS

Part I (General Sciences)		
Articles		
Contemporary Problems Relating to the Nature of Human Language -----	Koji FUJIMOTO	9
On the Possibility of “an Ethics of Gender Equality” -----	Shinya ITO	19
Coaching for Beginners in Water Polo 2 -----	Narihito TAIMA	31
Part II (Pharmaceutical Sciences)		
Articles		
Synthetic Study of 4-Aza-4-deoxypodophyllotoxins -----	Masao ARIMOTO, Atsushi MIYAMOTO, Hirofumi NAKAYAMA, Tadashi OKANO, Haruko MIYOSHI, Azusa IWAI, Masako YAMANAKA, Fumie HIRANO, Ayaka TAsAKA, Ami OHGURO, Hayato ICHIKAWA, and Yoshihide USAMI	39
New Lanostane Triterpenoids, Inonotsutriols D, and E from <i>Inonotus obliquus</i> -----	Tomoko NAKATA, Sayaka TAJI, Takeshi YAMADA, and Reiko TANAKA	53

Reviews	
Development of Histamine H ₄ Receptor Ligands and its Current Situation -----	Shinya HARUSAWA and Lisa ARAKI 65
Therapeutic Role of 5-HT _{1A} Receptors in Treating Extrapyramidal Motor Disorders -----	Yukihiro OHNO, Saki SHIMIZU, and Junta IMAKI 79
Studies on Sterilization Technology by Electron Beam Radiation of Natural Food or Raw Pharmaceutical Material —Detection of Electron Beam Irradiated Crude Drugs by Electron Spin Resonance— -----	Rumi YAMAOKI 91
Studies on the Sex Difference in Ischemic Renal Failure -----	Junji TAKAYAMA, Masanori TAKAOKA, and Yasuo MATSUMURA 101
Studies on the Role of Renal Sympathetic Nervous System in the Pathogenesis of Ischemic Acute Renal Failure -----	Toshihide FUJII, Masanori TAKAOKA, and Yasuo MATSUMURA 111
Effects of LPS and CpG-DNA on Digoxin Pharmacokinetics -----	Ryuji KATO, Yoshio IJIRI, and Kazuhiko TANAKA 119

旧＜教養論叢＞

はいぶあ

通巻 Vol. 30

大阪薬科大学紀要 Vol.3 (2009)

第 1 部 (総合科学系)

Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences

3 (2009)

Part I (General Sciences)

「ばいであ」題字：石川九楊

言語科学の今日的課題をめぐって

藤本 幸治

Contemporary Problems Relating to the Nature of Human Language

Koji FUJIMOTO

Kyoto University of Foreign Studies, 6, Kasame-cho, Saiin, Ukyo-ku, Kyoto 615-8558, Japan

(Received October 23, 2008)

In this paper we will reconsider, by looking at the 50-year history of Generative Syntax, some important problems relating to the nature of human language. As is often the case with other natural sciences, linguistic theories too must be able to stand up to empirical evidence from areas other than linguistics itself. Hence, we must pay more attention to the study of language and mind.

Key words—merge; legibility; the origin and evolution of language

0: はじめに

人間言語の研究が全ての人間活動を対象とする研究の礎となることに間違いはない。では、人間の言語にはどのような研究対象としての可能性が秘められていて、どのような可能なアプローチが存在するであろうか。言葉そのものの構成要素は、思考媒体である「意味」とその具現媒体である「音」、そしてその両者を繋ぐ媒介としての形式、つまり文法（統語）がある。「小言語学」とは、一般にこの「意味」、「音」、「文法」を中核的言語構成素とみなし、それをミクロ的に分析する。一方、言語の活動は、人間活動に常に付随することから、人間の心理や社会活動、あるいは、外国語教育などへの応用も言語の研究射程に入れる「大言語学」の存在も軽視できない。

しかしながら、どのようなアプローチをとって言語研究を行おうとも本質的な意義には大別はないように思う。なぜならば、いずれの研究目標（それは、言語の獲得面でも運用面でもかまわないが）

においても、人間の言語の特徴を明示化することであるからだ。

そのために最も大切なことは、いうまでもなく研究対象である人間（自然）言語への注意深い観察である。次に、その観察対象から発見できる言語事実を的確に記述し、規則化することが求められる。

近代言語学、特に理論言語学を中心とする自然言語を自然科学の産物としてとらえ、科学的アプローチによって自然言語の本質を明らかにしようとするプログラムにおいては、他の自然科学と同様、これらの発見された規則体系を生み出す原理原則の説明が要求されている。

ノーム・チョムスキーによって提唱された「生成文法理論」もまた、小言語学の中核的課題である第1次言語習得に関する問題の解決や、言語生成面における記述的規則体系の完成とその体系を可能にせしめている原理原則の発見に半世紀を注いできた。

本稿では、生成文法理論を元に、転移と局所条

件，および句構成の観点から自然言語の解析法を見直し，言語研究における説明的妥当性と最適性についての問題を検証するとともに，言語研究の周辺領域も含めた理論言語学における今日的課題と新たな展開の可能性を示していきたい。

1：局所条件と転移

人間言語に見られる表象現象で最も顕著なものが，転移 (displacement) 現象であろう．これは，例えば，転移対象になるターゲット α が，被転移地である β に移動する場合に以下のような手順で起こる．

Type A	β [α]		γ	α [t]
Type B	α [t]		γ	β [α]
Type C	[α/β]		γ	[β/α]

Type A の場合，言語の表層構造において，品詞の転移が，右から左方向に起こっていることを示している．対して，Type B においては，転移が左から右方向へ起こることを示している．Type C は， α がベータの位置に， β が α の位置に転換されていることを示している．

いずれのタイプの場合も，2 要素間の局所性が保証され転移が発生可能な条件は，「 α と β 間に，これらの 2 要素を関係付ける経点 γ が存在し，かつ， γ は α または， β の素性と干渉する障害であってはいけない」ということである．

具体的には，Type A および Type B は，派生言語形態を規範構造として採る英語のような言語に，一方，Type B は，屈折言語形態を規範構造とする日本語のような言語に顕著に現れる．

Type A: <u>Who</u> do you like ? / <u>Tom</u> was kissed by Mary.	
β [α]	β [α]

Type B: I sent to him <u>the book he had wanted for</u>	
β [α]	
<u>a long time.</u>	
(β [α])	

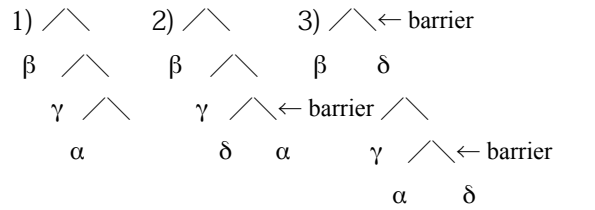
Type C: <u>Watashi-ga taro-wo</u> sukida. /	
α	β
<u>Taro-wo watashi-ga</u> sukida.	
β	α

生成文法では，これらの転移の特性をおおよそ以下に示す認可条件として規定した¹．

1) 転 移 範 囲 に 関 す る 規 定 (Condition for Subjacency)
「 α が β に転移する場合， α と β 間に障害点が存在する場合，転移は派生しない」
例) * _{β} [Who] do you think that [α] will love the hero?

2) 転 移 発 生 に 関 す る 規 定 (Condition for Governments)
「 α が β に転移する場合，障害点があるにもかかわらず，2 要素間の関係を保証するための経点 が別に認められる場合，転移は可能である」
例) _{β} [Who] do you think that the hero will love [α]?

1), 2) とともに英語の例であるが，1) については，埋め込み節の一部である that が同質の品詞として，転移要素 who に干渉することから転移が不可能となる．対して，2) においては，同じく who に that が干渉するにもかかわらず，転移は可能であることが観察される．これらを 2 次元的に図式化すると以下ようになる．



1. ここでの認可条件は，「下接の条件」，「統率」の概念に基づくが，それら本来の定義を採用していない．これらの厳密な定義と詳細については，Chomsky(1981) を参照のこと．

ここに観察される非対称性は，転移要素である α の元位置と関係がある．具体的に見ると，1) と 2) を対比して観察すると，2) の場合， α の転移を保証する環境として δ の存在が確認される． δ の特性は，1. 句の主要部であること，2. 句の左側に存在すること，3. 動詞という語彙素性を持つこと，が挙げられる．これらの複合素性が， α の β への転移を阻害する γ に対する何らかの障壁 (barrier)² になっていると考えられる．もしそうであれば，このような δ の存在が確認される環境であれば， α および β 間での転移は 3) に示されるように自由なものとなる．実際に，この予測の正当性は，TYPE C の日本語に見られるかき混ぜ現象 (scrambling) によって証明される．

GB 理論と呼ばれる生成理論での転移現象に対する解析術および起因の説明は，以上のようになされてきた．しかしながら，ここには未解決の大きな問題が隠されていた．それは，転移された要素が転移後に，その元位置において転移要素の痕跡として発生し，転移先との関係において処理されてきたことにある．つまり，GB 理論でのアプローチでは，転移要素が何故，転移後，痕跡へと変質してしまうのかという疑問に答えることができない．

また，転移そのものに関しても，転移の方が外心構造を保つのか，あるいは，言語のタイプによらず，内心構造をなぜ許可しないのかという問いにも答えられていなかった．

これらの問題点について，近年のミニマリスト・アプローチは，コピー理論と呼ばれる痕跡を介在させない解決法を提案している．後の第 3 節では，このコピー理論を検証し，転移に関する更なる問題点と解決案を提案したい．

2：句構成のための必要十分条件

統語に限らず，言語が構成物質として形態を

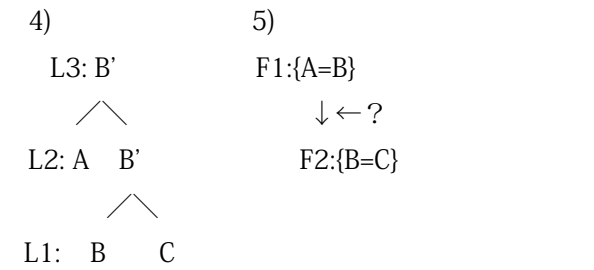
2. ここでの「障壁 (barrier)」は，Chomsky (1986) で提唱されている概念とは異なる．

なす場合，その構成の最小単位は，2 つ以上必要であることは明白である．自然言語が，情報伝達および思考手段として概念的に必要とされる構成単位もまた 2 つであると思われる．ひとつは，意味情報群であり，もうひとつはそれを可聴化する音声である．正確には，意味情報群を恣意的に音声形態と結びつける作業である．そこから考えて，言語処理には，概念的に 2 つの部門（のみ）が存在してよいはずである．

Logical Form ⇔ Phonetic Form	
(意味部門)	(音韻部門)

しかし自然言語の持つ，情報体系の複雑さを考えると，この一対一対応の構成素のみでは，当然情報伝達や処理に限界が生じる．ある音が，危険を表す音として用いられ，また別の音が喜びを表す意味と結びつけて用いられる程度では，人間以外の他の動物の条件反射的な意思・情報伝達以上の存在では決して有り得ない．人間言語の特徴は，そのような単純な結びつきによる反応作用を引き起こすのではなく，複雑な思考や未体験の出来事や結果に対する予測性を生み出すことにある．

例えば三段論法 (A=B, B=C, ∴ A=C) に見られるような，代入計算が可能な事実も人間言語の意味処理を考える上で大切になってくる．そうすると，単に 2 つの要素を加算，融合させるだけの処理では，不十分であることが容易に推測される．翻って以下のような構造形態はどうであろうか．



4) は、上に見た三段論法のような代入計算が必要とされる場合の処理構造を極めて単純に図式化したものである。5) は、数学的な（人為的）表記法であるが、この場合、B を共通の値として代入計算する際の、フォーミュラ (F)1 とフォーミュラ 2 の相関関係、結びつきが保証されない。一方で、4) は、B および C の結びつきを 2 項対立の構造で関係付け、例えば B に C を加算、B から C を減算することを可能にする。

さらに $3 - 2 = 1$ という計算構造において、左辺の項を逆転させた $2 - 3$ は、 -1 となってしまうことから、 $X - Y = Z$ において X が計算式の基本となっていることが分かる。つまり、X と Y の構成位置は、定まっており、X と Y の入れ替えは、不可能、あるいは、別の計算式になってしまうことに注意したい。これは、3 項計算の場合も同じである。

- 6) a. $2 - 3 + 1 = 0$
b. $3 - 2 + 1 = 2$ cf. $3 - (2 + 1) = 0$

つまり、計算には、基盤となるものが必要であり、その順は固定されなくてはならないということである。これを可視的な言語表現（音声・文字）に置き換えても同様の現象が、観察される。

- 7) a. John + kissed + Mary = John kissed Mary (It is not Mary but John who kissed not John but Mary.) (X kissed Y: X = John, Y = Mary)
b. Mary + kissed + John = Mary kissed John (It is not John but Mary who kissed not Mary but John.) (Y kissed X : X = John, Y = Mary)

さらに、 $X (2) - Y (3) = Z (-1)$ の計算結果を保持するための左辺の構造をもう少し詳しく見てみよう。

8) a は、正の素性を持った基盤、数字 2 に対して、負の素性を持った数字 -3 を融合（加算）したものである。これにより 8) a は「 $2 - 3$ 」と同じ計

算結果を持つことになり、かつ両者は、加算という単一の共通の計算によって導き出されることが可能になる。ここで注目すべきは、2 と -3 との順番を問わないことである (cf. 8) b)。つまり、計算には、 $X \pm Y = Z$ という項の計算順を問う「数理計算（純計算）」と、順番を問わない $(\pm X) + (\pm Y) = Z$ 「素性計算（融合, 照合）」が存在することになる。4) は前者の構造に相当する。

- 8) a. $2 + (-3) = -1$
b. $-3 + (+2) = -1$
c. $(-3) + (-2) = -5$

言語現象でもこれと同じく、語順が意味の総和として完成する結果（文の意味）に違いをもたらさないものがある。注目すべきは、計算項に値する項（主語、目的語）が、それぞれ独立して自身で文中での機能素性を示す格を助詞の形で顕在化させていることである。

- 9) a. Watashi-ga kare-wo sukida.
b. Kare-wo watashi-ga sukida.

次に、 $A + B + C = D$ の計算式において、A の次に B が、あるいは、B の次に C が来る必然性がある場合について考えなければならない。すなわち、言語構造上の品詞間のミスマッチを回避する手立てを考えなければ、ある動詞 α には前置が共起し、また別の動詞 β には名詞が目的語として共起するにもかかわらず、その逆は許されないという事実を説明できない。

- 10) a. I go to school.
b. I read a book
c. * I read to school.
d. * I go a book.

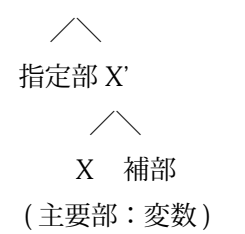
そのためのひとつの解決案³として、考えうるも

のが α および、 β が下位範疇として支持するカテゴリーを定式的に指定することである。

- 11) a. $\alpha + X$
b. $\beta + Y$

さらに、 α が、別の項を要求する場合（文における主語のようなもの）、 α は下位範疇の X と主語 (Z) の区別を構造的に行える立場になければならない。この点においても、既に 4) で挙げた構造の利点は大きい。つまり、 α はその構造上、X および Y との関係を各々、2 項対立で示し、 α と X、 α と Y の関係を明示するだけではなく、 α を媒介とした X と Y の関係も 2 項対立で示すことが可能となっている。これは、 α 、X、Y を並列構造として扱うよりも語順を重視する言語の構造の説明に有利である。このことを GB 理論では、構成素統御（constituent-command）として示し、それぞれの対立構造および、範疇指定を自然言語の持つ原理変数構造の具現化のひとつとして、句構造規則や X バー構造として規定した。

次節では、これらの妥当性と概念的必然性について検討する。

- 12) XP（構造原理）

指定部 X'
X 補部
(主要部：変数)

3：言語器官と認知機能

理論言語学の目指す終局的目的は、人間言語全てに共通する原理原則体系の記述の完成と、

それに伴う主に統語現象を中心とした様々な言語現象への科学的説明である。しかし、科学的説明が可能なのであれば、真の原理原則体系の発見には遠く及ばない。なぜなら、科学的説明が複数可能である場合を否定しきれないからである。

また同時に、科学性を技術的な解決案として提示する場合、説明力の陰に隠れて、その研究対象が本来持つ特性や本質について考えを及ぼすことなく、理想的な結果を導き出す道程に意識を囚われてしまう危険性もある。

事実、過去の GB 理論と呼ばれる生成文法によるアプローチもこの過ちを犯した。例えば、先に見た痕跡という概念や句構造を規定する X バー理論がそれである。自然科学において最も大切なことは、仮説の実証である。理論言語学、特に生成理論は、その研究対象を自然言語に観察される構文現象に焦点を当て、それをデータとして用い、仮説を立て、説明を行ってきた。ここには大きな問題が 3 つある。

ひとつは、データの信頼性である。つまり、当該データが真に言語現象を妥当に表したのかどうかということである。言語データの妥当性は、（母国語）言語話者の文法性や容認性に頼るほかない。また、それが故、非母国語話者にはデータの妥当性が判断しにくく、誤ったデータやあるいは、都合の良いデータのみを元にして仮説を立てる危険性がある。

ふたつ目に、その仮説の検証方法が挙げられる。言語データを説明するために立てられた仮説の検証手段が、同じく言語データであるというパラドックスである。つまり、他の自然科学、例えば物理学での重力の証明に、物質の落下（速度、加速）といった第 3 者的検証法が存在するのに対して、理論言語学にはその確証的な手段が存在しない。

そして最後に、言語データを説明するに際して

3. より厳密には、意味的選択も考慮する余地がある。ただし、これは従来の s(emantic) seleciton のようなものとは限らず、features を重視すべきであると考ええる。

の可能な仮説の絞込みである。仮説（理論）の妥当性のみならず，その理論が言語理論の枠を超えて，種としての人間の特徴を説明する他の言語に関係する認知理論や生物学上の概念に最適に合致するかという点である。

ここで，今一度，自然言語における転移と単位構造（句）の形成についてまとめてみよう。

13) [[β]..... γ [α]]

14) [X..... γ Y]

13) の転移現象については， α が β に転移する場合，その障害となる γ があってはいけない。あるいは，その α の転移を保障する γ が存在しなければならないことを示している。一方，14) は， γ が X および Y を伴って構造を成すとき， γ は，X あるいは Y と自身の関係のみならず，X と Y の関係も保障することを示している。

ここで， β を X，Y を α として見なす場合，両者の構造が極めてよく似ていることに気付く。そこで，この両者の構造を保障する共通の派生（生成）方法を考えることにする。

仮に，12) で見たような句構造を適用すると，構成素である α や β ，あるいは X や Y はそれ自身では，構造を形成する力がなく，必ず構造指定するフレームを余分に必要とすることになる。仮にもし，これらの構成素自体が，その内部にお互いを承認，照合するための素性を持つとするならば，必要とすることは，構成素の「融合 (Merge)」のみである。つまり， γ と β を融合させた場合，互いに相入れない素性を持つ場合，その構造は崩壊し，組成照合が合致すれば，新たな構造物 δ として認可されることになる⁴。

さらに，新たな構造物 δ に対して，融合を行

う際には， α を介在させる選択と，融合のターゲットである δ の下位組成である γ あるいは， β をターゲットに融合させても構造上の変化は起こらない。ただし， β あるいは γ そのものを δ から取り出すことは δ の構造を崩壊させてしまうので許されない。そうすると，残される可能性は， β あるいは γ のコピーを作るほかない⁵。

同時にこのアプローチでは，先に見た理論上想定した「痕跡」という不自然な概念を必要としなくなる。また，X バー理論で規制を受けた主要部や最大投射（句）と言ったカテゴリーに対する規定も必要としない。つまり，融合する 2 要素に対しての制限がなくなり，計算の負担が軽減される。この計算は，もちろん，構造規則を事前に指定するような必要性もない。

この言語に対する計算法は，第 2 節で見た 8) の「素性計算」として言語外の計算能力としても保証されうる。また，句構造を規定し，転移を説明する場合に起こった，内心構造を排除することのできない問題が融合（Merge）の構造拡大条件 (Extension Condition) によって説明が可能となる。ただし，素性計算は，項の産出順を問わないことから，言語においても語順を問わなくなるという問題も含んでいることも事実ではある⁶。

現代の科学言語理論で最も大切なことは，この「融合」によるアプローチが，構造規定のアプローチに比べて，説明的妥当性を持つに加えて，言語器官以外の他の認知情報処理器官に接近するに当たって最適な形態を採っているかということである。

融合によるアプローチは，少なくとも言語器官における意味部門と音韻部門を媒介する非常にシンプルな，文法処理における計算負荷を軽減する簡易システムを構成する。

これは，言語に関わる，あるいは言語のみに関わる特殊なシステム（Computation for Human Language）を独立して存在させるにしても，その基本構造が，言語処理にしか関わらないのであれば，情報処理期間としては非常にコストの高い不経済なシステムであるといえる。いわんや，このシステムが他のシステムと同じ原理で働くのであれば，どちらのアプローチがより好ましい，あるいは最適であるかは自明の理である。

次節ではこの原理についてもう少し触れてみたい。

4：言語の起源と進化の謎を解く

チョムスキーは，人間の言語の知識の獲得，知識そのものの正体，そして，その運用を言語研究の要に置き，特に前者 2 つを研究対象として特化した。しかし，それらに加えて，自然言語最大の謎となるのは，言語の進化であるように思う。つまり，我々の言語がいったいどのような過程を経て現在の姿に成るに至ったかという問いである。

ある言語の歴史的発展や他の言語との関わり結びつきを文献等において遡ることは不可能でなく，実際，歴史言語学は，その手法を採っている。しかしながら，歴史を辿った先にあるものは，やはり，言語の発生と起源の問題である。

言語研究を自然科学の一端と捉えるならば，この問題は極めて深刻なものとなる。なぜならば，まず，研究対象となる現存するデータそのものがなく，また仮にそのようなものを想定し，仮説を立てたところで，検証が物理学的に絶対的に不可能であるからである。

この人類の進化にも関わる言語の起源に対する問題は，歴史を通してルソー (J.J. Rousseau) やダーウィン (C.R. Darwin) らによっても論じられてきた。また，田中ら (1994) は言語の起源に関する次のような珍説，奇説を紹介している。

・ワンワン説 (bow-wow theory)
自然界の物音や動物の鳴き声を真似ることによって発生したとする擬音（声）説。擬音（声）から生じた語があるのは確かだが，その数はわずかであり，自然界には物音を立てない事物も沢山ある。これらを表す語や形容詞，動詞などが音の模倣から発生したとは考えられない。

・ヘイ・フン説 (pooh-pooh theory)
喜怒哀楽などの感情や快感，苦痛などの強い感覚によって自然に発せられた声が言語の源泉であるとする間投詞説。このような発生はどの言語にも認められるが，その数は多くない。自然に発する音は，言語に用いられる分節された音とは質的に異なる。

・リンリン説 (ding-dong theory)
すべての事物は固有の音響を内蔵していて，人間は外界からの刺激を受けると，直ちに外界の事物の内臓する音響を反映した声を発し，これが言語の起源であるとする反響説。音象徴 (sound symbolism) 的考えが認められ，言語にはそのような語が存在はするが，言語は音象徴だけで成り立っているわけではない。

・よいこらしよ説 (yo-he-ho theory)
人間は集まって労働をするとき，掛け声をかける。声を出すことは筋肉の疲れを和らげたり，より大きな力を出させたりする。労働が共同して行われるとき発せられる声が，動作と結びつき，次第にその動作を現す言葉に変化していったとする共働説。「持ち上げる」「引っ張る」という意味の言葉が最初だろうというが，根拠は何もない。

・ラ・ラ・ラ説 (la-la-la theory)
言語は原始的な，意味のない歌のような発生から生まれたとする歌唱説。恋や詩的情感が言語

4. Merge による agreement の領域は，従前の Spec-Head 関係の領域に限らないものとする。より強い agreement を要求する時のみ，所謂 Spec 位置への「癒着」が起こると考える。詳しくは，Fujimoto (2005) を参照のこと。

5. Chomsky (1995) を参照のこと。

6. この問題について，Chomsky は，語順は PF で対処する問題だとしている。

を発生させたというのであるが、内的情感に促された発声と、少なくともなんらかの伝達を目的とする発声との間のずれは、説明がつかない。

以下の通りに、これらのいずれも科学的根拠も実証も欠く極めて不確かなものである。しかしながら、人間が言葉を発生させる上で認知・運動能力との関わりが大なり小なりあったことは、否定はできないであろう。

言語生成に関係する照合や、融合、一致、あるいは、加算のような単純計算などの構造生成に必要な最も原始的な形式は、先に 3 節で紹介したような Merge のような作用を誘発する環境であり、そのような誘発に関わる行動が古代人に有り得たかということが問題となる。この点について、池内 (2008) は、以下のような興味深い提案を行っている。

「先に述べたように、言語の階層的句構造は集合で表記されとする。次に、7 万 5 千年からそれ以前のアフリカにおける後期中期石器時代 (late Middle Stone Age) の現生ホモサピエンスに近いヒトたちは、所有権の概念を持っており、着物、剥片石器 (stone flakes), 剥片ブレード (flake-blades) や狩猟記念物 (trophies) などの貴重品を、他のヒトのものと区別し、自分自身の所有物として所持・保有していたと想定する。(cf. Klein, R., and E. Vrba (1982)) 例えば、ヒト A が (その家族代々の) 3 つの貴重品 v(aluable) 1, v2, v3 を所有していたとすると、彼は (ジェスチャーなどにより) 「これらは私のものだ」とそれらが自分のものであることを明示できた。つまり、これらのものを、「私のもの」として 1 つのグループにまとめる物理的操作・行為と、ある場所に保管・貯蔵し、同定するための札などを付ける手順があったと想定する。ここで、この A による三つの貴重品の実際の・物理的所有は、抽象的な心的表示では以下の

ような集合で表すことができると仮定する。なお、ラベル／タグを仮に “A's” としておく (が, 例えば, “v1” であったも一向に構わない。)

さて、A が、隣の集団 W との戦いで、勝利品として v4 を略奪して自分の所有物に加えたとしよう。その結果は、次のように表せる。

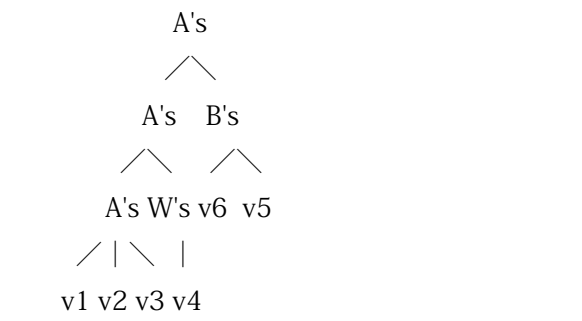
ここで、元の集合は保存されており、新しく加えられた集合とは明確に区別できるものと仮定する。おそらく、それぞれ別の袋に入れるかして別々のタグが付けられ、場合によっては異なる場所に保管されていたことだろう。つまり、新しい所有物の集合は以下のようにはならない。

食べ物であればこのようになる可能性は十分ある。

次に、友人の B が貝と骨などの貴重品を持っており、

A がそれらを分捕ったとしてみよう。そうすると、A の所有物は次のように表記される。

これを二次元樹形図で表すと以下ようになる。



つまり、貴重品の実際的所有は抽象的心的には回帰的階層構造を成していると考えられる。⁷

池内 (2008) では以上のように、所有権のシナリオが、進化的妥当性を目指すミニマリスト・アプローチにより初めて可能になったことを指摘し、生成文法的視点からの一提案を行っている。⁸

5：おわりに

言語 (文法) 研究の歴史は長く、古くは古代インドまで遡ることができる。その伝統的研究法は、運用面を主とした対象言語の規則性の発見やその体系の記述を完成させることにあった。

一方、チョムスキーは、その規則体系を産み出す根底にある人間言語に普遍的な原理と変数のモジュールである普遍文法を提唱し、記述的妥当性を超えた説明的妥当性を満たす科学的文法理論を発展させてきた。

しかし、既に本稿でも指摘したように、伝統的言語研究が、「子どもの言語の習得の謎」という非常に身近な問題を見逃してきたように、生成文法もまたその科学性を主張するが故に見逃してきた問題があった。それが、理論の検証である。もちろん、これまでも全くの検証がなかったわけではなかった。

言語データを解析し、理論を構築するに当たって、その検証を言語データで行うことは、ともすれば、理論に適合するデータのみを検証する危険性があり、なによりもこれは、人間の言語直感を説明するために、言語直感の産物である言語でしかその直感の正当性を証明できないというパラドクスを産み出す。また、同時に、生成理論が理論先行型のアプローチを取り、理論内理論の仮説を多く生み出してきた反省もあった。

この反省に基づき、チョムスキー自身が、言語の理論が、真の理論であるためには、言語内外に結びつく基盤において適応可能な形態を採っていただかなければならないことを主張し始めたのである。この解釈可能性 (legibility) と呼ばれる概念的必要性 (人間が生物として必要な要素) から要求される対言語制約は、生成理論に大きな打撃を与えた。

つまり、単に言語理論内でしか適用可能でない単純な技術的解決を一切認めないという姿勢を打ち出したのである。その犠牲として、当然の前提として見なされていた深層構造、表層構造、あるいは X バー理論などの道具立てが消失した。

しかし、同時に、最新の枠組みであるミニマリスト・アプローチは、言語理論の正当性を検証する第三者的 (客観的) 尺度としてのより重要な価値を比較認知科学, 生物学, あるいは脳科学に与えることにより、より深遠で綿密な人間研究が可能になる。

言語学は正にその人間研究のネットワークを結びつける中核的媒体としての存在意義を強めたといっても良いであろう。故に、その研究成果は、言語内理論だけではなく、人間研究に携わる全ての基礎科学に応用し、貢献する期待が尚一層高まるものである。

7. 池内は、ここでのラベルが全て同一の “A' s” であるかどうかは疑わしいので、ラベルの同一性については完全でないかもしれないとしている。尚ラベル付けについては、Bleys (2008) を参照のこと。

8. この点については、池内自身も認めるように、必要な生態学的基盤、神経的基盤もその時点で十分に整っていたという想定が必要であるが、確固とした保証があるかはまだ議論の余地がある。

参考文献

- Bleys, Joachim. (2008) Expressing second order semantics and the emergence of recursion, in *Evolving 7*: pp. 34-41
- Chomsky, Noam (1965) *Aspects of the Theory of Syntax*, MIT Press
- Chomsky, Noam (1981) *Lectures on Government and Binding*, Foris
- Chomsky, Noam (1986) *Barriers*, MIT Press.
- Chomsky, Noam (1995) *The Minimalist Program*, MIT Press
- Chomsky, Noam (2000) *New Horizons in the Study of Language and Mind*, Cambridge University Press
- Chomsky, Noam (2002) *On Nature and Language*, Cambridge University Press.
- Chomsky, Noam (2005) *Generative Enterprise Revised*, Mouton de Gruyter
- Fujimoto, Koji (2005) 「言語生成論の生物学的知見を踏まえた再構築と課題 (1)」『研究論叢』LXV, pp. 27-36, 京都外国語大学
- Fujimoto, Koji (2008) 「言語生成論の生物学的知見を踏まえた再構築と課題 (2)」『Studies in English Linguistics and Literature』第24号, pp. 157-184 京都外国語大学英米語学科研究会
- Ikeuchi, Masayuki (2008) 「生成文法は言語の起源・進化をどう説明するか」『言語』vol.37, pp. 66-71 大修館書店
- Jackendoff, Ray (2002) *Foundations of Language*, Oxford University Press
- Gould, Stephen Jay, and E. Vrba (1982) Exaptation: A missing term in the science of form. in *Paleobiology* 8: pp. 4-15
- Tanaka, Harumi et.al (1994) 『入門ことばの科学』大修館書店

「ジェンダーの倫理学」の可能性について

伊藤 信也

On the Possibility of “an Ethics of Gender Equality”

Shinya ITO

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 30, 2008; Accepted November 25, 2008)

This article examines the possibility that ethics can discuss “gender” and that there can be an “ethics of gender” relating to gender equality. Up till now, gender studies and feminism studies have concentrated on problems such as “sex” and “love.” However, these problems have seldom been examined from the point of view of ethics. Various reasons have been advanced to explain why “gender” up till now has been left behind by ethics without being discussed. The conclusion is that problem recognition should be shared by all genders and we can learn from gender studies in order to build an “ethics of gender.”

Key words—ethics; gender equality; feminism

はじめに

有史以来、女性差別の長い歴史が存在するのに対し、「性」や「ジェンダー」（身体的・生物学的ではない、社会的・文化的に形成された性差概念）についての学問的研究の歴史は、はるかに浅い。そして、「ジェンダー」が倫理学において研究された歴史はもっと浅い。

倫理学の世界において「性」に関する諸研究は、学会誌等で確認できる限り行われてはいるが、量的には少ないと言わざるを得ない。現在では、主として社会学研究者によるジェンダーやフェミニズムに関する研究が、倫理学研究者による研究を圧倒している状況である。その結果、倫理学研究者以外のジェンダー研究書などで、倫理にかかわる数多くの議論がなされている状況となっている。¹⁾

本稿では、「性」や「ジェンダー」を倫理学の研究分野に位置づけて究明することを通じて、共学で学ぶ学生向け「テキスト」の原案として構想し、それを一括して「ジェンダーの倫理学」と仮称することにする。そのような「学」の構築を可能とするために、考察すべき諸課題を検討したい。

その作業として、日本の倫理学・哲学会（主に学会誌）において扱われた「性」や「フェミニズム」「ジェンダー」に関する諸課題を振り返る。「倫理学会」という括り方をした理由は、学会論集であれば、日本の倫理学および哲学研究者の合意によって論題とすべきと承認されていると見なしうるからである。

まずは、倫理学が「性」をテーマとして扱うことについて繰り返されてきた議論を確認する。その議論を踏まえて今後、倫理学として「ジェンダー」をどう扱うべきかを検討したい。

1. 日本の哲学・倫理学界における「性」「ジェンダー」関連研究

1980 年代後半から日本の哲学・倫理学界でも「フェミニズム」や「女性差別」に関する論文が掲載され始める。最初期としては、1985 年に加茂直樹氏による論文「性表現と自由」²⁾が掲載されている。この論文は性表現の自由と法規制の妥当性について検討を加えたもので、現在のポルノ表現の法規制問題を倫理的観点で課題にしている。

1993 年には大阪薬科大学で開催された関西倫理学会大会で、シンポジウム「フェミニストと倫理」³⁾が行われている。近年の研究書を見る限り、このシンポジウムは倫理学会としては「性」に関するテーマで企画された日本で最初期のもののようである。また全国レベルでは、日本倫理学会で1996 年に日本倫理学会編『性』という研究書が編まれた。（この書は 2 節で取り上げる）

21 世紀に入り、哲学や倫理学会だけでなく、倫理学研究者の著作にも、ジェンダー関連の問題群をテーマにしたものが増えてくるようになった。2003 年から『岩波 応用倫理学講義』（全 7 巻）が刊行、第 5 巻では「性／愛」が特集されている（この書は 3 節で取り上げる）。

2007 年発行の日本哲学会『哲学』には、大会での共同討議「ジェンダーと哲学」が収録されている。同年の関西倫理学会でのシンポジウムの総題では、「リプロダクティブ・ヘルス／ライツ」が採用された。⁴⁾ このシンポジウムの提題及び提題者は、「懐胎・分娩はいかなる労働か」（大越愛子氏）、「リプロダクティブ・ヘルス／ライツとリベラル優生主義」（松原洋子氏）、「膣内射精暴力論の射程：男性学から見たセクシュアリティと倫理」

（森岡正博氏）という、身体の具体的問題に迫るテーマ設定が為されている。

2008 年には日本倫理学会において、ワークショップ「性の倫理学の可能性について」⁵⁾が行われている。ワークショップの責任者である江口聡氏は、次のように概要を説明している。「国内では性（セックス）にかかわる哲学的・倫理学的問題群の重要さは理解されつつあるが、哲学・倫理学を専門とする研究者の活動は十分に活発とは言えないように思われる。日本倫理学会が編集した論集『性』（開成出版）の発行から十年以上が経過しており、性の哲学・倫理学研究の現状を把握することが必要であろう。」「性の倫理を考えるにあたって、性暴力、性差別、性的逸脱、売買春、ポルノグラフィーといった実践的・社会的問題への関心が重要であることは言うまでもないが、それらの問題に含まれる難問を解決する上で、哲学史・倫理学史の伝統を見直すことも必要であると思われる」⁶⁾。

このように、近年では哲学界や倫理学界において「性」や「ジェンダー」に関連するテーマを正面に据えた共同討議や研究が以前よりは多く開催されるようになった。

しかし先にも触れたとおり、「性」や「ジェンダー」の倫理的問題に関する議論の多くは、倫理学よりも社会学などの学問分野で行われてきた歴史がある。任意の関係図書類の奥付を調べてみれば、そこに社会学を中心に、文化人類学、文学、心理学等の研究者の参加を確認することができる。そして、その場に参加する倫理学研究者は少数である。

このように、歴史的な経過としては「ジェンダー」や「フェミニズム」の研究は、倫理学研究者

が中心となって行ってきたわけではないのだが、それだけでは「なぜ倫理学で性やジェンダーを盛んに扱ってこなかったのか」の理由を説明したことにはならない。「どの分野の研究者が研究してきたのか」ということよりも、そのテーマを研究すること自体が可能なのか、つまり性にかかわる倫理的な諸課題を倫理学で取り扱うこと自体にある種の困難がつきまっているのではないかという問題意識が、近年倫理学や哲学の研究者によって指摘されてきている。

田村公江氏は著書『性の倫理学』⁷⁾の「プロローグ 性の倫理学の難しさ」の中で、性の問題を倫理学で扱うことの困難について触れている。

田村氏は、「性という主題が倫理学にとってやっかい」なのは次の二つの理由だとしている。「一つは、性行為においては、主体と対象の関係という枠組で考察できないということ」。つまり、「性行為を考察するためには、相互に主体であるという複雑さを扱う理論が必要となる」からである。この理由には、倫理学が（そして哲学も含まれていると思われるが）相互主体的な考察をしてこなかった、という意味が含まれていると思われる。そして、「性という主題が倫理学にとって扱いにくいもう一つの理由」は、「性的快感という特殊な快感が問われてくるということ」だという。というのも、「哲学は伝統的に性行為を人間の動物的本能に関連づけて、いかに動物的本能を理性で制御するかという発想を採用してきた」が、「性的快感は本能だけでは語れない」とし、性的快感は「心理的満足や精神的活動との関連」があり、「身体感覚の側面と精神的活動の側面を合わせ持つ」という。これらの理由は主に性的な実践面から検討した論拠であるが、これらの理由の正当性について別途検討の必要があるとしても、倫理学が主題としてこれまで

このようなテーマを扱いづらかった理由としては想定されうる論拠かもしれない。しかもこれは倫理学だけでなく、哲学にも共通する方法論的特質に由来する理由と言えるだろう。

他にも例えば北川東子氏は、別の角度から（倫理学ではないが）哲学でジェンダーを扱うことに伴う困難性を主題の一つとして論考を発表している。⁸⁾ この論考の「1 哲学はジェンダー論を必要とするか」の中で北川氏は、ジェンダー論が「今日の学問状況」において「もっとも生産的な領域のひとつ」であるのに、哲学では「ジェンダー概念がまだ本来のインパクトを発揮できていないという印象を持つ」としている。また「ジェンダーと哲学」という「テーマ設定そのものに疑問をもつ哲学者もいるであろう」と言い、その「疑問を持つ哲学者」がどうして疑問を持っているのかについて、彼ら自身が語っているような形式で以下のように説明している。

「哲学は普遍性の探究を本質としている。それ にたいして、ジェンダー論は、性差別を批判的に意識化する試みである。特殊な集団の特殊な文脈と結びついた議論である。特に、女性差別や性暴力の糾弾と結びついている。基本的には、フェミニズムの問題である。したがって、社会学や歴史学の問題としては理解できるが、哲学の問題としては考えにくい。哲学は、たとえ社会正義のためであっても、特定の集団のイデオロギーであってはならない。家族論やセクシュアリティやエロスの問題など、特定分野においてならジェンダー論は不可欠であるが、哲学一般にとっての視点ではない。」（北川、46 ページ）

ジェンダーと哲学というテーマ設定に疑問を持つ哲学者が、本当にこのように認識しているのかどうかは措くとしても、氏が「多くの哲学者が、性やジェンダーについてどういう認識を抱いてい

2) 日本倫理学会編：倫理学年報 第十五集，1985。

3) 提題者は丸山徳次氏、伊藤正博氏、田村公江氏。司会は鷲田清一氏と水谷雅彦氏。関西倫理学会会報第 55 号、『倫理学研究』，1994 年。残念ながら討論の詳細は掲載されていない。

4) 2007 年 11 月 4 日、京都女子大学で開催。司会は田村公江氏と八幡英幸氏。

5) このワークショップは 2008 年 10 月 3 日に筑波大学で開催された。

6) 日本倫理学会第 59 回大会報告集，56 ページ。

7) 田村公江：性の倫理学（丸善）2003 年。この書は加藤尚武・立花隆監修『現代社会の倫理を考える』シリーズのうちの一冊として発行されている。

8) 北川東子：哲学における「女性たちの場所」ーフェミニズムとジェンダー論，日本哲学会編集『哲学』，2007 年，45 ページ以降。

る」と考えているのかは、極めて明瞭に示されている。哲学に「普遍性」,「非政治性」を求める声が、ジェンダー論を哲学の課題に上らせることを抑圧していると認識されている。

また、北川氏はもう一つの根拠として、「哲学にとって、ジェンダー論はなにを意味するか」についての「コンセンサスの不在」があることを指摘している。「ジュディス・バトラーの一連の仕事」や「ドゥラシラ・コーネルのフェミニスト法哲学」など海外の「哲学的なジェンダー論」の邦訳が出版されているにもかかわらず、また日本やアジアからの問題提起があるにもかかわらず、日本では「哲学的なジェンダー論」について、「漠としたイメージ」すら存在していないのが現状だと言い、「性差別やセクシュアリティについて制度批判的な議論をすれば、それがジェンダー論である」と「誤解されている」むきもある、と批判している。(同ページ)

しかし、このような哲学にとっての「コンセンサスの不在」は、倫理学研究者の中で、倫理学にとってのコンセンサスの不在という問題として以前から指摘されてきたのである。それが、次節で取り上げる日本倫理学会の論集『性』で提起された倫理学の課題である。

2. 倫理学が「性」に関して研究する意義とは

倫理学研究の世界で「性」に関する問題群への言及が始まった 1990 年代後半、ようやく倫理学会が編集した一冊の研究書が出版されている。それが日本倫理学会編集の『性』(1996 年)である。

この論集では、古代ギリシアから現代までの性に関する倫理学説に触れていたり、性暴力の倫理的問題に関する論考も掲載され、参加者の関心に即して多様な角度で性について検討が加えられている。ただ、当時の性に関する参加者の問題意識

を反映して、たとえば現在では普及しつつある「ジェンダー」概念を用いることなく、性差による男女の区別と文化的差異性の関係を明確にしないまま、全体の論集が組まれるという問題点がある。しかしながら、この論集は倫理学研究において「性」をテーマにするにあたり、どのような研究領域を設定し、また展開できるか、という点において今も示唆的である。

この論集の中で志水紀代子氏は、「これまで日本における哲学や倫理学の学会で、『人間』がテーマにならなかったことはないだろうが、『性』や『女性』、『こども』が問題にされたことはほとんど皆無に近かったのではないだろうか⁹⁾」とし、「阻害され続けてきた女性(＝人間)の、思想やことばについて、フェミニズムの立場からどのような問いかけがなされてきたか」を報告している。

その結果、この学会大会で以下の三点について報告を行ったと述べている。一つ目は「フェミニズムの視点と原点」であり、二つ目は「フェミニズムが批判してきた『近代』－男性中心主義に貫かれた市民社会の現実を、主として日本のフェミニズムの歴史的変遷過程を中心にして明らかにしながら、世界のフェミニズムの動向をそれに対比させつつ解説」し、最後(三点目)に「世界的な視野の中で、今何が問題とされているかを第四回世界女性会議・N G O フォーラム(北京会議)の報告や行動綱領の中で明らかにしようとした」という。しかも「時間的な制約」の中、後半はレジュメの項目を挙げることしかできなかった、と記されている。つまり、志水氏は大ベテランから若手まで会場に居並ぶ(主に)男性研究者に向かって、今で言う「女性学」のテキストのような内容を時間の許す限り熱弁したことが想像される。

一目瞭然で分かるように、この段階では未だ日本の倫理学者達がこのような問題群についてほとんど無知であるという想定の下に、思想や歴史の

基礎をいわば講義する報告内容になっている。このような報告内容に終始すること自体、いかに日本の倫理学会の歴史において「性」をテーマにした研究史が疎遠な存在であったかを物語っている。その疎遠さが「コンセンサスの不在」を生み出している一因になっていることは想像に難くない。

同書のシンポジウムの要録¹⁰⁾でも、同様の問題が語られている。シンポジウムの冒頭で、司会の一人である窪田高明氏は「いつの時代の倫理学でありまして、性の問題というものを何らかの形で意識してきたのだと考えていいと思います。ただ、一方で倫理学が性の問題を正面から取り上げることがあったかと言えば、それは必ずしもそうではなかったというふうにいえると思う」と述べ、これまで倫理学会が性を中心課題として捉えてきたことがなかった点に触れている。そして「現代の社会において非常に特徴的なのは、『性』という問題が人間を考える上で欠かせない重要な問題だという認識が広く認められるようになった、これは大きな問題だと思います」と指摘し、倫理学が「人間に関する学」であるという理由で「何らかの回答をすることが広く求められているということも、ある程度共通の認識になっているのだと思います」と述べている。

しかし、そのような討論を倫理学会の大会で行うことは「容易なことではないということもおわかりいただけたと思います」としている。そこで「従来の倫理学会の枠を少し踏み破るような形」でも広範な意見を発表する方向で企画を進めたという。ただその結果、この発表は良いがこの発表はおかしい、という意見をそれぞれが持つことになってしまったという認識を示し、「要するにそのように『性』の問題を倫理

学で扱うということがきわめて困難だということを、私たちの、今日の企画は正直に反映している」と総括している。

久野昭氏も、冗談めかしてではあるが「なぜ私が司会をしなければならないのか」と問い、「私が暴走しかねない」ので私に「交通整理」をさせようということなのか、と答えを推測している。そして久野氏も、この問題の「交通整理」の難しさを正直に語っている。

「ただ、交通整理と申しましたけれども、これ、交通整理のやりようがないんですね。」「今日ご報告いただいたのは八人の方ですが、あっち向いたりこっち向いたり、それから問題自体もそうですし、問題の扱い方、それから扱う視点も、かなり悪く言ってしまうとバラバラ」(久野, 180 ページ)と述べている。討論の前から司会者がこのような発言をすること自体、「性」の問題を倫理学会で扱うことにいかに慣れていないかを示しているのではないだろうか。

このシンポジウムの中で、司会者は企画の題名が「性」であることの理由についても触れている。「『セックスとジェンダーとセクシュアリティ』といういい方をよくするわけですが、その区分についてどういうふうに考えているのかという問いかけは我々の中でもありました」(同, 179 ページ)と紹介し、このシンポジウムが開催された頃にはすでに、倫理学会内で上記の三概念(セックス、ジェンダー、セクシュアリティ)の区別が知られていたことが分かる。しかし、それにもかかわらずテーマを「性」という言葉で捉えるということにした理由は、「三つの問題どれかをとるということは他の要素を切り捨てるということになりますし、またその三つが必ずしも研究のある視点として分けることはできましてそれをバラバラにしておいていいということもないと思ったから」

9) 志水紀代子：性について、日本倫理学会編『性』(開成出版) 1996 年、120 ページ以下。

10) 日本倫理学会編 前掲書、177 ページ以降。

11) 要録によれば、この時の総合司会は久野昭氏、丸山徳次氏、窪田高明氏である。(記載順)

だとしている。さらに、「私どもがその問題に対して無自覚にこれを混同していいと考えたというわけではなくて、その三つを含み込んだ形で問題を捉えていき、その関係をどう捉えていくかっていうのはこれからのそれぞれの課題ではないのか」と考えた、と表明している。つまり三概念の混同ではなく統一、あるいは総合としてこの標題となった、ということである。

「人と人との関わり」「人間に関する学」という視点に立って性を総合的に考察する、というスタンスは確かに倫理学の持つ利点かもしれない。しかし、その結果として論集としてのまとまりを欠き、性別役割を固定化する言説に対して無批判と受けとられても仕方ないような報告が、激烈に性暴力批判を展開する報告と並置されてしまうとすれば、逆に倫理学の欠点だと指摘されかねない。

近年でも、上記のような「バラバラ」な見解をそのまま活字にした書物が出版されている。¹²⁾ その書では「ジェンダー」概念を肯定的に理解している者もいれば、逆に「ジェンダー」に関する思想に対する非難を行った一部の学者、政党やマスコミと変わらぬ論旨の論文も掲載されている。ここではジェンダー（特に「ジェンダーフリー教育」）や、フェミニズムに対する偏見（と言わざるを得ない所感）が隠さず述べられているし、保守的「男女」観を繰り返す「倫理」観も掲載されている。ジェンダー研究やその問題群の存在が徐々に認知されている中、この書のように明確にそれらの議論に対する反発や批判を展開する倫理学研究者も存在する。このように、性に関する倫理的議論は、今も論者の見解が鋭く、そして生々しく対立する場となりうる。

倫理学研究で「性」を対象とするにあたって、共通の地平、言い換えれば研究者間で事前に了解しておく地盤が形成されなければ、今後も繰り返

し、齟齬は生じ続けるだろう。では、共通了解の形成のために何が必要なのだろうか。

先に紹介した日本倫理学会のシンポジウムには、「バラバラ」の原因について言及した発言が収録されている。

「結局この議論全体が何でこんなにバラバラになってしまうんだろうかと一所懸命考えていくのですが、理論的に詰まるどころやはり男女のその本質的な性差というものを、社会文化的なレベルではともかくそれは歴史的に作られたものであるということはおおむね諒解できたとしても、更にやはり本質的なレベル、つまり自然的なレベルでの概念の性差というものは、どうしても、残っていくし、それを前提にして話をされる方ですね、そうではなくてこれはその自然的なレベルでの性差も含めてその性なるものが社会的に文化的に構成されたものだとこのところで議論する方のふたつに、分類されるところでだと思えます。その分裂であると思えます。」¹³⁾

確かに、倫理学研究の世界で「性」を扱うと、上記のような分裂は多く見られる。しかし、この分裂の統一を最小限の了解事項にすることは、多分に困難であろう。というのも、フェミニズムの世界でも「本質主義」と「社会構築主義」とに大きく分かれるように、性差研究の最前線に踏み入り、その結論を押しつけ合うのは、世界観的対立をわざわざ生産しているように思われてならないからである。それらの世界観的対立が存在していることを互いに承知して、その上で性に関する「倫理」や「道徳」、「性文化」の歴史や思想を考察すること自体には大きな意義があるだろう。性差別を問題にする際につきまとう「政治性」を相互に自覚して、共通理解を促進するような建設的議論が進めば、倫理学の世界でも「最小限の了解」が形成されていくのではないだろうか。

ここまで取り上げてきた、倫理学が「性」をテーマにする際の「コンセンサスの不在」という問題は、フェミニズム研究者からも問題視されている。その点を次節で取り上げる。

3. フェミニズムから倫理学への要望

1節でも触れたように、2003年に刊行された『岩波 応用倫理学講義』（全七巻）のうち、第五巻は「性／愛」というタイトルで、ジェンダーやフェミニズムをテーマにして出版されている。「人間」や「環境」と並んで、この表題で一冊にまとめられたことは、倫理学の一分野としてようやく「性」や「ジェンダー」、「セクシュアリティ」などが重要なテーマと認められるようになってきた一つの現われと言えるだろう。

前節で触れた日本倫理学会編『性』と比較しても、本書は倫理学的な立場での多様な研究を共同執筆しているにもかかわらず、「性」や「ジェンダー」について共通見解を執筆者陣が有していることが見て取れる。しかしこの書の特徴は、執筆者のすべてが倫理学研究者で占められているわけではないことである。むしろ、巻末の「シンポジウム」でも語られているように、倫理学を専門とする研究者の参加は金井氏など少数である。¹⁴⁾

フェミニズム研究者でもある金井氏はそのシンポジウムの冒頭に、倫理学とフェミニズム・ジェンダー研究の領域との間で「私なりに考えてきたこと」として三点について言及している。

まず第一は、「倫理研究の場面に対しても、フェミニズム・ジェンダー研究の場面に対しても、さまざまな問題は提起されている」という「この状況」に対する「倫理学の側の議論と危機意識のありよう」だと言う。

第二は、この状況に「応用倫理学はどういう対応をしようとしているか」についてである。金井

氏は「倫理の側には、この状況を語る言葉と理論枠組みがまったく不在であるといっても過言ではないように思える」（金井、251 ページ）と指摘する。起こっている事態の背景には二つの水準があるとする。一つは「ジェンダーという言葉が担う社会関係としての性役割規範をめぐる問題状況」、もう一つは『『性／愛』領域、性行動規範をめぐる問題状況』である。これらの状況に対して、「ジェンダー」「セックス」、「セクシュアリティ」という「言葉の含意」すら、倫理学には「いまだ届いてはいないだろう」と言う。金井氏によれば、倫理学の側もそのことに「危機意識」があり、金井氏のような二つの領域に発言している者が「家族」や「性」がテーマになると呼ばれる状況がある。しかし、「認識論的パラダイム転換を導いた概念・言葉」（「家父長制」や「ジェンダー」など）が届いていないのだから、「いつもすごい徒労感を感じざるをえないというのが正直なところ」だと、心情を吐露している。

では、倫理学はフェミニズムからの問題提起をどう受け止めたと考えているのか。金井氏は「だいたい次の二つ」だと言う。一つは「性風俗の紊乱という問題状況」に倫理学がどう対応するのかということ、もう一つは「性別役割分業観に対して、女性運動、フェミニズムから異議申し立てが出ているけれど、これに対してはどういうふうに対応していくのか」である。

前者については倫理学は依然として「モラリスト的な規範言説の有効性」が崩れているという認識になっておらず、「性風俗の紊乱や性的規範の弛緩」に対しては、まだ「個人の道徳意識や倫理感情に訴えるという対応で可能だ」という「信念体系」にもとづいて「秩序の回復を図ろう」という対応にとどまる」（同、252 ページ）と指摘している。後者については、まだ依然として「性差についての特性論的平等論」が根深く存在している、

12) 篠原駿一郎・浅田淳一編：男と女の倫理学 よく生きるための共生学入門（ナカニシヤ出版）2005 年。この書は「まえがき」「あとがき」にも書かれているように、「性は男と女の二つ」という二分法に全く疑いを持たずに編集しているという、致命的な問題点がある。

13) 日本倫理学会編 前掲書、200 ページ、「質問者 2」の質問より。

14) シンポジウム参加者は、金井淑子氏（司会）のほか、足立眞理子氏、加藤秀一氏、竹村和子氏。

と指摘する。つまり性を理由にした規定的な差を認める立場であるが、しかし平等でなければならない、という理解だということである。

そして第三は「フェミニズムと倫理学の対話」である。この点について金井氏は「フェミニズム・ジェンダー研究の最前線の問題意識を倫理学の領域に伝えていくことができたら」と述べており、また「何としても、倫理学の場面にフェミニズムの最も現在的な問題意識とその理論・水準を届かせていく必要がある」とも述べている。では、それはどのようなメッセージなのか。

金井氏は例を挙げる。「ポスト構造主義ジェンダー論の、セックスとジェンダーの関係をめぐる認識論的な転換、あるいは本質主義と構築主義をめぐる議論といったもの」だと言う。これらの議論が倫理学の領域に非常に大きな問題を投げかけているはずだとする。しかし、それに対して倫理学は「性役割理論」として、「ジェンダー本質主義の典型」（同、253 ページ）に立っている、と批判する。金井氏は言う、「倫理学というのは当為（ゾルレン）の学として、習俗化された価値の規範化という、存在（ザイン）と当為（ゾルレン）でその理論領域が成り立っている」のだから、「セックス」という生物学的性差（存在）と、「ジェンダー」という社会的に構築された性差（当為）の関係を逆転させるジェンダー研究の到達点は、「倫理学の構成そのものに問題提起をしている」と。

金井氏は他の箇所でも「存在（ザイン）と当為（ゾルレン）の関係性をめぐる習俗的な価値の規範化が倫理学の狙いです」（同、263 ページ）と述べている。もし倫理学の「狙い」がそこにのみあるならば、倫理学は社会に内在する習俗を規範に変える手続きを生業とする、政治的には「保守」の仕事ということになるだろう。確かにこれでは、倫理学というフィールドからは、現状を批判的に考察する知的営為は期待できないことになる。

だが、倫理学の主な役割は、規範化していない習俗的な価値を「規範化」するだけでなく、その

規範を理論化（対象化）することも含まれているのではないだろうか。習俗として非言語的な歴史を持つ規範を対象化することによって、客観的な検討が初めて可能になる。だからこそ、現代の倫理学研究が過去の倫理学を批判的に検討できるのである。もちろん同じ文献を用いて過去を懐かしみ、復古を願うこともできるのではあるが、それは学習者の自由に属する問題であって、倫理学の学問的特性に関わる問題ではない。

金井氏は他にも、倫理学に「リベラリズム倫理」と「パターンリズム倫理」を見ている。つまり「個人を自律的な主体としてとらえ、自由や平等、さらに自立や自己決定で規定するという人間観を前提」にした「リベラリズム倫理」、そして「社会を公的領域と私的領域の二元的なシステム体系としてとらえて、法の領域と、法の外のプライバシー領域」の二つの原理で区分し、「パターンリズム倫理」を介在させた、としている。

さらに、倫理学が「性の規範」において前提にしているのは、「強固なジェンダー本質主義に立つ性別の二元体系」だという。「あるいは異性愛主義、性と恋愛の結婚の三位一体規範による家族イデオロギー」が「国家や社会の共同性の紐帯」として、近代的な「個」を社会に媒介する項として位置づけられている、と結論づけている。ここまできると、もはや倫理学はジェンダー研究によって明らかになってきた現代の性差別や「ジェンダー・バイアス」（例えば「女は女らしいのが当然」というような、性差を固定して社会的役割を押しつける偏見）は、すべて倫理学の側の認識であるかのようである。

たしかに古代ギリシアから 20 世紀初頭までの文献講読を重視した戦後日本の倫理学史の一部分は、上に指摘を受けたような認識の倫理学者の研究を「読む」という解釈作業に終始していたと言えるのかもしれない。しかし現在は、この書（『応用倫理学講義』）のように、（実際に論じているのは未だ倫理学の専門家以外だとしても）そのよう

な歴史を批判的に考察する場合もまた、倫理学研究者によって形成されてきている。現在の倫理学研究者が、上に指摘された問題を、まさに「倫理」問題として捉えることは十分に可能ではないのだろうか。

この「フェミニズムと倫理学の対話」で、金井氏が倫理学、応用倫理学の課題として挙げたものは、以下の通りである。「差異と平等をめぐる議論」、「自己決定と自己責任論」、あるいは「私的領域と公的領域、その自由と規制をめぐる問題」、「性や家族にかかわる領域」をどこまで「個人の自律性」でいくのか、または「私的領域への法的な介入をどこまで認めるのか」、「親密圏と公共圏の境界を越えた共同性の原理」、等々。

これらのテーマだけを眺めるならば、倫理学が消極的になって取り扱ってこなかったテーマだと思う倫理学研究者はほとんどいないのではないだろうか。その多くは「応用倫理学」と呼ばれる場で為されている議論であるかもしれないが、すでに多くの議論が為されてきただろう。問題は、それらがフェミニズムの側へ発信されていないことだけなのではないだろうか。

さらに、このシンポジウムではフェミニズム研究者の立場から、倫理学がなぜ「性別役割分業観」や「男女特性論」にとどまるのか、その分析も行われている。

まず、参加者の共通認識として「倫理学は大きな物語」だと規定している。その物語とは、「性的差異を非還元的に見る考え方」（竹村、262 ページ）である。その「性的差異を根幹に置く思想」を「近代家族とか、公私の二分法とか、異性愛主義に翻訳してきた」（同、263 ページ）のだという。その意味で、倫理学は「自律的な個を前提とした間主体的なモラル」だと規定している。「その結果、あたかも自然発生的に、わたしたちを或る一定の〈人間（ヒューマン）〉に造形する倫理観」であるとする。

しかし、倫理学がそのような「人間」像を構築

すること自体に問題の原因が内在しているのだろうか。古来より哲学や倫理学は、人間の普遍の問題を分析する方法として、個別の出自を捨象することを前提として論じてきたのではなかったか。問題の所在はむしろ、それらの考察を（学問全般に言えることであるが）、もっぱら男性だけで営んできて、その結果、男性を「人間（マン）」と称することに疑問を持たなかったことにみられるような、性別構成が偏ったまま形成されてきた歴史にあるのではないか。誰が論じていくか、その生物学的な性別構成やセクシュアリティ（性行動）構成の変化によって、またそのような変化を論じる者たちが自覚することによって、倫理学は変容を遂げていく可能性もあるのではないか、と考えるのは楽観的に過ぎるだろうか。

シンポジウム参加者の議論はこの後、哲学者や倫理学者は「どうして男女特性論」に「はまっているのか」（加藤、265 ページ）という方向へ進んでいる。それに対し金井氏は「倫理学のなかにある生物学的な基盤主義というふうに私は言ったけれど、自分自身を含めた性差に対する素朴な信念や、これにまつわる強い感情、それが最も色濃く出るのが倫理学研究の場面かな」（同ページ）と答えている。それに対して加藤氏は「でも、ほんとうにそういう問題なのか、倫理学という構えそのもののなかに、粗雑な男女特性論とか性別役割分業観の議論そのもの、言説のレベルの問題としてつまずきの石にしまっているような認識装置そのものの欠陥は、はたしてないだろうか」（同、266 ページ）と問うている。参加者たちは、倫理学の「認識装置そのものの欠陥」の可能性を言及するに至っている。

ここまで見てきたように、このシンポジウムではフェミニズム研究者の側では（少なくとも出席者たちは）、倫理学（及び倫理学研究者）は一定のまとまった価値観に留まっていると理解されており、それはステレオタイプな「性別役割観」「性別二元体系」への固執だと認識されている。つま

り、90年代に倫理学会の共同研究で語られているような「バラバラ」という認識ですらないのである。筆者の実感では、今もなお全体としては「バラバラ」な状況にあると言えるが、先に取り上げた2008年の日本倫理学会でのワークショップ（「性の倫理学の可能性について」）のように、若手研究者の中では「変化の兆し」を見て取ることができると考えている。

このシンポジウムでは、「倫理学」ではなく、「中間領域」「中間理論」（同、261ページ）として「応用倫理学」を登場させ、その学問が「性」を倫理問題として語る可能性に、参加者たちは注目している。つまり、正確には旧来の「倫理学」への失望と、「応用倫理学」への期待を語っているのである。もしかするとそれは、「倫理学」研究者への失望や、「応用倫理学」研究者への期待が含まれた意見なのかもしれない。

4. 倫理学とジェンダー論の「接点」のために

前節で見てきたようなフェミニズム研究者側の問題意識は、倫理学という学問が持つ本質的限界を指しているのか、それとも倫理学を扱う人間（倫理学者）の側の問題なのか、明確に区別が為されているとは言い難い。批判の多くは倫理「学」の側の問題として整理され、理解されているが、果たしてそれが原因だと断定して良いのだろうか。前節でも触れたように、その結論に違和感を覚える倫理学者もいるだろう。ここで、一つの視点を取り上げたい。

1節で紹介した日本哲学会の2007年の「共同討議Ⅰ」には北川氏のほかに、舟場保之氏の論文が掲載されており、その中で「アイデンティティ・ポリティクス」の性質について言及している。¹⁵⁾

ある「抵抗」の異議申し立てがなされたとき、「あなたはなぜそのように主張するのか」という問いに対し、「私は〇〇に関して攻撃されているから」

と答えるとする。「しかし論拠がこのようなものであるとしたら、この言い分に納得できるのは同じように〇〇に関して攻撃されている者だけであり、異議申し立ては〇〇に関して攻撃されている者にしか説得力をもたないことになる。だからこそ、このような異議申し立てに無理解な者に対しては、『あなたは〇〇に関して攻撃されていないかわからないのだ』という言い方が（きわめてよく）なされるのだろう。この説明は、「被害者であること」を論拠に主張を展開する時に発生する特有の事態を述べている。つまり、「アイデンティティ・ポリティクスの主張は、アイデンティティに論拠がおかれる限り、アイデンティティが同一の者には説得力をもつがそうでない者には説得力をもたないのである」。しかもその論拠が「反論の余地がない事実」なら、なおさら論拠を問題化することができず、アイデンティティ・ポリティクスの主張は反駁される可能性を「原理的にもたない絶対的なもの」になってしまうだろう、と述べている。したがって「アイデンティティを異議申し立ての論拠とするアイデンティティ・ポリティクスの主張は、他ならぬアイデンティティを論拠とすることそれ自体のために、異議申し立てが異議申し立てとして認知されない」（舟場、73ページ）という事態を生んでしまう。「アイデンティティ・ポリティクス」が論者の出自を議論の正当性の根拠とするかぎり、出自を共有しない読者は普遍的妥当性を論じることができなくなってしまうだろう。

ここでテーマになっているのは「哲学」であるが、「倫理学」でも同様の事態が生じうるだろう。倫理学でも「ジェンダー」をテーマに考察しようとするれば、やはり「アイデンティティ・ポリティクス」がその「被害」や「被抑圧」を論拠にすれば、議論の入り口の段階で、或る特定の読者層には主張がスムーズに理解されるだろうが、別の読者層にとって理解が困難であってもやむを得ない、と

いう足枷がなされてしまうことにならないだろうか。これではいつまでも、倫理学の学問的制限の問題と倫理学者の「ジェンダー・バイアス」による「無理解」の問題が結びつけられたまま、フェミニズム研究者の側からの批判が継続することになりはしないだろうか。もちろん、「被害者が被害者として、被害の事実を論拠にして主張する」語りが不要であるとは考えないし、それは今後も重要であるが、そのような議論は絶えず、アイデンティティを共有しない者との間に断絶が生じる可能性があるし、ジェンダー論はその断絶を埋める役割をも担っているのではないだろうか。

大学の教養科目として、「女性学」や「ジェンダー論」は全国各地の大学で幅広く開講されている。それはもちろん「女子大学」だけではなく、「共学」で学ぶ学生にも開かれた学問として展開されてきた歴史がある。今後のさらなる発展のために、「性」による被差別、非抑圧経験がなくても理解の可能な学問の語り口がもっと検討されても良いだろうし、多様なアプローチが開発されても良いだろう。

結論として、筆者が「はじめに」で仮称した「ジェンダーの倫理学」が可能であるとすれば、おそらく以下になると思われる。まず第一に、ジェンダー論研究の理論的蓄積に謙虚に学びながら、同時に既存の倫理学史を対象化させ、反省的考察を加えていく。その中で、ジェンダー論を踏まえた倫理学の「像」を形成する目的意識を持ちつつ、同時に「アイデンティティ」を論拠とした主張に終始せず、「すべての『性』が問題認識を共有する」倫理学を目指していくことになるだろう。その課題としては、『性／愛』で提起されたようなテーマもあるだろうし、日本倫理学会の若手研究者によるワークショップの文章で書かれたような「伝統の見直し」も含まれるだろう。それでもなお、筆者の目指す学が「旧態依然の男性中心主義」の論理だと批判されることもあるだろうが、それこそ

謙虚に耳を傾け、反省しつつも理論構築に向かうしかない。それが、倫理学者の為すべき重要な仕事に他ならないと考えているからである。

おわりに

金井氏は、本稿で取り上げた『性／愛』の「はじめに」の冒頭で、本巻が倫理学とフェミニズムの「抗争的対話」の場になることは避けがたい、と記している。しかし、「抗争」だと思っているのは、（正直に申し上げて）フェミニズム研究者の側だけではないのだろうか。倫理学はむしろそこまでの問題意識を持って「性」の問題に対峙していると呼べるような状況になっているわけではない。むしろそれ自体が大きな問題であろうと思われるのである。

本稿の紙幅で、「日本の倫理学（および倫理学者）はフェミニズムやジェンダー論にいかなる貢献をすべきか」という大きな問題に詳細な解答を出せるわけではない。しかし、フェミニズムやジェンダー論を研究する側が倫理学（および研究者）をどういう視点で見ている、何を望んでいるのかを知ること得られる意義は大きいと思われる。もっと活発に双方向の交流がなされるならば、また「性」をめぐる現状認識について互いが互いのフィールド（学会など）に乗り込んで行き、活発に討論を重ねるならば、そこから得られる成果は小さくないだろう。一倫理学者として、倫理学が「人と人との関係」を扱う学問である限り、それらを為し得る学問であると筆者は信じて疑わない。

共学の教育現場で「倫理的な立場で」「性について」語っていく営みはほとんど始まったばかりである。¹⁶⁾ その多くは、さしあたりフェミニズムやジェンダー論のタームを手がかりにすることから始まるだろうが、それは同時に倫理学の新たな

15) 舟場保之：ジェンダーは哲学の問題となり得ないのか、日本哲学会編『哲学』No.58、65～66ページ。

16) たとえば松島哲久氏は、学生がともに「性と人権」を考える教育のあり方を提言している。松島哲久：性と人権、『大阪薬科大学紀要 vol.1』2007年。

展開の出発点でもあるだろう。その場に多くの倫理学研究者が参加されることへの期待を表明したい。

水球競技の初心者指導 2*

当麻 成人

Coaching for Beginners in Water Polo 2

Narihito TAIMA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 24, 2008; Accepted November 25, 2008)

The sport of water polo includes the different important movement components of swimming, jumping and throwing. Body contact is also allowed. Water polo matches are so strenuous that water polo is sometimes called “martial arts in the water.” The ball can be handled with one hand and points are scored by a variety of shooting techniques. Ball sports flourish in Europe where water polo matches rank among the most popular sporting events. Water polo is well-established among the people of Hungary where it is the national sport. European water polo players are imaginative and flexible. Why does Europe turn out these players in such numbers? It is probably the difference in coaching techniques while the players are still at the junior stage. In Japan there is a tendency to control players, emphasizing words such as “basics” and “tactics,” whereas European players are coached from an early age in such a way as not to spoil opportunities for them to move and think for themselves. This is no doubt where the important difference lies. There is a wide range of training techniques. I hope to see the emergence of more coaches who train players by encouraging originality and flexibility.

Key words—coaching for beginners; footwork; defense; pass; shooting

はじめに

水球競技のテクニック、あるいは理論について、世界のトッププレーヤーから学ぶべきところはたくさんある。今年行われた北京オリンピック開会の前にスペイン・ナショナルチームが、日本に立ち寄り合宿を行った。彼らを見ていると、一人一人がゲーム中ボールを保持している時間が非常に短いように思われた。またディフェンスの時には、常に味方とコミュニケーションをとり、相手の攻撃を予測しながらプレーしていた。オフエン

スの時には、パスを受ける前にディフェンス選手の状況と動きを見据えて、シュートかパスかフェイントかを選択しているようにも見えた。体勢が次々と変わっていく場面に臨機応変に反応している。様々な状況に対して最上の対応力が身体に刷り込まれているような感じがした。スペインチームの選手たちはゲーム中、ボールを持っていない時の動きを見ると、ほとんど休んでいない。何かチームに貢献できることを絶えず探している。水球に限らず球技において、ほとんどの競技は一人がボールを持っている時間は僅かである。それゆ

え、一人一人がボールを持っていないときにどれだけ頑張ることができるかが、得点を増やし失点を減らすことに繋がっていくということを、改めて感じた。

近年の水球競技は、ルールの改正などもあり、展開が遅くては到底相手を崩すことはできない。また、限られた選手のみに依存するようでは負担が増し、結局チーム力が落ちることになる。そこで、ベンチに入っている選手全員の活躍が必要になってくる。ベンチに入っている全員がまんべんなく起用され、その起用にしっかり応えられる選手の育成が必要だと思われる。つまり、選手層をより厚くすることが望まれる。学校の教員に頼ったチーム作りだけではなく、地域に根ざしたクラブチームの設立も視野に入れ、行動に移していくことも考えなくてはならない。水球人口が拡大し選手層が厚くなっていくためには、指導者もまた増えていかなくてはならないと思われる。これまで水球競技を経験していない人も指導者になって、より多くのチームが生まれ、多くの選手が生まれることが望ましい。水球に興味があり、指導者になりたいと考えている人は多く存在する。本稿はそのような人たちが指導へのヒントを得られるように、主に水中トレーニングについて述べたものである。

1) パス練習について

まずパス練習の心構えについて述べたい。幼少時において、女子も男子も水中でボールを投げる経験が少ないことが多いと思われる。このため日々の練習においては、いくつかのバリエーションを用意して、様々な状況に対処できるようにしておかなくてはならない。試合と同じように集中して正確にパスし、かつタイミングを合わせることに気をつける。水中にあるフィールド選手の身体は、試合中、水面に対して垂直姿勢はおよそ70%、水平姿勢はおよそ30%という報告がある。

2つの姿勢において手（以下、スカーリング）と脚の推進力（以下、巻き足、蹴り足）を十分に発揮させて、安定した姿勢をどのような状況でも維持することを心がけるようにする。

ボールハンドリングは、水球競技におけるボールコントロールの基本中の基本であり、ハンドリングがしっかりとできるようになれば、シュート、パス、ドリブル移動などの技術も確実に向上するというのを心に留め置き練習しなければならない。水球競技がもっとも盛んなヨーロッパの指導者たちは、10 mほどの距離であれば手首の力を主に使う投げ方を推奨しているようである。体幹の捻転や肩の力に頼った投げ方で多く練習するより、シュートが上手になるという。つまり、シュートの左右の打ち分けやゴールキーパーに読まれにくいシュートが打てるようになるという理由からである。

次にパス練習のバリエーションについて考えてみよう。パスは2人一組、3人一組、あるいは4人、5人など、人数を増やし変化をつける。前後左右および垂直方向の動きを入れて、なるべく試合中に発現するような場面を抽出して行うようにする。またボールの数を複数にして周辺視野の向上をはかるようにする。球技的発想が育つように、時には選手たちに自由にパス練習を行わせることも必要である。間隔を広くしたり狭くしたりして、徐々に距離を変化させ、遠近感が変わっても正確にタイミングよくパスを投げられるようにしたい。さらに、パスインターセプト（パスをする側と受け取る側のパスコースやボールの速さ、高低を見極めて相手ボールを奪う）の練習では、5 mほどの距離で直線に3人並び、両端の2人は内を向き両端同士でパスをする。中央の選手は行われているパスをカットするために、ジャンプしたりフェイントをかけたり工夫して、ボールをインターセプトしようと心がけるようにする。

2) オフェンスについて

続いて、攻撃練習について考察しよう。試合では、狭い空間（特にゴールに近いエリア）の中でボールに関わることができる人数が、相手より多い場面（数的優位）をつくる必要がある。2対1、3対2、4対3の攻撃練習はそのために有効である。これは攻撃側が数的優位の場面の練習である。他方、防御側は1人少ない状態での守りのトレーニングとなる。練習の際には、あまり大きく広がらないようにおおよそそのエリアを決め開始する。攻撃者は数的に優位であることを心得てプレーしなければならない。心理的に焦ってプレーすると、容易に相手の術中にはまってしまう。ボールを持っている人はキープを心がけ、防御者をひきつける役割の他の人はパスを受けやすい位置、つまり、防御者が間にいない位置にすばやくポジションを移し、パスを受けやすい体勢に準備しておく。またパスだけでなく、ボールをなるべく高く持ち上げて、脚とボールを保持していない方の手を使い、スカーリングで前進したりフェイントを使う。ドリブルは狭い空間ではインターセプトされやすい。特に左右に防御者がいるときは注意する必要がある。シュートエリアに近づいたら、ドリブルを控えボールを持ち上げて、チャンス伺いながら進入する。2対1に攻撃者、防御者を1人ずつふやしただけで、動きはかなり複雑になる。すなわち、攻撃者にとってはパスのコースが2つになり、パスを出す人と受ける人のほかに、ボールにふれない人がいる。この人がどのように動くかで、攻撃の幅が広がる。防御者は、1人がボールを保持している人をマークし、もう1人がほかの2人の攻撃者をケアする。ボールが動けば役割を変え、適切に対応する。カバーリングとポジションチェンジがすばやくできるようになれば、3対2であっても2対2であるかのように数的ハンディを克服すること

ができる。また人数を増やして3対2、4対3にすれば、試合中に見られる要素がより多く入ることになる。

3) シュート練習について

すべてのシュートフェイクは、実際の試合中に全力でシュートを打つ時と同じモーションと勢いで行うべきである。多くの選手はシュートを打つ際に、自分のみのタイミングに終始しているので、ゴールキーパーとのかけひきを要するシュート練習を多くすることを勧めたい。実際、日本の選手のシュートフェイクを見た海外のコーチは、ゴールキーパーを揺さぶるまでに至っていないので、フェイクになっていないことが多いと指摘している。

また、シュート練習のポイントとしては、たとえば、プレスディフェンスを想定したシュート練習など、実際のゲームを想定して練習を組み立てることが重要である。プレスされた状況下では、泳いでディフェンスを振りほどかなければならない。したがって、この状況下でのシュートは身体がやや水平姿勢になることが多くなる。また、ゾーンディフェンスを想定したシュート練習では、ゾーンで守られ始めると、スタンディング姿勢（垂直姿勢）になることが多い。したがって、ミドルシュートが多くなることが考えられる。

以上のように多様なディフェンスの動きを想定して、あらゆる状況に対処できるようなシュート練習を構築することが大事である。

4) 基本的なフットワークについて

コート上の選手は、攻撃時、防御時において、いつ自分の近くにボールがきてもいいように構えてはならない。ボールが自分より遠くにあるとき、あるいは、疲労して苦しいときなどは、体勢を垂直姿勢（脚が身体の下にある）にして休ん

でしまう傾向にある。この状態のままだと、いざ自分の近くにボールがきたときにすばやく対応できない。防御時の基本姿勢は攻撃時よりも水平姿勢で構え、対峙している相手がボールを所持しているいないに関わらず、スカーリングと脚を使って瞬時に反応できるようにしておくべきである。

自分がマークしている相手がゆっくり泳いでいるとき、あるいはトップスピードで泳いでいる相手に追いつき回り込んで前に入るときなどは、フロントクロール（顔を上げたクロール）で相手との間合いを詰める。また、後方の状況を視認するためには、バックストローク泳法のまま、顔を起こして泳ぐことが有効となる。進行方向を右に変えるときは左手（腕全体）を右肩側に入水させる。左側に方向を変えるときは右手を左肩側に入水させる。大きく方向変換するときには、手を大きく顔の前でクロスさせる。前方向へ進んでいるところから後方向への進路変更は、直進中両腕を大きく左右に開くとともに、手のひらを開いてブレーキをかける。同時に脚を身体の下に素早く移動させ、十分引きつけながら身体の向きを変える。脚と手を大きく使い、水を後方に押しやる。

5) ディフェンスについて

ここではディフェンスの心構えについて述べていきたい。水球競技はチーム競技であるが、ディフェンスにおいては個人が受け持つ責任が大きく、試合の勝敗を左右する要因となる。試合中に失点するのは、たいていの場合、1対1での対決の際に相手方に負け、劣勢にたたされたときである。どのようなディフェンスシステムを用いようが、1対1でのディフェンス力がなければチームディフェンスは成り立たないことをしっかり認識しておかねばならない。

基本のディフェンスとして、まずシュートブロックについて述べよう。シュートブロックは、ブロックそのものの技術だけでなく、ゴールキー

パーとのコンビネーションも大切になる。普段のトレーニングの中で、シューターの邪魔をするという意識を積極的に持ち、イージーなシュートを打たせないようにする。ブロックは基本的にはシューターの利き腕に入るようにするが、試合中は常に良好なポジションに入れるわけではないので、何らかのストレスをシューターに与えるようにしたい。

次に、ゴールキーパーについて考えたい。ゴールの前で体を張ってシュートを止めるゴールキーパーは、守りの要である。シュートモーションが見にくいゴール前からのシュートや、タイミングを外してくるシュート、スピードシュートなどにいかに素早く反応するか、ということがゴールキーパーの最大の課題となる。反応を素早くするために重要なことは、相手よりも先に準備しておくことである。基本はリラックスした姿勢で構えることである。試合ではボールが常に動いているので、ボールから目を離さず、どこからシュートが飛んできてでも対応できるように準備しておかねばならない。目線は単にボールのみを追いかけるばかりではなく、パスされた瞬間にはボールの行き先のプレーヤーに目線移しておく。シュートモーションを見逃さないようにするためである。

ゴールキーパーはマイボールにしたら、攻撃の起点となるパスを出さなければならない。そのため素早いフィールディングと正確なパステクニクを修得しなくてはならない。重要なことは、いち早くコート全体を見る体勢を作ることである。ボールをピックアップすると同時に、全体を見渡して、どこにパスを出したら攻撃がスムーズに展開するかを瞬時に判断しなければならない。特に速攻のケースでは、ほんの僅かの躊躇がチャンスを逃すことになるので、日頃から判断に時間がかからないように注意しなければならない。

続いて、試合において防御時の数적不利の状況に陥った際の対処について述べたい。試合中、相手に速攻を展開されたときの場面でよく見られる

のが、防御側の人数より攻撃側の人数が多いケースである。防御側から見て1対2、2対3という状況は、完全に主導権を攻撃側に握られている。このような状況下では安易にボールを奪いに行くと、相手にパスやドリブルで簡単にかわされ、0対2、1対3などの状況となり、攻撃側に容易にシュートチャンスを作られることになる。このような場面で防御側に求められるのは、攻撃を遅らせることである。チームメイトが戻る時間を作る努力と工夫が必要である。また最終的にシュートを打たれるにしても、そのシュートの決定力を低下させるように最善を尽くすことが大切である。相手がドリブルやパスの動作になっても確実に奪えるとき以外は、前に出過ぎないように間合いに注意する。自分が抜かれれば、より確実性の高いシュートを打たれる結果になることを自覚することである。このような場合は、相手に多くのパスを回させたり、ドリブルを多くさせたり、パスのタイミングをずらさせたりして、味方が戻る時間を稼げるように工夫する必要がある。たとえば、シュートを打たれるにしても、そのチームのシュートがうまい選手から打たれるのではなく、シュートが苦手な選手に打たせるようにもっていく。あるいは、なるべくゴールから遠い位置や、ゴール正面から大きくはずれた、角度のあまりないところから打たせるようにする。シュートを打たせないのがベストであるが、打たれる場合は、得点の確率が低いところから打たせようということと、得点確率の低いところから打たせることを常にイメージして、プレーするように心がけることが肝要である。

最後に、スクリーンプレーへの対処について述べたい。試合において、2対2の状況を2対1にしてシュートチャンスを作る手段として、攻撃側はスクリーンプレーを使うことがある。これは、攻撃側の1人の選手が防御側の選手が進もうとするコースにあらかじめ入って、攻撃

側の選手が壁（以下、スクリーン）のように立ちふさがって防御側の選手の前進を妨害し、防御側の選手を遅れさせてシュートチャンスを作るというものである。これが成功すれば、攻撃側の意のままに2対1の状況を作られてしまう。その対処の仕方としては、第一に、スクリーンの間に割り込み、密着マークを徹底する。スクリーンを作る攻撃側の選手とその防御選手との間に間隙があれば、その間に入り込んで徹底的にマークを続ける。

第二の対処法は、すばやく回りこんで対処するというものである。すなわち、スクリーンとなる攻撃側の選手とマークする攻撃側の選手との間に間隙がまったくない場合、スクリーンとなる相手選手の後ろに回り込んで、スクリーンにぶつかることを回避する。ただし、攻撃側より先回りできる反面、先読みし過ぎて攻撃側の選手に逆を突かれたり、シュートを打たれることがあるので、相手の動きを正確に読むことが必要となる。第三の対処法は、しっかり声掛けをして、マークする相手をスイッチすることである。体格が同じような選手同士ならばマークする相手が替わっても支障はないので、そのままマークする相手をチェンジしてしまう。ただし、自身がフローターディフェンスではない場合は、フローター選手とのスイッチはインサイドで1対1に持ち込まれた場合、不利な状況になるので注意が必要である。

おわりに

以上のことを総合して、トレーニングのプログラム作成について考察すべきであるが、このことは次回の課題としたい。

まだマイナー競技と言われる水球競技を、早くメジャーな競技に押し上げたいと思う水球関係者は多い。しかし、活動資金、練習場所の確保など問題は山積している。やはりナショナルチームがオリンピック出場を果たすなど、国際大会での実績を上げていかないと、日本における水球競技に

対する関心は高まらないであろう。山積する諸問題に埋もれてしまうのではなく、今できることを着実に継続して行わなくてはならない。それは選手の育成という一言に尽きるといっても過言ではない。一人でも多くの水球競技の指導者が増え、水球に携わる人が、今後草の根のように広がることを期待したい。選手育成が順調に進み、水球の選手人口が拡大すれば、大人数の中から能力のある選手を選抜できるというメリットがある。本稿で述べたことが水球指導のすべてとは思わないが、少なくとも、初心者を指導するコーチ、特に指導するのがはじめてのコーチにとっては、指導上のヒントとなるものがあるのではないかと考えている。

水球人口数は他競技に比べると圧倒的に少ない。しかし将来、様々な指導者が生まれてくれば、それとともに、これまでとは異なる新しいアイディアが出てくる可能性があると思われる。その意味で、指導者が増えることは、水球競技の未来にとっては明るい兆しとなることと思う。

参考文献

- 1) 石井喜八, 西山哲成: スポーツ動作学入門 (市村出版) 2002.
- 2) H. デーブラー (稲垣安二, 上平雅史監訳, 谷釜了正訳): 球技運動学 (音羽製版) 1985.
- 3) トレーニング科学研究会編: 競技力向上のスポーツ科学Ⅲ (朝倉書店) 1991.
- 4) H.T.A. ホワイティング (石井喜八他訳): ボール・スキル (ベースボールマガジン社) 1973.
- 5) L.P. マトヴェーエフ (佐藤雄亮訳, 魚住廣信監訳): ロシア体育・スポーツトレーニングの理論と方法論 (㈱シナノ) 2008.
- 6) (財) 日本水泳連盟水球委員会: 外国人指導者講習会報告書 (平成 14 年度～平成 18 年度) (㈱トップフォームズ) 2007.

大阪薬科大学紀要 Vol.3 (2009)

第 2 部 (薬学系)

Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences

3 (2009)

Part II (Pharmaceutical Sciences)

Synthetic Study of 4-Aza-4-deoxypodophyllotoxins

Masao ARIMOTO*, Atsushi MIYAMOTO, Hirofumi NAKAYAMA, Tadashi OKANO

Haruko MIYOSHI, Azusa IWAI, Masako YAMANAKA, Fumie HIRANO, Ayaka TASAKA,

Ami OHGURO, Hayato ICHIKAWA, and Yoshihide USAMI*

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 22, 2008; Accepted November 12, 2008)

The diastereoselective Michael addition of aryllithium to novel quinolines bearing oxazolines as chiral auxiliary was examined for the possible synthesis of the chiral antitumor compound 4-aza-4-deoxypodophyllotoxin (PDX). Unfortunately, most of our trials resulted affording undesired product formed by oxazoline ring opening with aromatization of C-ring in the 4-aza-4-deoxyPDX skeleton. Only successfully obtained Michael adduct, which had a methyl group at C-3, was also aromatized to 4-aza-1,2,3,4-tetrahydro-4-deoxyPDX during transformation to the target molecule.

Key words—synthesis; antitumor; 4-aza-4-deoxypodophyllotoxin; chiral oxazoline; aromatization

INTRODUCTION

Because of their strong antifungal or anticancer activity, a number of studies on the isolation or synthesis of lignans, which are compounds consisting of two phenylpropanoid molecules, have been conducted.¹⁻⁷ We have been engaged in the isolation and synthesis of cytotoxic lignans from Okinawan *Hernandia ovigera* L.⁷⁻¹⁵ since 1976.

The most popular lignan is podophyllotoxin (PDX) (**1**), the major compound in *Podophyllum* sp. However, PDX **1** could not be used as a drug because of its excessive toxicity.¹ After natural PDX was chemically modified, it was developed into clinical anticancer drugs etoposide (**2**) and teniposide (**3**), as shown in Fig. 1.^{16,17} Interestingly, the anticancer activity of **2** and

3 is due to DNA topoisomerase II inhibition, whereas the cytotoxicity of mother compound **1** is effected by inhibiting tubulin formation. Another promising candidate for phase II clinical trial is GL-331 (**4**).¹⁸ Clearly, the synthesis of PDX analogues is important for new drug discovery. Recent synthetic targets receiving great attention are azapodophyllotoxins (azaPDXs) (**5–7**) since of the potential as new anticancer drug candidates.¹⁹⁻³⁵ Compound **5** had almost same cytotoxicity against P388 leukemia cells as **1**.³⁰ And compound **6** was elucidated to be extremely cytotoxic on various tumor cell lines by inhibition of microtubule assembly like **1**.³⁵ Therefore we are also interested in the chiral synthesis of azapodophyllotoxins.²⁹

In 1999, Takeya and co-workers reported the successful synthesis of chiral 4-aza-4-deoxypodophyllo-

*e-mail: usami@gly.oups.ac.jp

This paper was written on the occasion of the retirement of the first author, Professor Masao Arimoto, from Osaka University of Pharmaceutical Sciences.

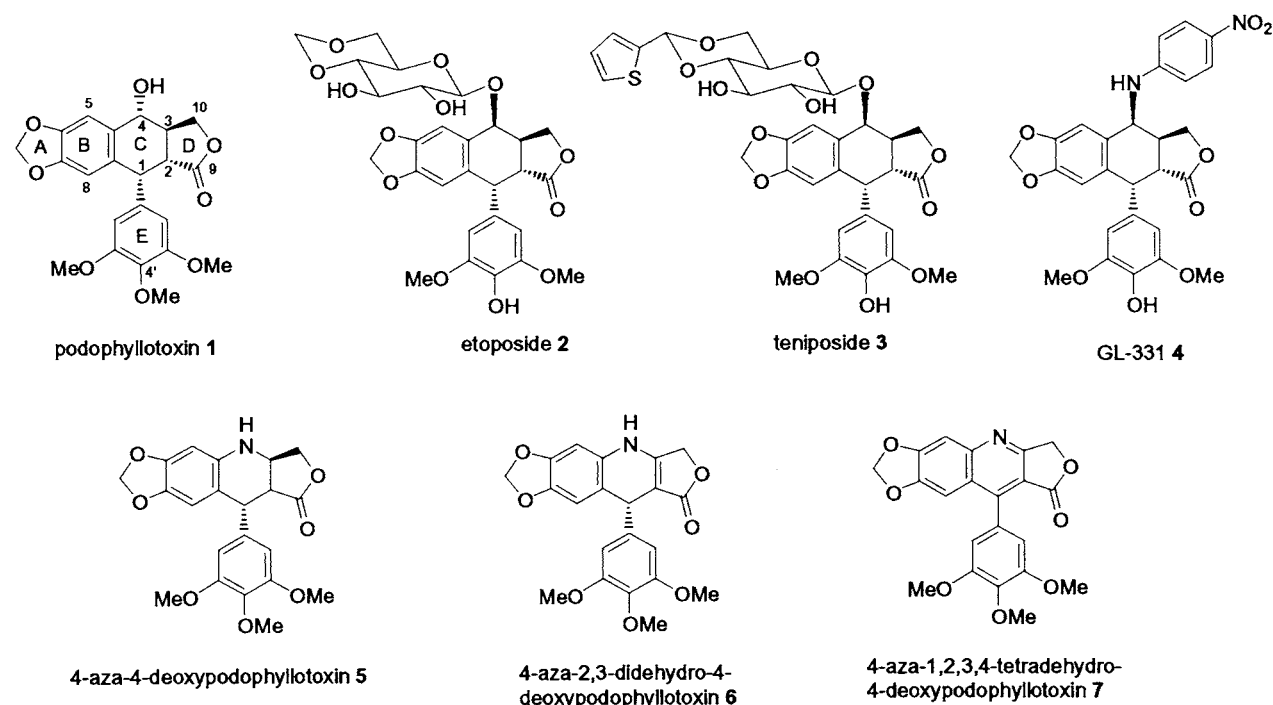


Fig. 1. Structures of podophyllotoxin and analogues

toxin (4-aza-4-deoxyPDX 5) using natural **1** as the starting material. Other reports of 4-aza-4-deoxyPDX synthesis, including **5**–**7**, are racemate synthesis or synthesis of compounds without a stereogenic center.^{31–35} Then, we attempted to perform the chiral synthesis of 4-aza-4-deoxyPDXs **5** or **6** using the classic Meyer method and oxazolines derived from amino acids as chiral auxiliary. Herein we report our synthetic study for chiral 4-azaPDXs and also show that the aromatization significantly stabilized the resultant molecules.

RESULTS AND DISCUSSION

Our synthetic approach to chiral 4-azaPDX followed Meyers' successful asymmetric total synthesis of **1** in 1988 using diastereoselective Michael addition to

naphthalene derivatives with oxazolines as the chiral auxiliary. The introduction of 4-nitrogen to C-ring seemed very attractive as it might allow many chemical modifications, such as *N*-alkylation or *N*-acylation.

The synthesis of novel chiral quinolines is illustrated in Chart 1. Commercially available 6-nitropiperonal (**8**) was reduced to 6-aminopiperonal (**9**) by adding aqueous ammonia with catalytic ferrous sulfate and *c*-hydrochloric acid with vigorous agitation at 90°C.³⁷ Amine **9** was reacted with β -ketoesters via Friedländer synthesis^{38,39} to afford ethyl quinolinecarboxylates (**10**), and these were hydrolyzed to quinolinecarboxylic acids (**11**). Chiral amino alcohols prepared from amino acids were condensed with prepared **11** under Vorbrüggen conditions to yield desired chiral oxazolines (**12**).

Our early attempt at the Michael addition of phenyllithium to **12a** gave not the desired imine-type product but enamine, as observed in the ¹H-NMR spectrum of the crude product. The enamine was so unstable that it aromatized easily into **13** during

purification by silica gel column chromatography or exposure to air, as illustrated in Chart 2. The ¹H-NMR spectrum of crude enamine had two broad signals around 5.14 ppm corresponding to two H-1 protons of the diastereomers.

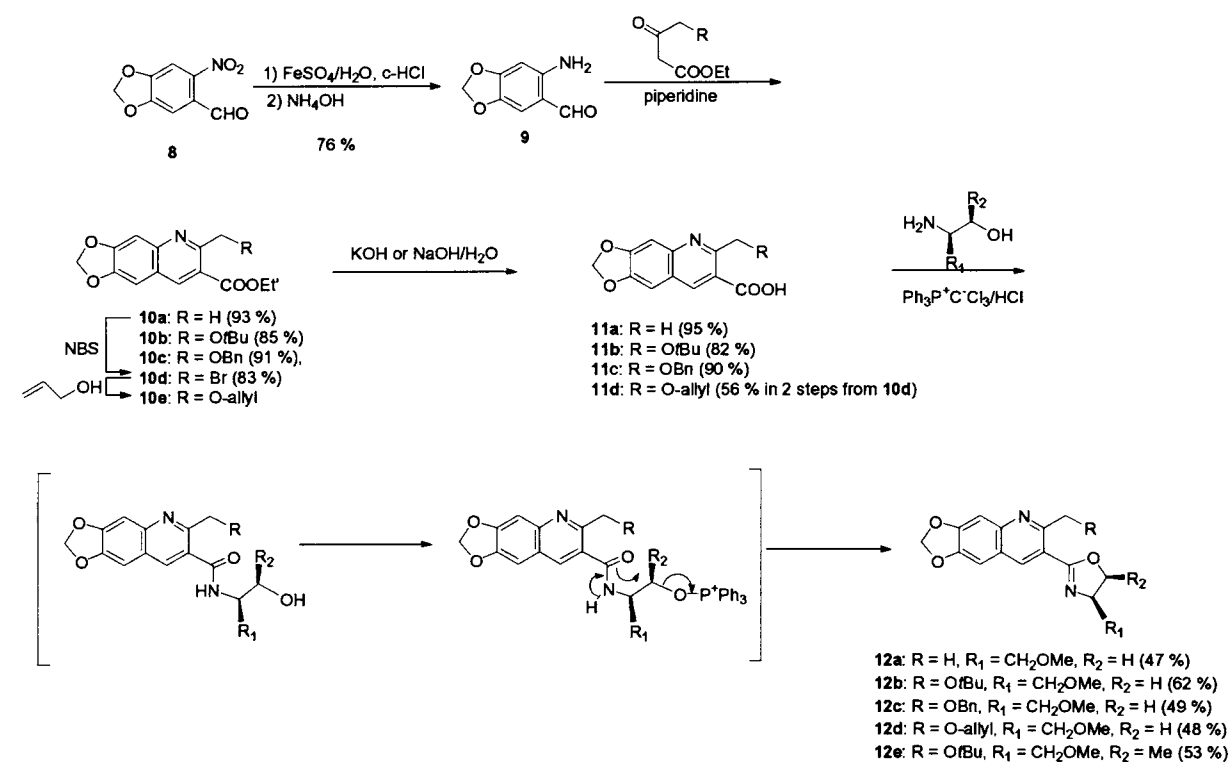


Chart 1. Synthesis of chiral oxazoline-quinolines via Friedländer's method

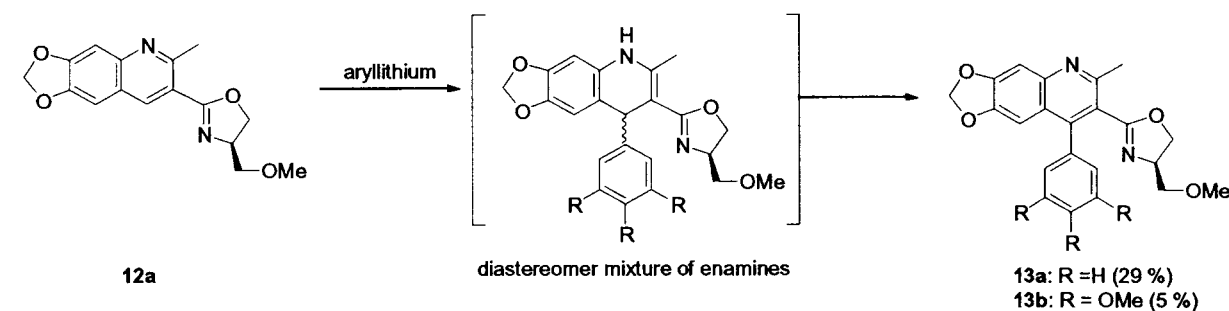


Chart 2. Michael addition without ClCOOMe

Then, we attempted to trap electrons on the nitrogen atom neighboring the piperonyl ring by adding methyl chloroformate in order to inhibit aromatization. The results are summarized in Chart 3 and Table 1. As seen in entry 1, Michael adduct **14**, which was a mixture of

inseparable diastereomers in the ratio of 78:22 as shown by NMR analysis and whose relative stereochemistry could not be determined, was obtained only when R = H.

But all other trials gave complex mixtures. Most of materials were lost in purification process. Structures

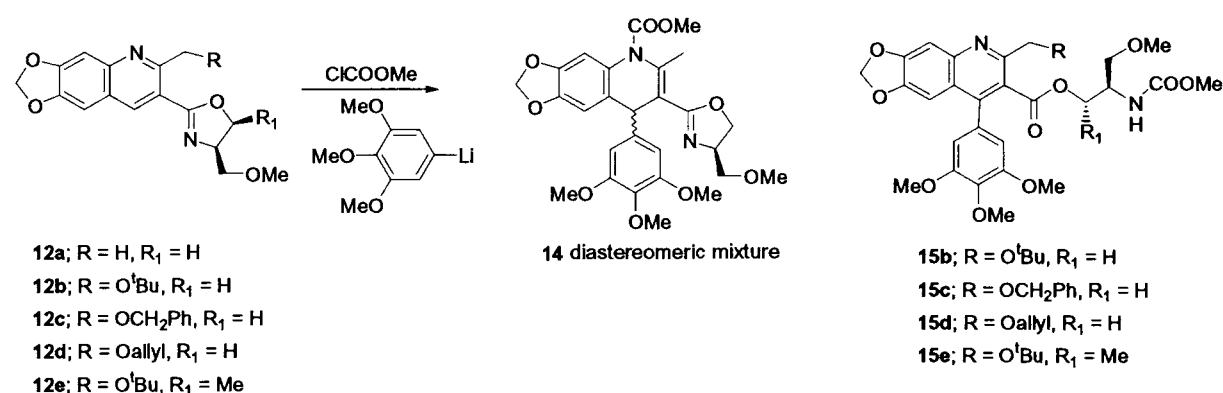


Chart 3. Michael addition with ClCOOMe

Table 1. Michael addition of aryllithium with ClCOOMe

entry	substrate	product	yield, %
1	12a	14a,b (78:22)	71 (combined)
2	12b	15b	6
3	12c	15c	1
4	12d	15d	1
5	12e	15e	2

of undesired products **15**, which were purely isolated with poor yield, were determined by detailed 2D NMR analysis as summarized in Fig. 2.³⁵ Their formation was explained by oxazoline ring opening.

A plausible mechanism for the oxazoline ring opening is illustrated in Chart 4. Electron trapping might occur not at the desired nitrogen atom (N-1) but

at the nitrogen atom in oxazoline during the Michael addition of aryllithium. The tentatively formed adduct might be easily attacked by a hydroxyl anion because of its instability to afford more stable product **15**.

From the results described above, we altered our initial plan of preparing Michael adducts with C-3 chiral oxazoline on C-3 and protected hydroxymethyl

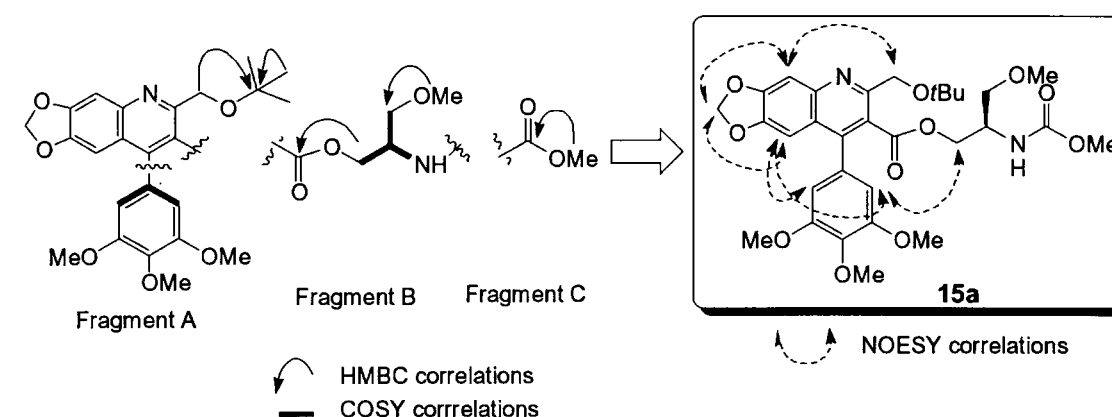


Fig. 2. Structural determination of the reaction product **15a**

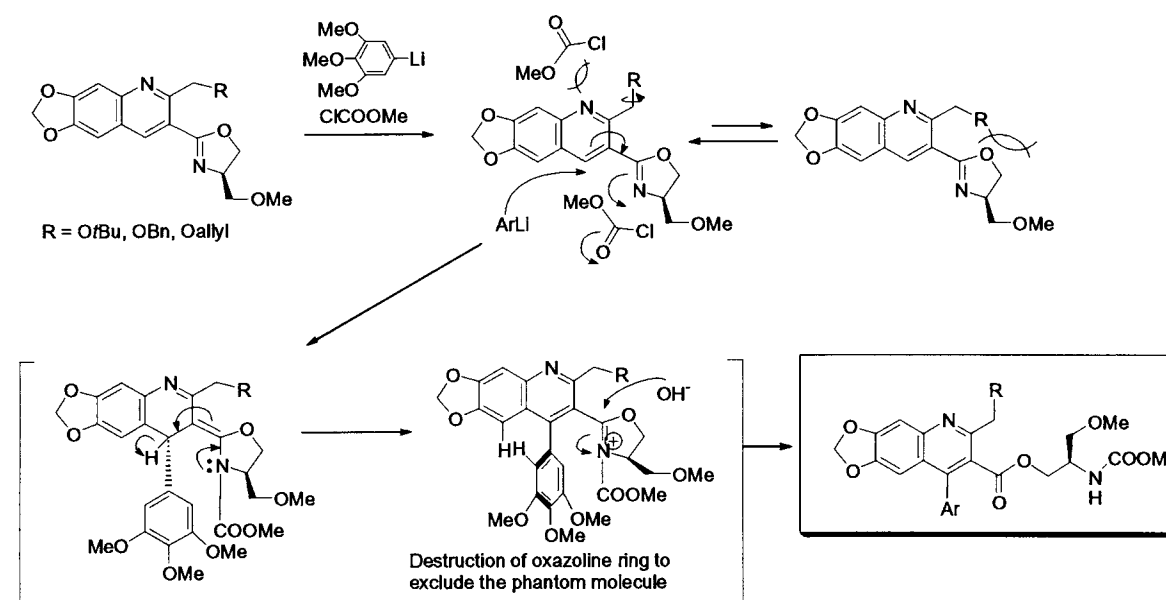


Chart 4. Plausible mechanism for oxazoline ring opening

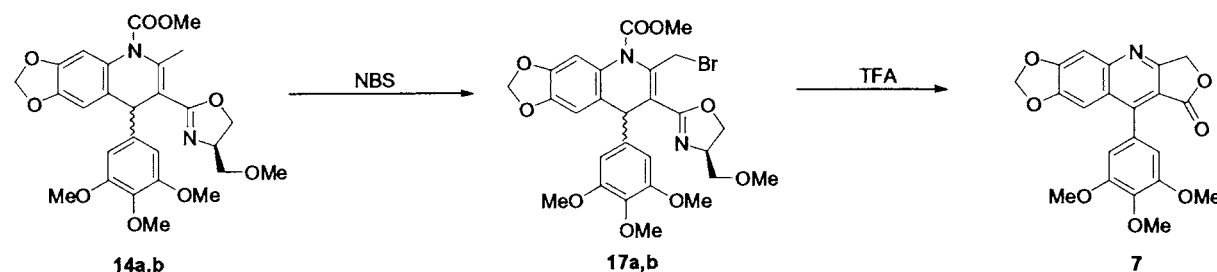


Chart 5. Transformation of 14 to 7

group on C-2 in the quinoline ring. We chose to examine the transformation of successful Michael adduct **14** into 4-aza-4-deoxyPDXs, as summarized in Chart 5. A mixture of Michael adducts **14a,b** was treated with NBS in the presence of a catalytic amount of benzoylperoxide to give bromide **17** in 38% yield. Then, **17** was hydrolyzed with TFA followed by cyclization. However, the sequence of reactions resulted in loss of chirality to afford aromatized **7**. We supposed that the aromatization was due to the significant stability of **7**. We reconfirmed that the chirality on the C1-C1' axis in the trimethoxyphenyl group of **7** did not remain based on its specific rotation value of 0.

CONCLUSION

We have synthesized novel quinolines bearing oxazolines as chiral auxiliary and examined the diastereoselective Michael addition of aryllithium to them for the synthesis of the chiral antitumor compound 4-aza-4-deoxypodophyllotoxin (PDX). Most of our attempts at diastereoselective Michael addition resulted in ring opening of oxazoline with aromatization of C-ring in the 4-aza-4-deoxyPDX skeleton, as a result

of significant instability of the desired adducts. Only successful Michael adducts with a methyl group at C-2 of quinoline were hydrolyzed and cyclized to afford **7** with loss of the chiral center at C-1. We will continue trying to separate **14a** and **14b**, and will look into other approaches to retain the chirality in 4-azaPDXs once formed.

EXPERIMENTAL

IR spectra were obtained with a JEOL FT/IR-680 Plus spectrometer. HRMS was determined with a JEOL JMS-700 (2) mass spectrometer. NMR spectra were recorded at 27°C on Varian UNITY INOVA-500 and Mercury-300 spectrometers in CDCl₃ with tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Melting points were determined on a Yanagimoto micromelting point apparatus and are uncorrected. Specific rotations were measured on a JASCO DIP-1000 polarimeter and $[\alpha]_D$ values are given in 10⁻¹ deg cm² g⁻¹. Liquid column chromatography was conducted over silica gel (Nacalai, silica gel 60, mesh 70–230 or 230–400). Analytical TLC was performed on precoated Merck glass plates (silica gel 60 F₂₅₄) and compounds were detected by dipping

the plates in an ethanol solution of phosphomolybdic acid, followed by heating. Dry THF was distilled over sodium benzophenone ketyl under nitrogen atmosphere.

Synthesis of quinolines **10** using Friedländer method

Typical procedure: To a suspension of **9** (6.4 g, 38.8 mmol) with ethyl 3-oxo-butanoate (13.9 mL, 108.8 mmol) in EtOH (100 mL) was added piperidine (13.9 mL, 140.6 mmol) dropwise under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at 40–50°C for 2 h and refluxed for 30 min. The reaction mixture was acidified with *d*-HCl and the solvent was removed under reduced pressure to afford a residue that was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was successively washed with *d*-HCl, water, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to give a crude mixture that was purified by silica gel column chromatography (eluent: AcOEt:hexane = 1:2) to give quinoline **10a** (9.33 g, 93%).

Ethyl 2-Methyl-6,7-methylenedioxy-3-quinoline-carboxylate 10a: Colorless crystals; mp 155–157°C; IR (KBr) $\nu_{\max}$ 1720, 1655, 1620, 1600 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.44 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 2.92 (3H, s, Ar-CH₃), 4.42 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, -OCH₂CH₃), 6.13 (2H, s, OCH₂O), 7.09 (1H, s, Ar-H), 7.32 (1H, s, Ar-H), 8.55 (1H, s, Ar-H); EIMS *m/z* 259 (M)⁺; Anal. calcd for C₁₄H₁₃NO₄ C, 64.86, H, 5.05, N, 5.40; found C, 64.59, H, 4.99, N, 5.39.

Ethyl 2-tert-Butoxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 10b: Yellow crystals; mp 85–87°C; IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3474, 1729 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.27 (9H, s, *t*Bu), 1.43 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 4.42 (2H, q, *J* = 7.2, OCH₂CH₃), 4.95 (2H, s, ArCH₂O), 6.13 (2H, s, OCH₂O), 7.08 (1H, s, Ar-H), 7.40 (1H, s, Ar-H), 8.35 (1H, s, Ar-H); HRMS *m/z* calcd for C₁₈H₂₂NO₅ (M)⁺ 331.1420, found 332.1494.

Ethyl 2-Benzoyloxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 10c: Yellow crystals; mp 79–

82°C; IR (KBr) $\nu_{\max}$ 1720, 1617, 1597 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.39 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.37 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.65 (2H, s, ArCH₂OBn), 5.10 (2H, s, OCH₂Ph), 6.13 (2H, s, OCH₂O), 7.09 (1H, s, Ar-H), 7.28–7.39 (5H, s, Ar-H), 7.42 (1H, s, Ar-H), 8.47 (1H, s, Ar-H); EIMS *m/z* 366 (M+H)⁺; Anal. calcd for C₂₁H₁₉NO₅ C, 69.03, H, 5.24, N, 3.83; found C, 69.14, H, 5.26, N, 3.74.

Ethyl 2-Bromomethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 10d: To a solution of **10a** (7.17 g, 27.7 mmol) in CCl₄ (600 mL) were added NBS (7.38 g, 41.5 mmol) and benzoylperoxide (0.14 g, 2.0% w/v) under nitrogen atmosphere, and the reaction mixture was refluxed with stirring for 1 h under of UV light irradiation (200 W). After cooling to rt, CCl₄ was evaporated under reduced pressure to afford a crude residue that was purified by silica gel column chromatography (eluent; 7 % AcOEt in CH₂Cl₂) to give crude bromide, which was further recrystallized from CH₂Cl₂-hexane to yield pure **10d** (7.75 g, 83%). **10d:** Colorless crystals; mp 159–161°C; IR (KBr) $\nu_{\max}$ 1720, 1620, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.47 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 4.47 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, -OCH₂CH₃), 5.15 (2H, s, Ar-CH₂-Br), 6.16 (2H, s, OCH₂O), 7.12 (1H, s, Ar-H), 7.34 (1H, s, Ar-H), 8.62 (1H, s, Ar-H); EIMS *m/z* 337, 339 (M)⁺; Anal. calcd for C₁₄H₁₂NO₄Br C, 49.73, H, 3.58, N, 4.12; found C, 49.77, H, 3.52, N, 4.23.

Ethyl 2-Allyloxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 10e: No data because it was used in the subsequent reaction without purification.

Synthesis of 3-quinolinecarboxylic acids **11**

Typical procedure: To a solution of **10a** (2.54 g, 9.97 mmol) in 20% MeOH-H₂O (70 mL) was added KOH (1.65 g). After stirring for 2 h at 90–93°C, methanol was removed under reduced pressure to afford an aqueous solution, and this was adjusted to pH 6–7 with *d*-HCl to

form crystals. The precipitate of product **11a** from the water layer was gathered by suction and recrystallized from EtOH-H₂O to give pure **11a** (2.16 g, 95%)

2-Methyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylic Acid 11a: Colorless crystals; mp > 295°C; IR (KBr) $\nu_{\max}$ 2800–2400, 1693, 1595 cm^{−1}; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.79 (3H, s, ArCH₃), 6.22 (2H, s, OCH₂O), 7.30 (1H, s, Ar-H), 7.44 (1H, s, Ar-H), 8.64 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 26.1 (q), 103.4 (t), 104.4 (d), 105.4 (d), 123.2 (s), 123.5 (s), 139.3 (d), 147.8 (s), 148.6 (s), 153.4 (s), 157.0 (s), 168.9 (s); HRMS *m/z* calcd for C₁₂H₉NO₄ (M)⁺ 231.0531, found 231.0533.

2-tert-Butoxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylic Acid 11b: Colorless crystals; mp 210°C; IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3463, 1704, 1603 cm^{−1}; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.16 (9H, s, *t*Bu), 3.38 (1H, br s, OH), 4.77 (2H, s, ArCH₂O), 6.21 (2H, s, OCH₂O), 7.33 (1H, s, Ar-H), 7.41 (1H, s, Ar-H), 8.47 (1H, s, Ar-H); ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ 1.31 (9H, s, *t*Bu), 5.00 (2H, s, ArCH₂O), 6.19 (2H, s, OCH₂O), 7.30 (1H, s, Ar-H), 7.40 (1H, s, Ar-H), 8.64 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄) δ 28.6 (q), 65.8 (t), 74.1 (s), 103.1 (t), 103.9 (d), 105.4 (d), 123.8 (s), 124.8 (s), 137.4 (d), 146.1 (s), 148.4 (s), 152.3 (s), 155.4 (s), 168.4 (s); HRMS *m/z* calcd for C₁₆H₁₈NO₅ (M)⁺ 304.1185, found 304.1170.

2-Benzyloxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylic Acid 11c: Colorless crystals; mp 200–210°C; IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3660–3300, 1700, 1640, 1600 cm^{−1}; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.46 (2H, s, ArCH₂OBn), 5.15 (2H, s, -OCH₂Ph), 6.14 (2H, s, OCH₂O), 7.10 (1H, s, Ar-H), 7.24–7.42 (5H, m, Ar-H), 7.43 (1H, s, Ar-H), 8.57 (1H, s, Ar-H); EIMS *m/z* 338 (M+H)⁺; Anal. calcd for C₁₉H₁₅NO₅ C, 67.65, H, 4.48, N, 4.15; found C, 67.23, H, 4.57, N, 4.08.

2-Allyloxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylic Acid 11d
60 % NaH in oil (0.15g, 3.6 mmol) was washed with

dry pentane. To the prepared NaH, was added dry THF (10mL). To the resulted suspension was added allyl alcohol (0.45 mL, 6.0 mmol) dropwise under nitrogen atmosphere at 0°C, then **10d** (0.33g, 1.0 mmol) successively. After stirring for 18 hr at rt, 5N NaOH aq (1.4 mL) and water (1.4 mL) were added to the reaction mixture, which was then refluxed for another 2 hr. After cooling, the mixture was diluted with water (5 mL), acidified with 3N HCl aq to almost pH 2, then extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water and brine successively, dried over MgSO₄, filtered and evaporated to afford a crude residue, which was purified by silica gel column chromatography (eluent; MeOH : CH₂Cl₂ = 1 : 9) to give **11d** (0.16 g, 56% in 2 steps). **11d:** Yellow crystals; mp 157–160°C; IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3400–2400, 1700, 1600, 1510 cm^{−1}; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.21 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, -OCH₂CH), 5.10 (2H, s, -OCH₂Ph), 5.22 (1H, dd, *J* = 10.5, 1.5 Hz, -CH₂CH=CHH), 5.34 (1H, dd, *J* = 15.0, 1.5 Hz, -CH₂CH=CHH), 5.99 (1H, ddt, *J* = 15.0, 10.5, 6.0 Hz, -CH₂CH=CH₂), 6.16 (2H, s, OCH₂O), 7.14 (1H, s, Ar-H), 7.46 (1H, s, Ar-H), 8.69 (1H, s, Ar-H); EIMS *m/z* 287 (M)⁺; Anal. calcd for C₁₅H₁₃NO₅ C, 62.71, H, 4.56, N, 4.88; found C, 61.80, H, 4.55, N, 4.71.

Synthesis of quinoline-bearing oxazolines 12

Typical procedure: To a solution of quinolinecarboxylic acid **11a** (1.07 g, 4.63 mmol) with (2S)-2-amino-3-methoxypropanol (0.54 g, 5.14 mmol) in pyridine (5 mL)/acetonitrile (5 mL) was added triethylamine (1.94 mL, 13.9 mmol) in CCl₄ (1.43 mL, 14.8 mmol). To the reaction mixture, triphenylphosphine (3.65 g, 13.9 mmol) in pyridine (5 mL)/acetonitrile (5 mL) was added dropwise over 1.5 h under nitrogen atmosphere. After stirring for 33 h at rt, the solvent was removed under reduced pressure below 40°C to afford a residue that was purified by silica gel column chromatography (eluent: CH₂Cl₂:AcOEt = 5:1 to AcOEt:hexane = 3:1) to

give product **12a** (0.73 g, 47%).

3-{(4R)-4-Methoxymethyl-2-oxazolinyl}-2-methyl-6,7-methylenedioxyquinoline 12a: Colorless crystals; mp 99–102°C; [α]_D²² +23.3 (*c* 0.4, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1632, 1463 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.91 (3H, s, Ar-CH₃), 3.43 (3H, s, OCH₃), 3.53 (1H, m, -CHHOCH₃), 3.70 (1H, m, -CHHOCH₃), 4.32 (1H, dd, *J* = 5.0, 4.6 Hz, -OCHHCH-), 4.50 (2H, m, -OCHHCH-), 4.56 (1H, m, NCH(CH₂)₂), 6.11 (2H, s, OCH₂O), 7.01 (1H, s, Ar-H), 7.31 (1H, s, Ar-H), 8.42 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 25.3 (q), 59.3 (q), 66.8 (d), 69.9 (t), 74.6 (t), 101.7 (t), 102.8 (d), 105.0 (d), 119.4 (s), 122.4 (s), 137.0 (d), 146.6 (s), 147.5 (s), 151.8 (s), 155.7 (s), 164.1 (s); HRMS *m/z* calcd for C₁₆H₁₆N₂O₄ (M)⁺ 300.1110, found 300.1109.

2-tert-Butoxymethyl-3-{(4R)-4-methoxymethyl-2-oxazolinyl}-6,7-methylenedioxyquinoline 12b: Yellow oil; [α]_D²² −8.3 (*c* 2.0, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1650, 1463, 1231, 1193, 1034 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.27 (9H, s, *t*Bu), 3.43 (3H, s, OCH₃), 3.51 (1H, m, -CHHOCH₃), 3.71 (1H, m, -CHHOCH₃), 4.32 (1H, m, -OCHHCH-), 4.51 (1H, m, NCH), 4.53 (1H, m, -OCHHCH-), 4.94 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, ArCHHO), 5.02 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, ArCHHO), 6.11 (2H, s, OCH₂O), 7.04 (1H, s, Ar-H), 7.41 (1H, s, Ar-H), 8.39 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 27.8 (q), 59.3 (q), 65.6 (t), 66.6 (d), 70.6 (t), 73.9 (s), 74.7 (t), 101.8 (t), 102.8 (d), 105.9 (d), 119.7 (s), 123.4 (s), 137.5 (d), 146.6 (s), 148.1 (s), 151.8 (s), 155.7 (s), 164.6 (s); HRMS *m/z* calcd for C₂₀H₂₅N₂O₅ (M+H)⁺ 373.1764, found 373.1760.

2-Benzyloxymethyl-3-{(4R)-4-methoxymethyl-2-oxazolinyl}-6,7-methylenedioxyquinoline 12c: Yellow oil; [α]_D²² +5.0 (*c* 2.2, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1649, 1462 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.36 (3H, s, OCH₃), 3.37 (1H, m, -CHHOCH₃), 3.61 (1H, m, -CHHOCH₃), 4.26 (1H, m, OCHHCH), 4.43 (1H, m, NCH), 4.46 (1H, m, OCHHCH), 4.65 (2H, s, ArCH₂O), 5.09 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, ArCH₂O), 5.14 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, ArCH₂O), 6.10

(2H, s, OCH₂O), 7.05 (1H, s, Ar-H), 7.42 (1H, s, Ar-H), 8.43 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 59.2 (q), 66.6 (d), 70.4 (t), 72.6 (t), 72.9 (s), 74.6 (t), 101.9 (t), 102.8 (d), 105.8 (d), 119.3 (s), 123.4 (s), 127.4 (d), 127.9 (d), 128.2 (d), 137.4 (d), 138.3 (s), 146.5 (s), 148.3 (s), 151.9 (s), 154.3 (s), 163.9 (s); HRMS *m/z* calcd for C₂₃H₂₂N₂O₅ (M+H)⁺ 407.1599, found 407.1607.

2-Allyloxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-{(4R)-4-methoxymethyl-2-oxazolinyl}quinoline 12d: Yellow oil; [α]_D²² +20.6 (*c* 0.1, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1650, 1463, 1235, 1108 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.43 (3H, s, OCH₃), 3.49 (1H, m, -CHHOCH₃), 3.69 (1H, m, -CHHOCH₃), 4.31 (1H, m, OCHHCH), 4.14 (2H, dt, *J* = 5.7, 1.4 Hz, -OCH₂CH=), 4.44–4.61 (2H, m, NCH and OCHHCH), 5.19 (1H, br d, *J* = 10.4 Hz, -CH₂CH=CHH), 5.30 (1H, ddd, *J* = 17.2, 1.8, 1.4 Hz, -CH₂CH=CHH), 6.00 (1H, ddd, *J* = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, -CH₂CH=CH₂), 6.13 (2H, s, OCH₂O), 7.06 (1H, s, Ar-H), 7.43 (1H, s, Ar-H), 8.45 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 59.3, 66.6, 70.3, 71.9, 72.5, 74.5, 101.8, 102.7, 105.7, 117.0, 119.0, 123.3, 134.8, 137.3, 146.4, 148.2, 151.8, 154.2, 163.7; HRMS *m/z* calcd for C₁₉H₂₁N₂O₅ (M+H)⁺ 357.1450, found 357.1442.

2-tert-Butoxymethyl-3-{(4R,5S)-4-methoxymethyl-5-methyl-2-oxazolinyl}-6,7-methylenedioxyquinoline 12e: Yellow oil; [α]_D²² +46.5 (*c* 1.0, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1637, 1463 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.27 (9H, s, *t*Bu), 1.47 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CHCH₃), 3.41 (3H, s, OCH₃), 3.60 (1H, dd, *J* = 9.6, 8.0 Hz, -CHCHHOCH₃), 3.70 (1H, dd, *J* = 9.6, 4.8 Hz, -CHCHHOCH₃), 4.43 (1H, ddd, *J* = 9.4, 8.0, 4.8 Hz, NCH(CH₂)CH), 4.97 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, ArCHHO-), 4.98 (1H, dq, *J* = 9.4, 6.6 Hz, CH(CH₃)CHO-), 5.00 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, ArCHHO-), 6.10 (2H, s, OCH₂O), 7.04 (1H, s, Ar-H), 7.41 (1H, s, Ar-H), 8.37 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 14.7 (q), 27.8 (q), 59.1 (q), 65.4 (t), 67.8 (d), 71.4 (t), 74.0 (s), 78.4 (d), 101.8 (t), 102.8 (d), 105.9 (d), 120.0 (s), 123.4 (s), 137.3 (d), 146.6 (s), 148.1 (s), 151.7 (s), 155.8 (s),

163.8 (s); HRMS m/z calcd for $C_{21}H_{27}N_2O_5$ (M+H)⁺ 387.1920, found 387.1925.

Michael addition of aryllithium to quinolines (Chart 2, Chart 3, and Table 1)

Typical procedure: A solution of trimethoxyphenyllithium, which was prepared by adding 1.57 M *t*-BuLi in *n*-pentane (10.4 mL, 16.1 mmol) to 3,4,5-trimethoxyphenylbromide (1.99 g, 8.04 mmol) in THF (20 mL) at −78°C under nitrogen atmosphere, was introduced to a solution of **12a** (0.805 g, 2.68 mmol) in THF (150 mL). After stirring at −78°C under nitrogen atmosphere for 20 h, methylchloroformate (1.03 mL, 13.4 mmol) was added. Then, the reaction flask was warmed to rt and stirred for another 4 h. After quenching with aq. NaHCO₃, the solvent was removed under reduced pressure to afford a residue that was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to give a crude mixture that was purified by silica gel column chromatography (eluent: AcOEt:hexane = 3:1) to give a mixture of products **14a** and **14b** (0.996 g, 71%). (*Experiments affording **13a** or **13b** on Chart 2 were carried out without addition of methyl chloroformate.)

3-{{(4*R*)-4-Methoxymethyl-2-oxazolinyl}-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4-phenylquinoline 13a: Oil; [α]_D²² +28.1 (*c* 0.22, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1662, 1567 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.72 (3H, s, Ar-CH₃), 3.00 (1H, dd, *J* = 9.4, 7.0 Hz, -CHHOCH₃), (3H, s, OCH₃), 3.33 (1H, dd, *J* = 9.4, 4.4 Hz, -CHHOCH₃), 3.98 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.0 Hz, -OCHHCH-), 4.14 (1H, dd, *J* = 9.4, 8.0 Hz, -OCHHCH-), 4.21 (1H, m, CH₂CHN=), 6.06 (2H, s, OCH₂O), 6.79 (1H, s, Ar-H), 7.33 (3H, m, Ar-H), 7.37 (1H, s, Ar-H), 7.45 (2H, dd, *J* = 4.6, 1.8 Hz, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 23.2 (q), 59.1 (q), 66.3 (d), 70.4(t), 74.1 (t), 101.76 (t), 101.85 (d), 105.4 (d), 120.8 (s), 121.9 (s), 128.0 (d), 128.6 (d), 129.2 (d), 129.4

(d),136.2 (s), 146.5 (s), 147.4 (s), 147.7 (s), 151.1 (s), 154.1 (s), 164.0 (s); HRMS m/z calcd for $C_{22}H_{20}N_2O_4$ (M)⁺ 376.1423, found 376.1420.

3-{{(4*R*)-4-Methoxymethyl-2-oxazolinyl}-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl) quinoline 13b: Colorless crystals; mp 120–122°C; [α]_D²² +17.0 (*c* 0.5, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1663, 1585 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.71 (3H, s, Ar-CH₃), 3.10 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.4 Hz, -CHHOCH₃), 3.32 (3H, s, OCH₃), 3.60 (1H, dd, *J* = 6.4, 4.4 Hz, -CHHOCH₃), 3.84 (3H, s, Ar-OCH₃), 3.85 (3H, s, Ar-OCH₃), 3.94 (3H, s, Ar-OCH₃), 4.06 (1H, dd, *J* = 7.2, 6.6 Hz, -OCHHCH-), 4.20 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, -OCHHCH-), 4.25 (1H, m, CH₂CHN=), 6.08 (2H, s, OCH₂O), 6.57 (2H, s, Ar-H), 6.91 (1H, s, Ar-H), 7.36 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 23.2, 56.2, 59.2, 61.0, 66.4, 70.4, 74.2, 101.8, 105.4, 106.6, 106.7, 121.9, 127.1, 131.6, 146.5, 147.4, 147.8, 151.2, 152.8, 154.1, 164.1; HRMS m/z calcd for $C_{25}H_{26}N_2O_7$ (M)⁺ 466.1740, found 466.1736.

***N*-Methoxycarbonyl-3-{{(4*R*)-4-methoxymethyl-2-oxazolinyl}-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1,4-dihydroquinoline 14a (major), 14b (minor):** Colorless crystals; mp 60–68°C; IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1717, 1651, 1589 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.478 (3H, s, **14b**-Ar-CH₃), 2.482 (3H, s, **14a**-Ar-CH₃), 3.35 (3H, s, **14b**-CH₂OCH₃), 3.38 (3H, s, **14a**-CH₂OCH₃), 3.41 (1H, m, -CHHOCH₃), 3.60 (1H, m, -CHHOCH₃), 3.72 (3H, s, **14a**-OCH₃), 3.75 (6H, s, **14b**-OCH₃), 3.757(3H, s, -OCH₃), 3.758 (6H, s, -OCH₃), 4.20 (1H, m, **14a**-OCHHCH-), 4.22 (1H, m, **14b**-OCHHCH-), 4.38 (1H, m, -CH₂CHN=), 4.39 (1H, m, -OCHHCH-), 5.13 (1H, s, **14a**-H-1), 5.16 (1H, m, **14b**-H-1), 5.95 (2H, s, **14a**-OCH₂O), 5.95 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, **14b**-OCHHO), 5.96 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, **14b**-OCHHO), 6.427 (2H, s, **14b**-Ar-H), 6.431 (2H, s, **14a**-Ar-H), 6.71 (1H, s, **14b**-Ar-H), 6.74 (1H, s, **14a**-Ar-H), 7.10 (1H, s, **14a**-Ar-H), 7.12 (1H, s, **14b**-Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 21.0 (q_{14a}), 21.1 (q_{14b}),

46.2 (d_{14b}), 46.4 (d_{14a}), 53.2 (q_{14a}), 53.2 (q_{14b}), 55.8 (q_{14b}), 55.9 (q_{14a}), 59.2 (q_{14a}), 59.2 (q_{14b}), 60.6 (q_{14a}), 60.6 (q_{14b}), 65.6 (d_{14b}), 65.7 (d_{14a}), 70.3 (t_{14a}), 70.3 (t_{14b}), 74.6 (t_{14a}), 74.7 (t_{14b}), 101.4 (d_{14a}), 101.4 (d_{14b}), 103.7 (d), 103.8 (d_{14b}), 105.8 (d_{14a}), 105.8 (d_{14b}), 106.6 (d_{14a}), 106.6 (d_{14b}), 120.7 (s_{14a}), 120.9 (s_{14b}), 128.2 (s_{14b}), 128.4 (s_{14a}), 131.9 (s_{14a}), 132.1 (s_{14b}), 136.4 (s_{14b}), 136.5 (s_{14a}), 136.7 (s_{14a}), 136.9 (s_{14b}), 153.1 (s_{14b}), 145.1 (s_{14a}), 145.3 (s_{14b}), 145.6 (s_{14a}), 145.6 (s_{14b}), 146.0 (s_{14a}), 146.0 (s_{14b}), 153.1 (s_{14a}), 153.7 (s_{14a}), 153.7 (s_{14b}), 164.7 (s_{14a}), 164.8 (s_{14b});. HRMS m/z calcd for $C_{27}H_{30}N_2O_9$ (M)⁺ 526.1951, found 526.1949.

(2*R*)-2-Amino-*N*-methoxycarbonyl-3-methoxypropyl 2-*tert*-butoxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 15b: Yellow crystals; mp 174°C; [α]_D²² −2.0 (*c* 2.3, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3414, 1725, 1616, 1585 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.24 (9H, s, *t*Bu), 3.12 (2H, s, -CHCH₂OCH₃), 3.26 (3H, s, -CH₂OCH₃), 3.64 (3H, s, Ar-OCH₃), 3.78 (1H, m, -CH₂CHNH), 3.84 (3H, s, Ar-OCH₃), 3.86 (3H, s, Ar-OCH₃), 3.93 (3H, s, Ar-OCH₃), 4.16 (2H, d, *J* = 4.3 Hz, -OCH₂CH), 4.82 (1H, d, *J* = 13.0 Hz, ArCHHO-), 4.84 (2H, d, *J* = 13.0 Hz, ArCHHO-), 5.05 (1H, brd, *J* = 8.0 Hz, NH), 6.10 (2H, s, OCH₂O), 6.53 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, Ar-H), 6.56 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, Ar-H), 6.92 (1H, s, Ar-H), 7.39 (1H, s, Ar-H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 27.4 (q), 49.3 (d), 52.0 (q), 56.1 (q), 56.2 (q), 58.8 (q), 60.9 (q), 63.8 (t), 66.0 (t), 70.6 (t), 74.8 (s), 101.7 (d), 101.9 (t), 105.7 (d), 106.2 (d), 106.4 (d), 123.0 (s), 124.5 (s), 131.5 (s), 138.0 (s), 145.6 (s), 145.6 (s), 148.4 (s), 151.3 (s), 153.23 (s), 153.26 (s), 154.2 (s), 156.4 (s), 168.2 (s); HRMS m/z calcd for $C_{31}H_{38}N_2O_{11}$ (M)⁺ 614.2476, found 614.2479.

(2*R*)-2-Amino-*N*-methoxycarbonyl-3-methoxypropyl 2-benzyloxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 15c: Yellow oil; [α]_D²² −3.0 (*c* 0.11, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3404, 1725, 1584 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.05 (2H, m -CHCH₂OCH₃), 3.21 (3H, s, -CH₂OCH₃), 3.62 (3H, s, OCH₃), 3.75 (1H,

m, -CH₂CHNH), 3.845 (3H, s, OCH₃), 3.853 (3H, s, OCH₃), 3.93 (3H, s, OCH₃), 4.00 (2H, m, -OCH₂CH), 4.57 (2H, s, -OCH₂Ar), 4.90 (2H, s, -OCH₂Ar), 4.90 (1H, overlapped, NH), 6.11 (2H, s, OCH₂O), 6.55 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, Ar-H), 6.56 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, Ar-H), 6.93 (1H, s, Ar-H), 7.20–7.39 (5H, m, Ph), 7.41 (1H, s, Ar-H); HRMS m/z calcd for $C_{34}H_{36}N_2O_{11}$ (M)⁺ 643.2319, found 648.2314.

(2*R*)-2-Amino-*N*-methoxycarbonyl-3-methoxypropyl 2-allyloxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 15d: Oil; [α]_D²² −6.0 (*c* 0.1, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3333, 1731, 1584 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.14 (2H, d, *J* = 5.5 Hz, -CHCH₂OCH₃), 3.27 (3H, s, -CH₂OCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.93 (3H, s, OCH₃), 3.94 (3H, s, OCH₃), 4.05 (2H, d, *J* = 5.7 Hz, -OCH₂CH=CH₂), 4.13 (3H, m, -OCH₂CHNH-, -CH₂CHNH-), 4.85 (2H, s, *J* = 12.6 Hz, ArCH₂O-), 4.96 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz, NH), 5.20 (1H, br d, *J* = 10.5 Hz, -CH₂CH=CHH), 5.28 (1H, br d, *J* = 17.2 Hz, -CH₂CH=CHH), 5.91 (1H, m, -CH₂CH=CH₂), 6.11 (2H, s, OCH₂O), 6.55 (1H, br s, Ar-H), 6.56 (1H, br s, Ar-H), 6.93 (1H, s, Ar-H), 7.41 (1H, s, Ar-H); HRMS m/z calcd HRMS m/z calcd for $C_{30}H_{34}N_2O_{11}$ (M)⁺ 598.2163, found 598.2169.

(1*S*,2*R*)-2-Amino-1-methyl-*N*-methoxycarbonyl-3-methoxypropyl 2-*tert*-butoxymethyl-6,7-methylenedioxy-3-quinolinecarboxylate 15e: Oil; [α]_D²² +48.0 (*c* 0.3, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 3333, 1724, 1615, 1584 cm^{−1}; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.04 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, -CHCH₃), 1.26 (9H, s, *t*Bu), 3.27 (3H, s, -CH₂OCH₃), 3.27 (1H, m, -CHCHHOCH₃), 3.29 (1H, m, -CHCHHOCH₃), 3.64 (3H, s, OCH₃), 3.825 (3H, s, OCH₃), 3.83 (1H, m, -CH₂CHNH-), 3.832 (3H, s, OCH₃), 3.90 (3H, s, OCH₃), 4.82 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, ArCHHO-), 4.87 (2H, d, *J* = 12.6 Hz, ArCHHO-), 5.06 (1H, qd, *J* = 6.2, 3.8 Hz, -COOCHCH(CH₃)-), 5.72 (1H, br-d, *J* = 8.7 Hz, NH), 6.08 (2H, s, OCH₂O), 6.47 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, Ar-H), 6.52 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, Ar-H), 6.84

(1H, s, Ar-H), 7.37 (1H, s, Ar-H); HRMS m/z calcd for $C_{32}H_{40}N_2O_{11}$ (M)⁺ 628.2632, found 628.2633.

***N*-Methoxycarbonyl-3-{(4*R*)-4-methoxymethyl-2-oxazolinyl}-2-bromomethyl-6,7-methylenedioxy-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1,4-dihydroquinoline 17**

To a solution of **14a** and **14b** (68.6 mg, 0.13 mmol) in CCl₄ (5 mL) were added NBS (23.3 mg, 0.13 mmol) and benzoylperoxide (1.2 mg, 0.04 mmol) under nitrogen atmosphere, and the reaction mixture was refluxed with stirring for 24 h. After extracting with CH₂Cl₂, the organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure to afford a crude residue that was purified by silica gel column chromatography (eluent: hexane:AcOEt = 1:2 to CH₂Cl₂:AcOEt = 4:1) to give bromide **17a** and **17b** (30 mg, 38%). **17a** and **17b** (mixture of diastereomers): Pale yellow crystals; mp 60–68°C; IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1718, 1590 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.37 (3H, s, **17b**-OCH₃), 3.38 (3H, s, **17a**-OCH₃), 3.43 (1H, dd, J = 9.7, 5.7 Hz, -CHHOCH₃), 3.63 (1H, dd, J = 9.7, 3.7 Hz, CHHOCH₃), 3.72 (3H, s, **17a**-Ar-OCH₃), 3.745 (3H, s, **17b**-Ar-OCH₃), 3.75 (6H, s, Ar-OCH₃), 3.76 (3H, s, Ar-OCH₃), 4.27 (1H, m, -OCHHCH-), 4.43 (1H, m, -CH₂CHN=), 4.45 (1H, m, -OCHHCH-), 4.86 (1H, d, J = 10.8 Hz, **17b**-ArCHHBr), 4.89 (1H, d, J = 11.0 Hz, **17a**-ArCHHBr), 5.17 (1H, s, **17a**-H-1), 5.23 (1H, s, **17b**-H-1), 5.43 (1H, d, J = 10.8 Hz, **17b**-ArCHHBr), 5.44 (1H, d, J = 11.0 Hz, **17a**-ArCHHBr), 5.99 (2H, s, **17a**-OCH₂O), 6.00 (2H, s, **17b**-OCH₂O), 6.39 (2H, s, **17a**-Ar-H), 6.40 (2H, s, **17b**-Ar-H), 6.70 (1H, s, **17b**-Ar-H), 6.73 (1H, s, **17a**-Ar-H), 7.11 (1H, s, **17a**-Ar-H), 7.13 (1H, s, **17b**-Ar-H); HRMS m/z calcd for $C_{27}H_{29}N_2O_9^{79}Br$ (M)⁺ 604.1056, found 604.1055; calcd for $C_{27}H_{29}N_2O_9^{81}Br$ (M)⁺ 606.1036, found 606.1035.

4-Aza-1,2,3,4-tetradehydro-4-deoxypodophyllo-toxin 7

To a solution of bromide **17a,b** (66.7 mg, 0.11 mmol) in THF (2 mL) was added trifluoroacetic acid (41 μ L, 0.55 mmol) under nitrogen atmosphere, and the reaction mixture was heated at 90°C with stirring overnight. After removing trifluoroacetic acid under reduced pressure, water (0.1 mL) and K₂CO₃ (20 mg) were added and the mixture was heated at 90°C with stirring for another 4 h. After extracting with CH₂Cl₂, the organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure to afford a crude residue that was purified by silica gel column chromatography (eluent: CH₂Cl₂:AcOEt = 3:1) to give aromatized product **7** (18.0 mg, 36%). **7**: Colorless crystals; mp 243–245°C; [α]_D²² 0 (c 0.9, CHCl₃); IR (Neat) $\nu_{\max}$ 1777, 1506, 1458 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.86 (6H, s, Ar-OCH₃), 3.97 (3H, s, Ar-OCH₃), 5.37 (2H, s, Ar-CH₂O), 6.18 (2H, s, OCH₂O), 6.60 (2H, s, Ar-H), 7.19 (1H, s, Ar-H), 7.45 (1H, s, Ar-H); HRMS m/z calcd for $C_{23}H_{23}NO_8$ (M)⁺ 395.1005, found 395.1007.

Acknowledgment We are grateful to Dr. K. Minoura, Ms. M. Fujitake, and Ms. S. Seki of this University for NMR measurements, MS measurements, and elemental analysis, respectively. We sincerely thank all the students in our laboratory for their assistance in this study. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for “High-Tech Research Center” Project for Private Universities: matching fund subsidy from MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology), 2002–2006, Japan.

REFERENCES

- 1) Canel C., Moraes R. M., Dayan F. E., Ferreira D., *Phytochemistry*, **54**, 115–120 (2000).
- 2) Paulson J. C., McClure W. O., *Annals of the New York Academy of Sciences*, **253** (Biol. Cytoplasmic

Microtubules, Pap. Conf., 1974), 517–27 (1975).

- 3) Baldwin E. L., Osheroff N., *Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents*, **5**, 363–372 (2005).
- 4) Srivastava V., Negi A. S., Kumar J. K., Gupta M. M., Khanuja S. P. S., *Bioorg. & Medicinal Chem.*, **13**, 5892–5908 (2005).
- 5) Saleem M., Kim H. J., Ali M. S., Lee Y. S., *Nat. Prod. Rep.*, **22**, 696–716 (2005).
- 6) Sellars J. D., Steel P. G., *Eur. J. Org. Chem.*, 3815–3828 (2008).
- 7) Arimoto M., Yamaguchi H., Nishibe S., *Studies in Natural Products Chemistry*, **18** [Stereoselective Synthesis (Part K)], 551–606 (1996).
- 8) Arimoto M., Matsuura S., Muro C., Tsujibo H., Matsumura E., Yamaguchi H., Inamori Y., *Biosci., Biotech., Biochem.*, **58**, 189–190 (1994).
- 9) Tanoguchi M., Hosono E., Kitaoka M., Arimoto M., Yamaguchi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1873–1876 (1991).
- 10) Tanoguchi M., Kashima T., Saika H., Inoue T., Arimoto M., Yamaguchi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 68–72 (1989).
- 11) Tanoguchi M., Arimoto M., Saika H., Yamaguchi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4162–4168 (1987).
- 12) Yamaguchi H., Nakajima S., Arimoto M., Tanoguchi M., Ishida T., Inoue M., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1754–1760 (1984).
- 13) Yamaguchi H., Arimoto M., Tanoguchi M., Ishida T., Inoue M., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3212–3218 (1982).
- 14) Yamaguchi H., Arimoto M., Tanoguchi M., Numata A., *Yakugaku Zasshi*, **101**, 485–488 (1981).
- 15) Yamaguchi H., Arimoto M., Yamamoto K., Numata A., *Yakugaku Zasshi*, **99**, 674–677 (1979).
- 16) Botta B., Delle Monache G., Misti D., Vitali A., Zappia G., *Curr. Med. Chem.*, **8**, 1363–1381 (2001).
- 17) Meresse P., Monneret C., Bertounesque, E., *Tetrahedron*, **60**, 2657–2671 (2004).
- 18) Xiao Z., Vance J. R., Bastow K. F., Brossi A., Wang H. K., Lee K. H., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 3363–3369 (2004).
- 19) Hitotsuyanagi Y., Fukuyo M., Tsuda K., Kobayashi M., Ozeki A., Itokawa H., Takeya K., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **10**, 315–317 (2000).
- 20) Legrand A., Rigo B., Gautret P., Henichart J.-P., Couturier D., *J. Heterocyclic Chem.*, **36**, 1263–1270 (1999).
- 21) Katritzky A. R., Cobo-Domingo J., Yang B., Steel P. J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 255–263 (1999).
- 22) Hitotsuyanagi Y., Kobayashi M., Takeya K., Itokawa H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **11**, 1387–1390 (1995).
- 23) Hitotsuyanagi Y., Ichihara Y., Takeya K., Itokawa H., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 9401–9402 (1994).
- 24) Lienard P., Quirion J. C., Husson H. P., *Tetrahedron*, **49**, 3995–4006 (1993).
- 25) Itokawa H., Hitotsuyanagi Y., Takeya K., *Heterocycles*, **33**, 537–540 (1992).
- 26) Van der Eycken J., Bosmans J. P., Van Haver D., Vandewalle M., Hulkenberg A., Veerman W., Nieuwenhuizen R., *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3873–3876 (1989).
- 27) Bosmans J. P., Van der Eycken J., Vandewalle M., Hulkenberg A., Van Hes R., Veerman W., *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3877–3880 (1989).
- 28) Pearce H. L., Bach N. J., Cramer T. L., *Tetrahedron Lett.*, **30**, 907–190 (1989).
- 29) Arimoto M., Kobayashi K., Honjou M., Miyao M., Ichikawa H., Usami Y., in preparation for submission.
- 30) Hitotsuyanagi Y., Kobayashi M., Fukuyo M., Takeya K., Itokawa H., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 9107–9110 (1999).
- 31) Tratrat C., Giorgi-Renault S., Husson H.-P., *Org. Lett.*, **4**, 3187–3189 (2002).
- 32) Giorgi-Renault S., *Annales Pharmaceutiques Francaises*, **63**, 63–68 (2005).
- 33) Tu S., Zhang Y., Jiang B., Jia R., Zhang J., Zhang J., Ji S., *Synthesis*, **22**, 3874–3882 (2006).

- 34) Madec D., Mingoia F., Prestat G., Poli G., *Synlett*, 1475–1478 (2008).
- 35) Giorgi-Renault, S., *Annales Pharmaceutiques Francaises*, **63**, 63–68 (2005).
- 36) Andrews R. C., Teague S., Meyers A. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7854–7858 (1988).
- 37) Pendrak I., Wittrock R., Kingsbury W. D., *J. Org. Chem.*, **60**, 2912–2915 (1995).
- 38) Fehnel E. A., Deyrup J. A., Davidson M. B., *J. Org. Chem.*, **23**, 1996–2001 (1958).
- 39) Cheng C. C., Yan S. J., *Org. React.* (New York), **28**, 37–201 (1982).
- 40) Vorbrüggen H., Krolikiewics K., *Tetrahedron Lett.*, **22**, 4471–4474 (1981).

—Articles—

New Lanostane Triterpenoids, Inonotsutriols D, and E from *Inonotus Obliquus*

Tomoko NAKATA, Sayaka TAJI, Takeshi YAMADA, and Reiko TANAKA*

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 10, 2008; Accepted November 14, 2008)

Two new lanostane-type triterpenoids, inonotsutriols D (**1**) and E (**2**), were isolated from the sclerotia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (Japanese name: kabanoanatake; Russian name: chaga). Their structures were determined to be lanost-8-ene-3 β ,22 R ,24 R -triol (**1**) and lanost-8-ene-3 β ,22 R ,24 S -triol (**2**) on the basis of spectral data, including 2D NMR analysis. In addition, major compounds inotodiol (**3**), trametenolic acid (**4**), 3 β -hydroxy lanosta-8,24-dien-21-al (**5**), and inonotsuoxide A (**6**) were evaluated for their cancer cell growth inhibitory activity using the murine P388 leukemia cell line.

Key words—*Inonotus obliquus*; kabanoanatake; sclerotium; inonotsutriol D; inonotsutriol E; lanost-8-ene-3 β ,22 R ,24 R -triol; lanost-8-ene-3 β ,22 R ,24 S -triol; 2D NMR; murine P388 leukemia cell line

INTRODUCTION

Inonotus obliquus (PERS.: Fr.) Pil. (= *Fuscoporia obliqua* (PERS.: Fr.) Aoshima), commonly known as kabanoanatake in Japan and chaga or tchaga in Russia, is a white-rot fungus belonging to the family *Hymenochaetaceae* Donk¹ and is widely distributed in Europe, Asia, and North America. The imperfect form of *I. obliquus* occurs parasitically on trunks, usually of *Betula* (birch), and more rarely on *Ulmus*, *Alnus*, and *Fraxinus*. Only after the tree dies is the perfect form with pores and basidia produced under the bark. *I. obliquus* is widely distributed in *Betula platyphylla* var. *japonica* (Japanese name: *shirakaba*) forests in Hokkaido, Japan.^{3,4}

Lanost-8-ene-3 β ,22 R -diol (inotodiol)⁵ was isolated by Ludwiczak and Wrecino. Kahlos *et al.* isolated 3 β -hydroxy lanosta-8,24-dien-21-oic acid (trametenolic acid) and 3 β -hydroxy lanosta-8,24-dien-21-al⁶, as well

as 3 β ,22,25-trihydroxy lanosta-8,23-diene⁷ and 3 β ,22-dihydroxy lanosta-8,24-dien-7-one.⁸ His group also reported that inotodiol exhibits significant anticancer activity against Walker 256 carcinosarcoma and MCF-7 human mammary adenocarcinoma in vitro and leukemia P388 in vivo,⁹ and that 3 β -hydroxy lanosta-8,24-dien-21-al, 3 β ,21-dihydroxy lanosta-8,24-diene, and trametenolic acid have antifungal activity.¹⁰ Mizuno *et al.* reported the antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from *I. obliquus*.¹¹ Babitskaya *et al.* reported melanin complex of *I. obliquus* has antioxidant and genoprotective effects¹² and Burczyk *et al.* reported that the aqueous extract of *I. obliquus* inhibited growth of human cervical and uterine cancer cells (HeLa S3).¹³ Shin *et al.* isolated 3 β -hydroxy lanosta-8,24-diene-21,23-lactone, 21,24-cyclopentalanost-8-ene-3 β ,21,25-triol, and lanost-8-ene-3 β ,22,25-triol from the sclerotia of *I. obliquus*.^{14,15}

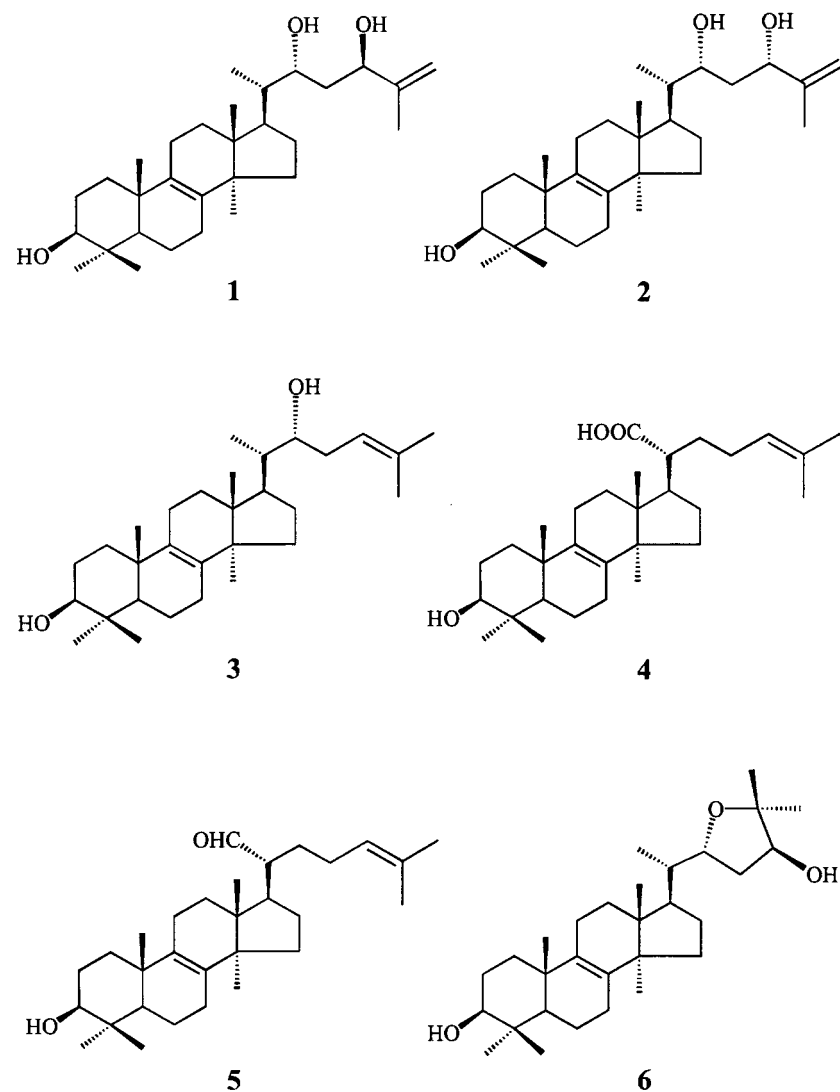
*e-mail: tanakar@gly.oups.ac.jp

I. obliquus has been found to possess the following activities: anti-cancer,^{16,17} anti-breast cancer,¹⁸ anti-inflammatory and anti-nociceptive effects,^{19,20} anti-oxidant,^{21,22} anti-mutation,²³ anti-inflammatory,^{24,25} inhibition of oxidative DNA damage in human lymphocytes,²⁵ platelet aggregation inhibitory activity,²⁶ and blocker of I κ B α kinase activation.²⁷

Recently, we reported the structures of new lanostane-type triterpenoids isolated from the sclerotia of *I. obliquus*: inonotsuoxides A and B (22*R*,25-epoxylanost-8-ene-3 β ,24*S*-diol and its 22*S*,25-epoxy epimer); inonotsulides A, B, and C ((20*R*,24*S*)-3 β ,25-dihydroxylanost-8-en-20,24-olide, its (20*R*,24*R*)-olide

epimer, and (20*R*,24*S*)-3 β ,25-dihydroxylanost-7,9(11)-dien-20,24-olide); lanosta-8,23*E*-diene-3 β ,22*R*,25-triol and lanosta-7:9(11),23*E*-triene-3 β ,22*R*,25-triol;³⁰ and inonotsutriols A, B, and C ((20*R*,24*S*)-cyclopentalanost-8-ene-3 β ,21*R*,25-triol, its 24*R*-hydroxyl epimer, and (20*R*,24*S*)-cyclopentalanost-7:9(11)-diene-3 β ,21*R*,25-triol).³¹ In addition, the anti-tumor promoting activity of inotodiol and 3 β -hydroxylanost-8,24-dien-21-al,²⁸ which are abundant triterpene constituents in this sclerotium, has been reported.

Careful examination of the sclerotia of *I. obliquus* has led to the isolation of two new lanostane-type triterpenes named inonotsutriols D (**1**) and E (**2**). The



structures of compounds **1** and **2** were determined on the basis of spectroscopic data, including 2D NMR spectra. This report deals with the structure determination of inonotsutriols D (**1**) and E (**2**), and the P388 cancer cell growth inhibitory activity of abundant triterpenoids inotodiol (**3**), trametenolic acid (**4**), 3 β -hydroxylanost-8,24-dien-21-al (**5**), and inonotsuoxide A (**6**).

Results and discussion

The sclerotia of *I. obliquus* were extracted with CHCl₃ and the extract was separated by silica gel column chromatography, medium-pressure liquid chromatography (MPLC), and high-pressure liquid chromatography (HPLC) to obtain two new triterpenes (**1** and **2**). The molecular formula of inonotsutriol D (**1**) was determined to be C₃₀H₅₀O₃ (M⁺; *m/z* 458.3766, calcd 458.3760) by HREIMS. The IR spectrum showed the presence of hydroxyl groups ($\nu_{\max}$ 3399 cm⁻¹). The ¹H and ¹³C NMR spectra (CDCl₃) of **1** (Table 1) exhibited signals assignable to six tertiary methyl groups; one secondary methyl group [δ_{H} 0.94 (3H, d, *J* = 6.7 Hz)]; nine sp³ methylenes; one terminal methylene [δ_{H} 4.84 (1H, dq, *J* = 3.8, 1.8 Hz), 5.01 (1H, quint, *J* = 1.2 Hz)]; six sp³ methines including three oxymethines [δ_{H} 3.24 (1H, dd, *J* = 11.7, 4.5 Hz); δ_{C} 79.0 (d)], [δ_{H} 3.96 (1H, dt, *J* = 9.2, 3.0 Hz); δ_{C} 74.6 (d)], [δ_{H} 4.26 (1H, dd, *J* = 9.2, 3.5 Hz); δ_{C} 76.5 (d)]; four sp³ quaternary carbons; and one tetrasubstituted double bond [δ_{C} 134.1 (s), 134.6 (s)]. Compound **1** showed the same carbon composition (C₃₀H₅₀O₃) and fragment ion peaks similar to those of inonotsuoxides A and B,²⁸ and inonotsutriols A and B.³¹ In addition, ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of rings A-D (C-1 – C-19) were in good agreement with those of inonotsuoxides A and B, inonotsutriols A and

B, and inonotsulides A and B²⁹ which have a common lanost-8-ene skeleton. The planar structure of **1** was determined from HMBC and ¹H-¹H COSY spectra. The HMBC spectrum of **1** (Table 1, Fig. 1) indicated long-range correlations between Me-18 (δ_{H} 0.72) and C-12, C-13, C-14, and C-17; between Me-19 (δ_{H} 0.98) and C-1, C-5, C-9, and C-10; between Me-21 (δ_{H} 0.94) and C-17, C-20, and C-22; between Me-27 (δ_{H} 1.76) and C-24, C-25, and C-26; between H₂-26 (δ_{H} 4.84, 5.01) and C-24, C-25, and C-27; between Me-28 (δ_{H} 1.00) and C-3, C-4, C-5, and C-29; between Me-29 (δ_{H} 0.81) and C-3, C-4, C-5, and C-28; and between Me-30 (δ_{H} 0.87) and C-8, C-13, C-14, and C-15. The chemical shifts in the ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** resembled those of inonotsuoxide A (**6**) except those of H-22, H-23 α , H-23 β , H-24, H₂-26, and Me-27 signals and C-22, C-24, and C-27 signals. Partial structural units are shown by bold lines in the ¹H-¹H COSY spectrum (Fig. 1). Acetylation of **1** with Ac₂O/pyridine gave triacetate (**1a**) (C₃₆H₅₆O₆, *m/z* 584.4069, calcd. 584.4077) in which the acetoxymethine proton signal appeared at δ_{H} 4.49 (dd), δ_{H} 4.88 (dt), and δ_{H} 5.22 (dd). The results indicate that compound **1** is a side-chain-cleaved inonotsuoxide A, and its chemical name is suggested to be lanost-8-ene-3 β ,22,24-triol. The relative configuration at C-17 and C-20 was established as *R* and *S*, because of the observed NOEs from Me-18 to H-20 β and from H-17 α to Me-21 and Me-30, and the coupling constants of H-17 [δ_{H} 1.46 (ddd, *J*_{17,16 α} = 9.6 Hz, *J*_{17,16 β} = 7.3 Hz, *J*_{17,20} = 12.7 Hz] and H-20 [δ_{H} 1.70 (1H, dqd, *J*_{20,17} = 12.7 Hz, *J*_{20,21} = 6.7 Hz, *J*_{20,22} = 3.0 Hz)]. The absolute configuration at C-22 was determined to be *R* (Figs. 2 and 3) because of the significant NOEs for H-20 β /H-22, Me-21/H-23 α , H-22/H-23 β and H-22/H-24, and the coupling constants of H-22 [δ_{H} 3.96 (1H, dt, *J*_{22,20} = 12.7 Hz, *J*_{22,23 β} = 3.0 Hz, *J*_{22,23 α} = 9.2 Hz)]. The configuration of H-24 was *R* due to the significant NOEs for H-24/

Table 1 NMR spectral data of inonotsutriol D (**1**) in CDCl₃

1											
Position		$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	J/Hz	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	NOE	δ_{C}	HMBC (C) ^b				
1	α	1.23	td	12.6 (1 β , 2 β), 3.8 (2 α)	1 β , 2 α , 2 β	1 β , 2 α , 3, 5	35.6 (t)	2, 10, 19			
	β	1.74	dt	12.6 (1 α), 3.8 (2 α , 2 β)	1 α , 2 α , 2 β	2 α , 2 β , 19		2, 3, 10			
2	α	1.67	m		1 α , 1 β , 2 β , 3	1 α , 1 β , 2 β , 3	27.8 (t)	10			
	β	1.58	qd	11.7 (1 α , 2 α , 3), 3.8 (1 β)	1 α , 1 β , 2 α , 3	1 β , 2 α , 19, 29		1, 3			
3		3.24	dd	11.7 (2 β), 4.5 (2 α)	2 α , 2 β	1 α , 2 α , 5, 28	79.0 (d)	2, 4, 29			
4							38.9 (s)				
5		1.05	dd	13.0 (6 β), 2.3 (6 α)	6 α , 6 β	1 α , 3, 6 α , 7, 28	50.4 (d)	6, 7, 10, 19, 29			
6	α	1.68	m		5, 6 β , 7	5, 6 β , 7, 28	18.2 (t)	7, 10			
	β	1.51	m		5, 6 α , 7	6 α , 7, 19, 29		5			
7		2.04	m		6 α , 6 β	5, 6 α , 6 β , 30	26.5 (t)	9			
8							134.1 (s)				
9							134.6 (s)				
10							37.0 (s)				
11		2.02	m		12 α , 12 β	12 α , 12 β , 19	21.0 (t)	8, 9, 12			
12	α	1.71	m		11, 12 β	11, 12 β , 30	30.9 (t)	13, 18			
	β	1.69	m		11, 12 α	11, 12 α , 18, 21		13, 18			
13							44.8 (s)				
14							49.4 (s)				
15	α	1.21	ddd	14.2 (15 β), 9.3 (16 α), 2.5 (16 β)	16 α , 16 β	15 β , 16 α , 30	30.9 (t)				
	β	1.63	m		16 α , 16 β	15 α		8, 14, 30			
16	α	1.78	m		15 α , 15 β , 16 β , 17	15 α , 16 β , 17, 22, 30	27.2 (t)				
	β	1.45	m		15 α , 15 β , 16 α , 17	16 α , 18, 20		17			
17		1.46	ddd	12.7 (20), 9.6 (16 α), 7.3 (16 β)	16 α , 16 β , 20	16 α , 21, 22, 30	47.3 (d)	15, 18, 20			
18		0.72	s			11, 12 β , 16 β , 19, 20, 21	15.8 (q)	12, 13, 14, 17			
19		0.98	s			2 β , 6 β , 11, 18, 29	19.1 (q)	1, 5, 9, 10			
20		1.70	dqd	12.7 (17), 6.7 (21), 3.0 (22)	17, 21, 22	16 β , 18, 21, 22	42.6 (q)				
21		0.94	d	6.7 (20)	20	12 β , 17, 18, 20, 23 α	12.7 (q)	17, 20, 22			
22		3.96	dt	9.2 (23 α), 3.0 (20, 23 β)	20, 23 α , 23 β	16 α , 16 β , 17, 20, 23 β , 24	74.6 (d)	21			
23	α	1.54	m		22, 23 β , 24	21	34.6 (t)	22, 24, 25			
	β	1.52	m		22, 23 α , 24	22, 24		22, 24, 25			
24		4.26	dd	9.2 (23 α), 3.5 (23 β)	23 α , 23 β	22, 23 β , 26B, 27	76.5 (d)	22, 23, 25, 26, 27			
25							147.6 (s)				
26	A	4.84	brs			26B, 27	110.8 (t)	24, 25, 27			
	B	5.01	brs			24, 26A		24, 25, 27			
27		1.76	brs			24, 26A	17.9 (q)	24, 25, 26			
28		1.00	s			3, 5, 6 α , 29	28.0 (q)	3, 4, 5, 29			
29		0.81	s			2 β , 6 β , 19, 28	15.4 (q)	3, 4, 5, 28			
30		0.87	s			7, 12 α , 15 α , 16 α , 17	24.4 (q)	8, 13, 14, 15			

^a ^1H chemical shift values (δ ppm from SiMe₄) followed by multiplicity and coupling constants (J/Hz). Figures in parentheses indicate the proton coupling with that position. ^b Long range $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ correlations from H to C observed in the HMBC experiments.

H-26B, Me-27, and the coupling constants of H-24 [δ_{H} 4.26 (1H, dd, $J_{24,23\alpha} = 9.2$ Hz, $J_{24,23\beta} = 3.5$ Hz)]. One of the hydroxyl groups was C-3 β as shown by the chemical shift and the coupling constants [δ_{H} 3.24 (1H, dd, $J_{3,2\alpha} = 4.5$ Hz and $J_{3,2\beta} = 11.7$ Hz.); δ_{C} 79.0 (d)]. Other NOEs were observed from Me-19 to H-2 β ,

H-6 β , Me-18, and Me-29; from H-5 α to H-1 α , H-3 α , H-7 α , and Me-28; from H-6 β to Me-19 and Me-29; from H-7 α to H-5 α and Me-30; from H-12 α to Me-30; from H-11 β to Me-19; and from Me-18 to H-20 β and Me-21. Therefore, rings A, B, and C in **1** adopted chair/twist, chair/twist, and chair conformations (Fig. 2). These

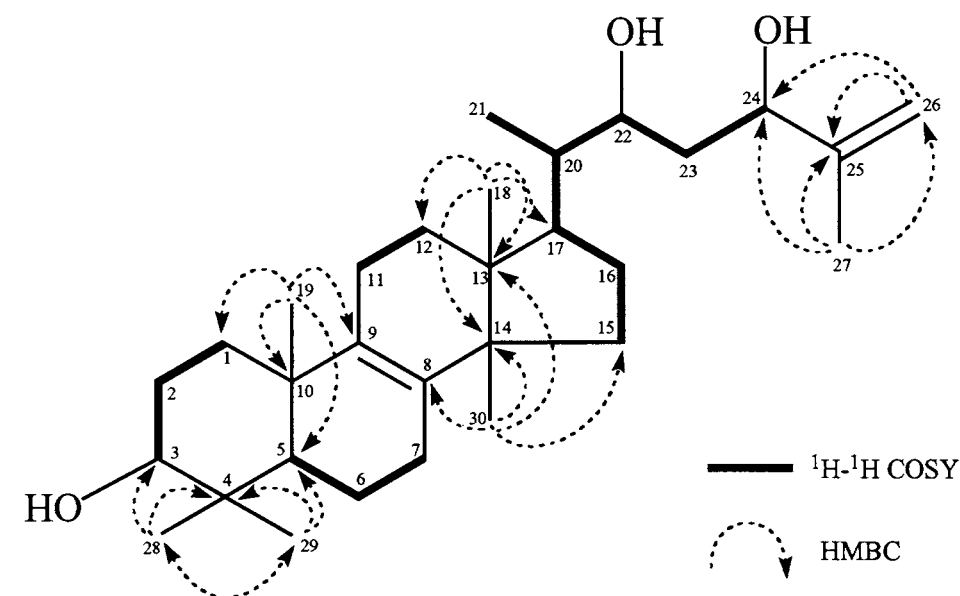
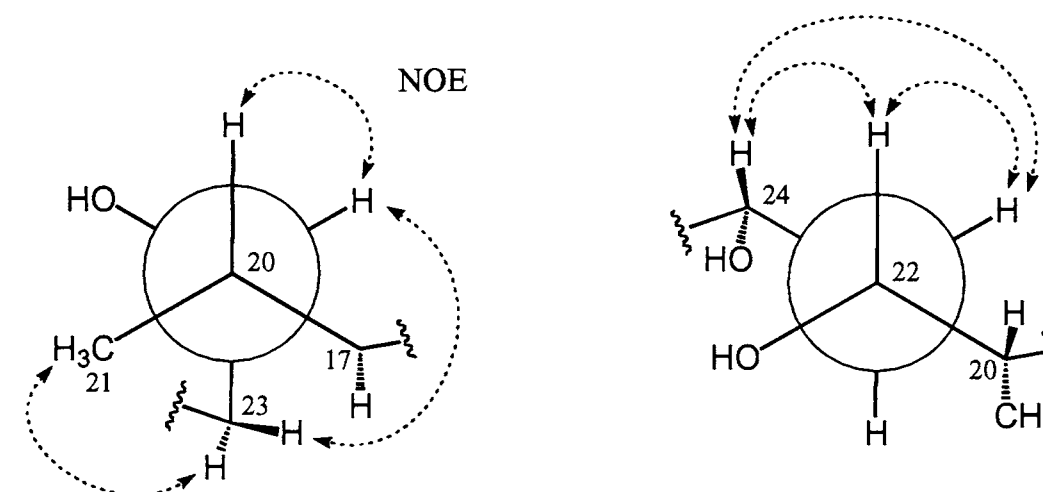
Fig. 1 Selected $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations for inonotsutriol D (**1**)Fig. 2 Partial conformation for inonotsutriol D (**1**)

Table 2 NMR spectral data of inonotsutriol E (2) in CDCl₃

2									
Position	δ _H ^a		J/Hz	¹ H- ¹ H COSY	NOE	δ _C		HMBC (C) ^b	
1 α	1.23	td	12.6 (1β, 2β), 3.8 (2α)	1β, 2α, 2β	1β, 2α, 3, 5	35.6	(t)		
β	1.74	dt	12.6 (1α), 3.8 (2α, 2β)	1α, 2α, 2β	2α, 2β, 19				
2 α	1.68	m		1α, 1β, 2β, 3	1α, 1β, 2β, 3	27.8	(t)		
β	1.58	m		1α, 1β, 2α, 3	1β, 2α, 19, 29				
3	3.23	dd	11.8 (2β), 4.5 (2α)	2α, 2β	1α, 2α, 5, 28	79.0	(d)	2, 29	
4						38.9	(s)		
5	1.05	dd	12.5 (6β), 2.5 (6α)	6α, 6β	1α, 3, 6α, 7, 28	50.4	(d)	6, 10, 19, 29	
6 α	1.68	m		5, 6β, 7	5, 6β, 7, 28	18.2	(t)		
β	1.50	m		5, 6α, 7	6α, 7, 19, 24				
7	2.04	m		6α, 6β	5, 6α, 6β, 30	26.5	(t)		
8						134.1	(s)		
9						134.6	(s)		
10						37.0	(s)		
11	2.02	m		12α, 12β	12α, 12β, 19	21.0	(t)		
12 α	1.73	m		11, 12β	11, 12β, 30	30.9	(t)		
β	1.68	m		11, 12α	11, 12α, 18, 21			18	
13						44.8	(s)		
14						49.4	(s)		
15 α	1.18	m		16α, 16β	15β, 16α, 30	30.9	(t)		
β	1.63	m		16α, 16β	15α				
16 α	1.78	m		15α, 15β, 16β, 17	15α, 16β, 17, 22, 30	27.3	(t)	13	
β	1.41	m		15α, 15β, 16α, 17	16α, 18, 20				
17	1.44	ddd	12.7 (20), 9.6 (16α), 7.3 (16β)	16α, 16β, 20	16α, 21, 22, 30	47.2	(d)		
18	0.71	s			11, 12β, 16β, 19, 20, 21	15.7	(q)	12, 13, 14, 17	
19	0.98	s			2β, 6β, 11, 18, 29	19.1	(q)	1, 5, 9, 10	
20	1.67	dqd	12.7 (17), 6.7 (21), 3.2 (22)	17, 21, 22	16β, 18, 21, 22	42.5	(d)		
21	0.93	d	6.7 (20)	20	12β, 17, 18, 20, 23α	12.6	(q)	17, 20, 22	
22	3.98	ddd	10.2 (23α), 3.2 (20), 2.8 (23β)	20, 23α, 23β	16α, 16β, 17, 20, 23β	70.3	(d)		
23 α	1.67	m		22, 23β, 24	21, 24	33.1	(t)		
β	1.58	m		22, 23α, 24				24	
24	4.36	t	4.8 (23α, 23β)	23α, 23β	23α, 23β, 26B	73.5	(d)	22, 23, 25, 26, 27	
25						147.3	(s)		
26 A	4.94	brs			26B, 27	110.2	(t)	24, 27	
B	5.11	brs			24, 26A			24, 27	
27	1.73	brs			26A	19.3	(q)	24, 25, 26	
28	1.00	s			3, 5, 6α, 29	28.0	(q)	3, 4, 5, 29	
29	0.81	s			2β, 6β, 19, 28	15.4	(q)	3, 4, 5, 28	
30	0.87	s			7, 12α, 15α, 16α, 17	25.0	(q)	8, 13, 14, 15	

^a ¹H chemical shift values (δ ppm from SiMe₄) followed by multiplicity and coupling constants (J/Hz). Figures in parentheses indicate the proton coupling with that position. ^b Long range ¹H-¹³C correlations from H to C observed in the HMBC experiments.

data suggested that inonotsutriol D (1) is lanost-8-ene-3β,24*R*,24*R*-triol.

The minor compound inonotsutriol E (2) had the same molecular formula C₃₀H₅₀O₃ (M⁺; *m/z* 458) as 1 by EIMS. The IR, ¹H, and ¹³C NMR spectra (Table 2) resembled those of 1 except H-23α (δ_H 1.67), H-24 (δ_H 4.36), H-26A (δ_H 4.94), and H-26B (δ_H 5.11) in the ¹H NMR spectrum and C-22 (δ_C 70.3), C-24 (δ_C 73.5), and C-27 (δ_C 19.3) in the ¹³C NMR spectrum. HMBC and ¹H-¹H COSY spectra of 2 closely resembled those of 1, therefore, it was revealed that compound 2 was the same lanost-8-ene-3β,22,24-triol of 1. The *R* configuration at C-22 in 2 was deduced from the chemical shift and the coupling constants [δ_H 3.98 (1H, ddd, *J*_{22,20β} = 3.2 Hz, *J*_{22,23α} = 10.2 Hz, *J*_{22,23β} = 2.8 Hz)], and from NOEs from H-22 to H-16α, H-16β, H-17α,

H-20β, and H-23β, which is the same as that of 1. On the other hand, the absolute configuration at C-24 was *S* because of the NOEs of H-24/H-23α, H-24/H-23β, and H-24/H-26B (Figs. 4 and 5), and the chemical shift and the coupling constants [δ_H 4.36 (1H, t, *J*_{24,23α}, *J*_{24,23β} = 4.8 Hz)]. These data deduced the structure of inonotsutriol E (2) as lanost-8-ene-3β,24*R*,24*S*-triol, which is the C-24 epimer of 1.

Cancer cell growth inhibitory activities of main triterpene constituents: inotodiol (3), trametenolic acid (4), 3β-hydroxylanos-8,24-dien-21-al (5), and inonotsuoxide A (6) were examined using the murine P388 leukemia cell line (Table 3). Compounds 4-6 exhibited moderate cytotoxic activity, while inotodiol (3) was inactive.

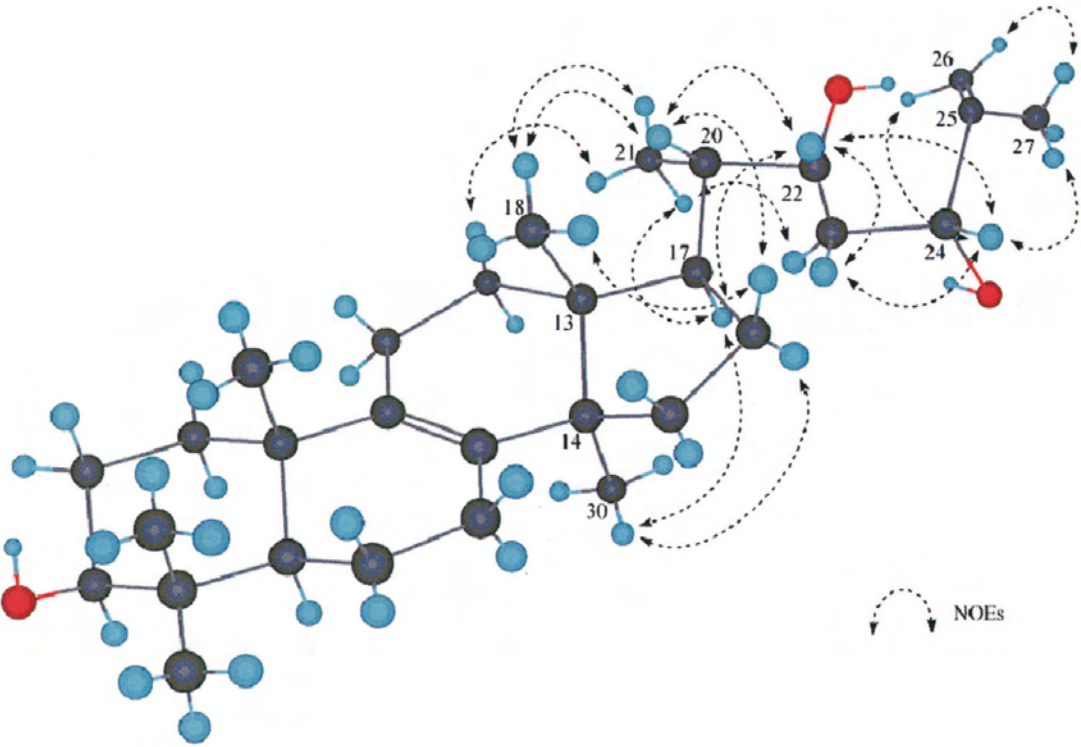


Fig. 3 Observed NOEs correlations of innotsutriol D (1) (graphical representation using Chem 3D)

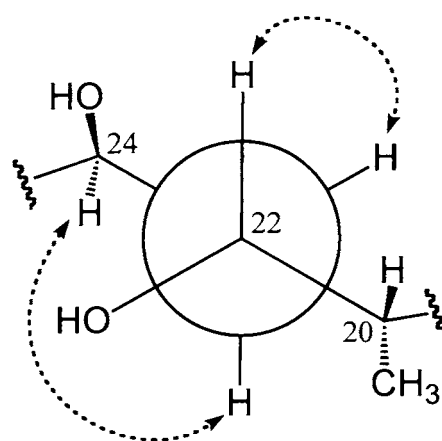


Fig. 4 Partial conformation for innotsutriol E (2)

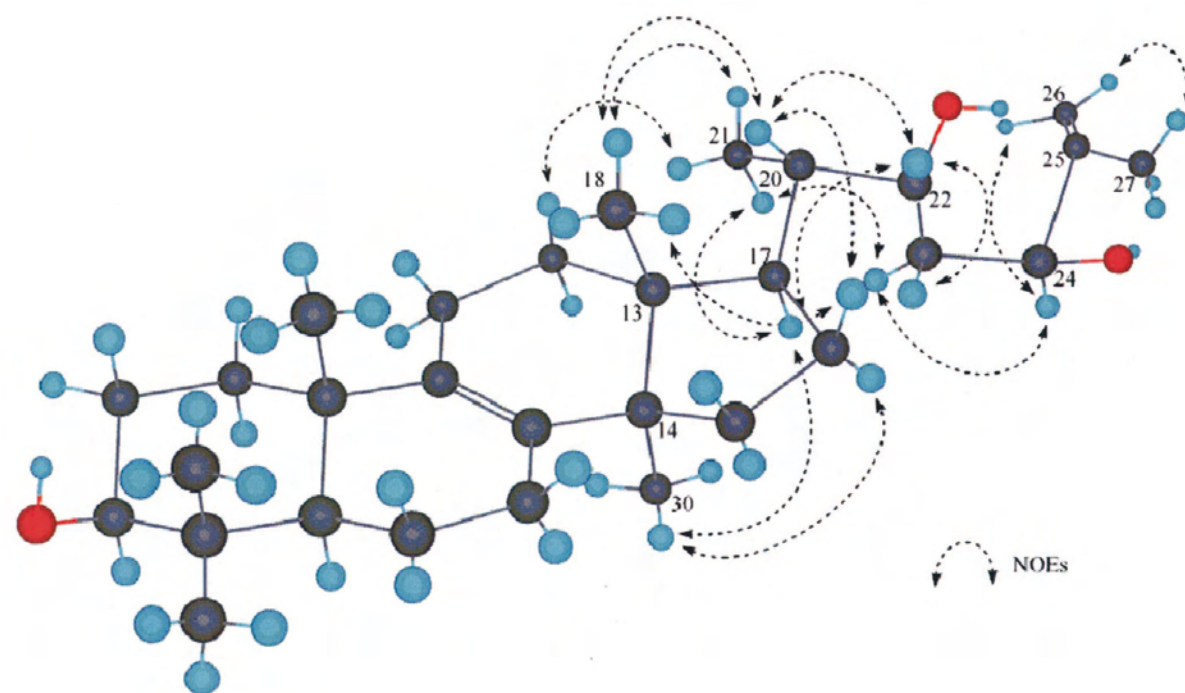


Fig. 5 Observed NOEs correlations of innotsutriol E (2)
(graphical representation using Chem 3D)

Table 3 Cytotoxicity of the metabolites from the sclerotia of *Inonotus obliquus* against P388 cells

Compounds		Cell line P388
		IC ₅₀ (mM) ^a
inotodiol	(3)	>100
trametenolic acid	(4)	27
3 β -hydroxylanosta-8,24-dien-21 al	(5)	22
inonotsuoxide A	(6)	30
5-FU ^b		0.33

^a DMSO was used for vehicle

^b Positive control

EXPERIMENTAL

General

Melting points were determined on a Yanagimoto micro-melting point apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured using a JASCO DIP-1000 digital polarimeter. IR spectra were recorded using a Perkin-Elmer 1720X FTIR spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained on a Varian INOVA 500 spectrometer with standard pulse sequences, operating at 500 and 125 MHz, respectively. CDCl₃ was used as the solvent and TMS, as the internal standard. EIMS was recorded on a Hitachi 4000H double-focusing mass spectrometer (70 eV). Column chromatography was carried out over silica gel (70-230 mesh, Merck) and medium-pressure liquid chromatography (MPLC) was carried out with silica gel (230-400 mesh, Merck). HPLC was run on a JASCO PU-1586 instrument equipped with a differential refractometer (RI 1531). Fractions obtained from column chromatography were monitored by TLC (silica gel 60 F₂₅₄, Merck). Preparative TLC was carried out on Merck silica gel F₂₅₄ plates (20 x 20 cm, 0.5 mm thick).

Material

Inonotus obliquus is succeeded in culture in Salada Melon Co. Ltd., Nayoro City, Hokkaido, Japan. Sclerotium (4 kg) of *I. obliquus* was obtained from the above company in April 2005. A voucher specimen (CG-03) was deposited at the Herbarium of the Laboratory of Medicinal Chemistry, Osaka University of Pharmaceutical Sciences.

Assay for cytotoxicity using P388 cell line

Cytotoxicity of inotodiol (3), trametenolic acid (4), 3 β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-al (5), and inonotsuoxide A (6) was examined using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method. P388 and HL-60 cells were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (10% fetal calf serum) suspension at 37 °C in 5% CO₂. The test material was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to give a concentration of 10 mM and the solution was diluted with the Essential Medium to concentrations of 200, 20, and 2 μ mol. Each solution was combined with the cell suspension (1 $\times$ 10⁵ cells/ml) in the medium. After incubation at 37 °C for 72 h in 5% CO₂, the grown cells were labeled

with 5 mg/ml MTT in phosphate buffered saline (PBS) and the absorbance of formazan dissolved in 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.1 N HCl was measured at 540 nm using a microplate reader (Model 450, BIO-RAD). Each absorbance value was expressed as percentage relative to the control cell suspension that was prepared without the test substance using the same procedure as that described above. All assays were performed three times. Semilogarithmic plots were constructed from the averaged data and the dose required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) was determined.

Extraction and isolation

The sclerotia of white-rot fungus *I. obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (4 kg) were extracted with chloroform (10 L) in 2005. Preliminary silica gel column chromatography (3 kg) of the chloroform extract (153.9 g) of *I. obliquus* sclerotia was reported to yield five fractions (A – E). Residue C (30.2 g) was recrystallized from MeOH to give inotodiol, and the filtrate (17.1 g) was rechromatographed on MPLC (230-400 mesh silica gel, 500 g) using *n*-hexane:EtOAc (5:1). This was followed by HPLC [ODS, MeOH:H₂O (85:15)], affording inonotsuoxides A (6) and B. Subsequent elution on the same column with chloroform:EtOAc (5:1) gave a crystalline mass (272.8 mg) (Fr. Nos. 54-58), which was subjected MPLC (230-400 mesh silica gel, 30 g) using *n*-hexane:EtOAc (4:1) to afford a mixture of compounds 1 and 2 (52.6 mg) (Fr. Nos. 29-34). This mixture was separated by HPLC [ODS, MeOH:H₂O (90:10)] to give compounds 1 (19.1 mg) and 2 (10.1 mg).

Inonotsutriol D (1). Colorless prisms; mp 292-294 °C (from MeOH-CHCl₃); HREIMS *m/z*: 458.3766 [M]⁺ (C₃₀H₅₀O₃, calcd for 458.3760); IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 3399 (OH), 2943, 2876, 1457, 1373, 1072, 1030; ¹H and ¹³C

NMR, see Table 1. EIMS *m/z* (rel. int.): 458 (9) [M]⁺, 425 (3), 407 (3), 357 (75), 339 (18), 311 (13), 299 (8), 281 (7), 215 (6), 187 (8).

Inonotsutriol D triacetate (1a). A mixture of compound 1 (8.6 mg) and Ac₂O (2.2 mL) in pyridine (2 mL) was kept at room temperature overnight. Usual work-up gave a residue (10.8 mg) that was recrystallized from MeOH-CHCl₃ to yield corresponding inonotsutriol D triacetate (1a) (7.3 mg). Colorless prisms; HREIMS *m/z*: 584.4049 [M]⁺ (C₃₆H₅₆O₆, calcd for 584.4077); ¹H NMR δ: 0.68 (3H, s, Me-18), 0.86 (3H, s, Me-30), 0.88 (6H, s, Me-28 and Me-29), 0.90 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, Me-21), 1.00 (3H, s, Me-19), 1.73 (3H, s, Me-27), 2.03 (3H, s, C-22 OCOCH₃), 2.06 (6H, s, C-3 and 22 OCOCH₃), 4.49 (1H, dd, *J* = 11.7, 4.5 Hz, H-3α), 4.88 (1H, dt, *J* = 9.2, 3.0 Hz, H-22), 4.95 (2H, m), 5.22 (1H, dd, *J* = 9.2, 3.5 Hz, H-24). ¹³C NMR δ: 12.9 (C-21), 15.7 (C-18), 16.5 (C-29), 17.5 (C-27), 18.1 (C-6), 19.2 (C-19), 21.0 (C-11), 21.2 (C-22 OCOCH₃), 21.3 (C-3 and C-24 OCOCH₃), 24.2 (C-2), 24.3 (C-30), 26.4 (C-7), 26.8 (C-16), 27.9 (C-28), 30.1 (C-23), 30.8 (C-15), 30.9 (C-12), 35.3 (C-1), 37.8 (C-4), 39.6 (C-20), 44.8 (C-13), 47.2 (C-17), 49.3 (C-14), 49.5 (C-14), 50.5 (C-5), 73.2 (C-22), 75.6 (C-27), 80.9 (C-3), 114.4 (C-26), 134.2 (C-8), 134.4 (C-9), 169.9 (C-24 OCOCH₃), 170.4 (C-22 OCOCH₃), 171.0 (C-3 OCOCH₃).

Inonotsutriol E (2). Colorless prisms; mp 292-294 °C (from MeOH-CHCl₃); HREIMS *m/z*: 458.3762 [M]⁺ (C₃₀H₅₀O₃, calcd for 458.3760); IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 3421 (OH), 2965, 2877, 1457, 1375, 1051, 1031; ¹H and ¹³C NMR, see Table 2. EIMS *m/z* (rel. int.): 458 (9) [M]⁺, 407 (3), 357 (75), 339 (18), 311 (13), 299 (8), 281 (7), 215 (6), 187 (8).

Acknowledgment The authors are indebted to Mr. Kazuo Sakuma (Salad Melon Co. Ltd., Nayoro, Hokkaido) for supplying the sclerotia of *Inonotus obliquus* (kabanoanatake).

REFERENCES

1) D-L. Hawksworth, P-M. Kirk, B-C. Sutton, D-N. Pegler, ‘Ainsworth and Bisbi’s dictionary of the fungi, 8th ed. CAB International, University Press, Cambridge, 1995, p. 616.

2) M-B. Ellis, P-J. Ellis, An identification handbook, London, Chapman and Hall, 1990, p. 329.

3) T. Yamaguchi, Ringakkai Hokkaido Sibu Ronbunshu **40**, 30 (1992).

4) Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa, *J. Med. Mushr.*, **4**, 77-84 (2002).

5) R-S. Ludwiczak, U. Wrecino, *Poczniki Chem.*, **36**, 497-502 (1962).

6) K. Kahlos, R. Hiltunen, M. Von Schatz, *Planta Med.*, **50**, 197-198 (1984).

7) K. Kahlos, R. Hiltunen, *Acta Phamacol. Fennica*, **95**, 71-76 (1986).

8) K. Kahlos, *Acta Pharmacol. Fennica*, **95**, 113-117 (1986).

9) K. Kahlos, L. Kangas, R. Hiltunen, *Acta Pharmacol. Fennica*, **96**, 33-40 (1987).

10) K. Kahlos, V-H. Tikka, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **42**, 385-390 (1994).

11) T. Mizuno, C. Zhuang, K. Abe, H. Okamoto, T. Kiho, S. Ukai, S. Leclerc, L. Meijer, *Int. J. Med. Mushr.*, **1**, 301-316 (1999).

12) V. G. Babitskaya, V. V. Scherba, N. V. Ikonnikava, N. A. Bisko, N. Y. Mitropolskaya, Y. Nadezda, *Int. J. Med. Mushr.*, **4**, 139-145 (2002).

13) J. Burczyk, A. Gawrin, M. Slotwinska, *Bull. Chim. Framaceutica-Anno.*, **135**, 306-309 (1996).

14) Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa, *Euras. J. Forest Res.*, **1**, 43-50 (2000).

15) Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa, *J. Wood Sci.*, **47**, 313-316 (2001).

16) J-R. Park, J-S. Park, E-H. Jo, J-W. Hwang, S-J. Kim, J-C. Ra, O. I. Okezie, Y-S. Lee, K-S. Kang, *BioFactors*, **27**, 147-155 (2006).

17) Y. O. Kim, H. W. Park, J. H. Kim, J. Y. Lee, S. H. Moon, C. S. Shin, *Life Sciences*, **79**, 72-80 (2006).

18) R. D. Petrova, S. P. Wasser, J. A. Mahajna, C. M. Denchev, M. Cretomir, E. Nevo, *Int. J. Med. Mushr.*, **7**, 141-155 (2005).

19) M-A. Sysoeva, V-S. Gamayurova, O-Yu. Kuznetsova, Russ. 2004, No pp. given. CODEN: RUXXE7 RU 2231786 C1 20040627.

20) Y-M. Park, J-H. Won, Y-H. Kim, J-W. Choj, H-J. Park, K-T. Lee, *J. Ethnopharmacol.*, **101**, 120-128 (2005).

21) I-K. Lee, Y-S. Kim, Y-W. Jang, J-Y. J. Jung, B-S. Yun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 6678-6681 (2007).

22) Y. Nakajima, Y. Sato, T. Konishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1222-1226 (2007).

23) F-Q, Zhao, H-S. Pu, *Zhongcaoyao*, **37**, 1777-1780 (2006).

24) H-G. Kim, D-H. Yoon, C-H. Kim, B. Shrestha, W-C. Chang, S-Y. Lim, W-H. Lee, S-G. Han, J-O. Lee, M-H. Lim, G-Y. Kim, S. Choi, W-O. Song, J-M. Sung, K-C. Hwang, T-W. Kim, *J. Med. Food*, **10**, 80-89 (2007).

25) Y. K. Park, H. B. Lee, E-J. Jeon, H. S. Jung, M-H. Kang, *BioFactors*, **21**, 109-112 (2004).

26) K. W. Hyun, S. C. Jeong, D. H. Lee, J. S. Park, J. S. Lee, *Peptides*, **27**, 1173-1178 (2006).

27) B. Bokyung, M. K. Pandey, Y. Nakajima, H. Nishida, T. Konishi, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal, *Molecular Cancer Therapeutics*, **7**, 191-201 (2008).

28) T. Nakata, T. Yamada, S. Taji, H. Ohishi, S. Wada, H. Tokuda, K. Sakuma, R. Tanaka, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 257-264 (2007).

29) S. Taji, T. Yamada, Y. In, S. Wada, Y. Usami, K. Sakuma, R. Tanaka, *Helv. Chim. Acta*, **90**, 2047-2057 (2007).

- 30) S. Taji, T. Yamada, S. Wada, H. Tokuda, K. Sakuma, R. Tanaka, *Eur. J. Med. Chem.*, **43**, 2373-2379 (2008)
- 31) S. Taji, T. Yamada, R. Tanaka, *Helv. Chim. Acta*, **91**, 1513-1524 (2008).

ヒスタミン H₄ 受容体リガンドの開発とその現状

春沢信哉*, 荒木理佐

Development of Histamine H₄ Receptor Ligands and its Current Situation

Shinya HARUSAWA and Lisa ARAKI

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received September 26, 2008; Accepted November 4, 2008)

This paper looks at recent advances in the development of histamine H₄ receptor ligands and includes a discussion of the following items: 1) Discovery of histamine H₄ receptor (H₄R) and difference between histamine H₃ receptor (H₃R) and H₄R. 2) Current situation with regard to GT-2331. 3) Binding affinities of known ligands in human (h) H₃R and hH₄R. 4) Current situation with regard to selective hH₄R agonists. 5) Current situation with regard to selective hH₄R antagonists. 6) Selected patent compounds. 7) Key hH₄R ligands as pharmacological tools.

Key words—histamine; histamine H₃ receptor; histamine H₄ receptor; agonist; antagonist

1. はじめに

1999～2001 年にかけて、ヒスタミン H₃ 受容体 (H₃R) のクローニングの成功やヒスタミン H₄ 受容体 (H₄R) の発見があり、さらに H₃R と H₄R はアゴニストが存在しなくとも恒常的に活性化される受容体 (constitutively active receptor: 構成的活性化受容体) であるとの報告により、ヒスタミンリガンド開発は大きな変革に見まわれた。その中で、強力な H₃R アゴニストとして報告された GT-2331 は、注意欠陥 - 多動性障害 (ADHD) の治療薬として臨床第 2 相試験まで進んだが、その後のヒトの H₃R (hH₃R) を用いた評価では、H₃R アゴニストであること等が報告され、GT-2331 の評価は混乱した状況にある。最初に GT-2331 の現状について整理した後、選択的 H₄R リガンドの開発とその現状について述べたい。

H₄R の生理学的役割や病態との係わりを解明するには、選択的 H₄R リガンドの開発が必須である。我々は幸い、初期の段階で H₄R アゴニストの OUP-16 を見出したので、その経緯を紹介し、続いて最近の選択的 H₄R アゴニストである 4-メチルヒスタミン (4-MeH) とクロザピンアナログなどについて言及する。一方、Johnson & Johnson (J&J) 社は、高い選択性と結合親和性を持つ H₄R アンタゴニスト JNJ7777120 とその誘導体を発表している。これらの化合物は、ニュートラルアンタゴニストであり、H₄R の選択的インバースアゴニストは未だ見出されていないと思われる。

2. H₃R と H₄R リガンド

2-1. H₄R の発見と H₃R との相違

H₃R は、1983 年に Arrang¹⁾により発見された

* 大阪薬科大学 薬品合成化学研究室, e-mail: harusawa@gly.oups.ac.jp

本総説は、第 11 回日本ヒスタミン学会 (2007 年 12 月 14～15 日, 富山) のシンポジウムで講演したものを中心に記述したものである。

が、16年後の1999年になってLovenberg²⁾がようやくヒトゲノム情報に基づいてH₃Rのクローニングに成功した。翌2000年と2001年にかけて、ほぼ同じ手法で日本の2つのグループを含む6つのグループからH₄Rのクローニングの成功が相次いだ。³⁻⁸⁾ H₄Rについては、すでに1994年にRaible⁹⁾らがH₁R、H₂R、H₃R以外のヒスタミン受容体の存在を提示しており、2000年にこれを同定し、H₄Rと命名されたものである。

H₃RとH₄Rは、類似性と著しく異なる面を持っている。¹⁰⁾ H₃Rは、脳内に高密度で存在するのに対して、H₄Rは骨髄、末梢白血球（好酸球、好中球）に高いレベルで発現し、他に胸腺、脾臓、結腸、小腸に見られる (Fig.1)。H₄Rは免疫に係わる部位での発現のため、発見当初から炎症やアレルギー疾患の治療薬の標的と期待され、現在ではその方向性にあると思われる。¹¹⁻²⁰⁾ H₃RとH₄Rは、共に7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体(GPCR)で、Giを介したc-AMPの産生抑制により細胞内シグ

ナル伝達が行われる。両受容体のアミノ酸配列の相同性は、全体で40%、膜貫通部位で60%と高く、このためH₃Rリガンドの多くはH₄Rと親和性を持つ。したがってH₄Rリガンドの開発においては、如何にH₃Rに弱く、H₄Rに対して強い親和性と選択性を持つH₄Rリガンドを開発するかに重点が置かれてきた。²¹⁾ またH₄Rのアミノ酸配列は、種差が大きいため、リガンドの評価にはヒトのH₄R (hH₄R) とヒトのH₃R (hH₃R) を用いる必要がある。

2000年には、H₃Rが構成的活性 (constitutive activity) を示すことが正常動物（ラット）で最初に確認された。²²⁾ これはGPCRにおいて内在性のリガンドが存在しなくとも細胞内にシグナル伝達が生じるというものである。²³⁾ このため、構成的活性化受容体を活性化するのがアゴニストであり、抑制するのがインバースアゴニストとなる。この発見により、それまでH₃Rアンタゴニストとされてきた多くの化合物は、実はインバースアゴニストであることが明らかとなった。2001年には、

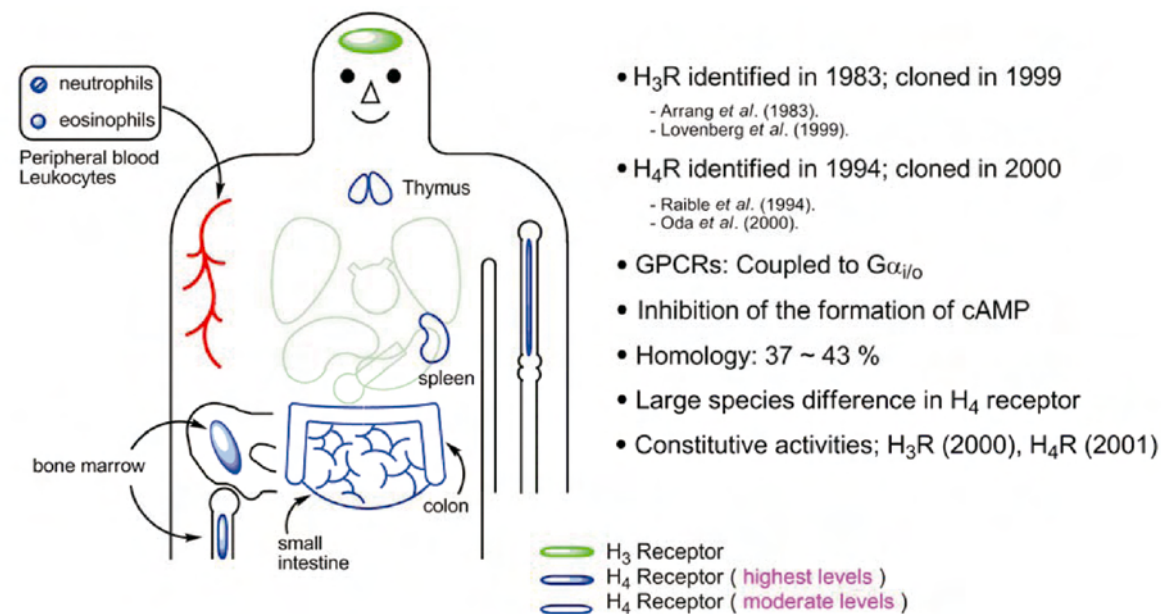


Fig. 1. Tissue Distribution of hH₃R and hH₄R and Their Characteristics

H₄Rが構成的活性化受容体であることも報告された。⁶⁾ このように、2000年前後にヒスタミン受容体に関する新しい発見が続いたため、その後のヒスタミン領域の研究は大きく進展し、隔世の感すら覚える。

H₃RとH₄Rリガンド開発のための薬理学上の評価方法は、それまでよく用いられたin vitroのモルモットの腸管を用いた方法から、遺伝子工学的に強制発現させたhH₃RとhH₄Rに変わった。そのため、モルモットの腸管ではH₃Rアンタゴニストと報告されていたものが、hH₃Rを導入した細胞を用いるとアゴニストであるという報告が見られるようになった。このような薬理学上の評価法の進歩の中で悲運に見舞われたのは、ADHDの治療薬として期待されたGT-2331である。

2-2. GT-2331の現状

GT-2331 (Cipralisant, PerceptinTM) は、1999年にGliatech社が、モルモットの腸管を用いた

薬理評価から強力なH₃Rアンタゴニスト (pK_i = 9.9) として発表したものである (Fig.2).²⁴⁾ 2000年にはADHDの第2相試験を実施し、²⁵⁾ H₃Rを標的とした初めての医薬品の実現が期待された。しかしGliatech社は2002年に倒産し、その知的財産権はMerck社が引き継いだものの、2003年には開発を断念したという経緯がある。²⁶⁾

この間の事情を学術論文で調べてみると、GT-2331は、2002年にラットとhH₃Rでアゴニストと報告された。²⁷⁾ 驚いたことに、2004年にAbott社の研究陣はGT-2331の効率合成と中間体のX線構造解析の結果から、絶対配置の間違いに気付いた。²⁸⁾ その結果GT-2331は、それまでの1R, 2R配置ではなく、実はエナンチオマーの1S, 2S配置であった。またLeursらもhH₃Rでは固有活性α = 1の完全アゴニストであることを報告した (2005).²⁹⁾ なお、固有活性 (α) は、ヒスタミンが受容体に作用することで惹起される最大応答を1としたものである。

筆者が気になるのは、Abott社の合成品の比旋光

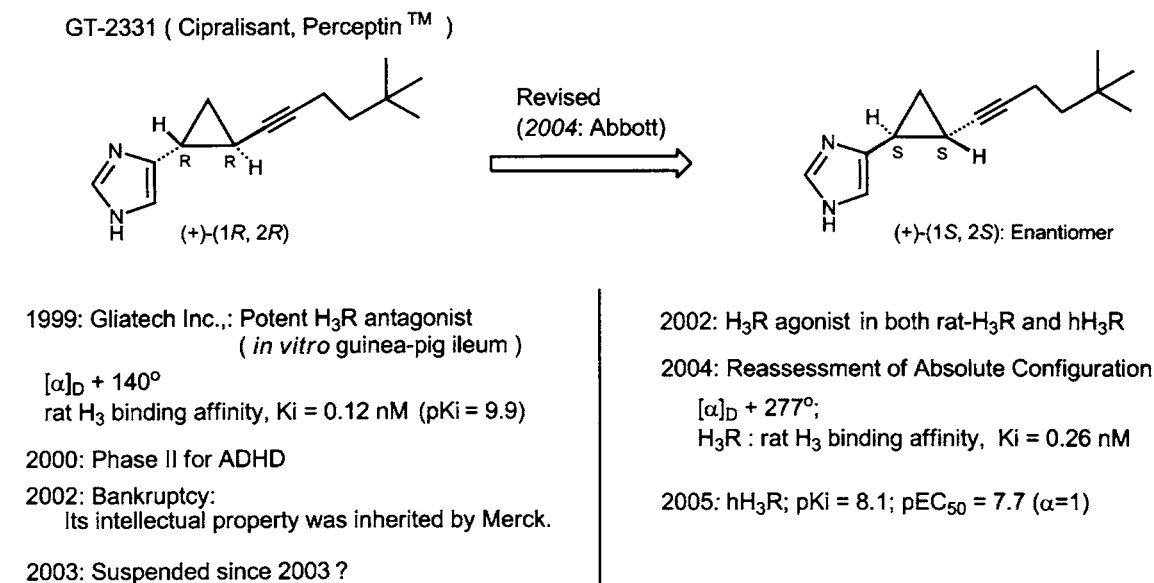


Fig. 2. Present Condition of GT-2331

度が $[\alpha]_D^{+277^\circ}$ に対して元の Gliatech 社のものは $+140^\circ$ と低く鏡像体過剰率は 50% e.e. に過ぎない。したがって Gliatech 社の GT-2331 は, (1S, 2S)-eutomer と (1R, 2R)-distomer の 3:1 混合物であったと思われる。現在, 中国の会社から GT-2331 とされるものが販売されているようであるが, これを薬理実験に使用する場合は, 事前に比旋光度等の物理恒数をチェックするなど慎重を期す必要がある。

3. 既存の hH_3R と hH_4R リガンドの結合親和性

多くの H_3R リガンドは, ヒスタミンのイミダゾールをコアとして開発されてきた。^{5,19,29,30)} 先に述べたように, H_3R リガンドの多くは, H_3R のみならず H_4R とも親和性を持つ。Table 1 に, ヒスタミン及び既存の hH_3R リガンドの hH_3R と hH_4R に対する結合親和性と α 値についてまとめた。

ヒスタミンは, $H_1R \sim H_4R$ の共通の内因性リガンドであるが, これらの GPCR に対する親和性はそれぞれ異なっている。 hH_1R と hH_2R は, ヒスタミンに対する pK_i 値はそれぞれ 4.2 と 4.3 と弱い, hH_3R と hH_4R では 7.8 と 8.1 と高親和性受容体で, hH_4R はヒスタミンに対して最も高い結合性を示す。 R - α -メチルヒスタミン (RAMH) は, hH_3R で pK_i 値は 8.6 であるが, hH_4R では 100 分の 1 弱い親和性のパーシャルアゴニスト ($pK_i = 6.6, \alpha = 0.9$) である。このように H_3R リガンドは, 通常 H_4R では親和性が弱くなる。 H_3R アゴニストであるイメピップ, イメティットも H_4R では同様に作用を弱めたパーシャルアゴニストである。

クロベンプロピットとチオペラミドは, 従来 H_3R アンタゴニストのプロトタイプとされていたが, H_3R の構成的活性の確認後, 共に H_3R ではインバーサゴニストであることが分った。その内クロベンプロピットは, hH_4R では逆にアゴニスト ($\alpha = 0.8$) として作用する。一方, チオペラミド

は, hH_3R と hH_4R の両方のインバーサゴニスト ($\alpha = -1$) である。

4. hH_4R アゴニスト

4-1. 最初の選択的 hH_4R アゴニスト OUP-16

1999 年以前は, H_3R のクローン技術はなく, モルモットの腸管を用いて H_3R リガンドの薬理評価が行われる場合が多かった。1995 年に Timmerman らは, ヒスタミンの中間鎖を C_2 から C_5 に延長したイムペンタミンは, 強力なアンタゴニスト作用を示すと報告したが (Fig. 3)³¹⁾ 後に同グループは, hH_3R を用いて評価した場合, イムペンタミンはアゴニストであると発表した (2001)^{32,33)}。

一方, 我々はイミダゾールを塩基として持つ C-ヌクレオシドの合成法及びその応用研究を行っていたので,^{34,35)} イムペンタミンをテトラヒドロフラン環に組み込むことで, H_3R に対して作用を示す立体配置を知ることが出来るのではな

いかと考えた。そこで, 二つのキラル中心を持つ 5-アミノメチルテトラヒドロフランをデザインし, その 4 異性体すべてを合成した。^{36,37)} それらは生きたラットの脳を用いるマイクロダイアリシスで調べると, 2R, 5R 配置を持つイミフラミンにのみ脳内ヒスタミン遊離をイメピップと同程度まで減少させる H_3R アゴニスト活性を見出した。³⁶⁾ さらに, 我々と Leurs ら (アムステルダム自由大学) は, 共同してイミフラミン及びその誘導体の hH_3R と hH_4R に対する結合親和性 (binding affinity) と機能性評価 (functional assay) を行ったところ, イミフラミンは, hH_3R アゴニストで, hH_4R より 45 倍強いものであった。³⁸⁾ 一方, 興味深いことに, そのシアノグアニジン誘導体 OUP-16 は, 逆に hH_3R (pEC_{50} : 5.5; $\alpha = 0.8$) より hH_4R (pEC_{50} : 7.1; $\alpha = 1.0$) に 41 倍の強さを持つ完全アゴニストであることを明らかとした。我々の発見した OUP-16 は hH_4R に選択性を持つ最初のアゴニストであったため, さらに OUP-16 の効率的合成法も別に開発した。³⁹⁾

Table 1. Binding Affinities of Known Ligands at hH_3R and hH_4R

			hH_3R (pK_i)	hH_4R (pK_i)	H_4 -agonism α
Histamine	H_3 / H_4 agonist		7.8	8.1	1.0
		(Cf. hH_1R 4.2; hH_2R 4.3)			
RAMH	H_3 / H_4 agonist		8.6	6.6	0.9
		(1 / 100 fold)			
Immepip	H_3 / H_4 agonist		9.3	7.7	0.8
Imetit	H_3 / H_4 agonist		9.2	8.5	0.9
Clobenpropit	H_3 : inverse agonist H_4 : agonist		8.9	8.1	0.8
Thiopramide	H_3 / H_4 inverse agonist		7.3	7.2	-1

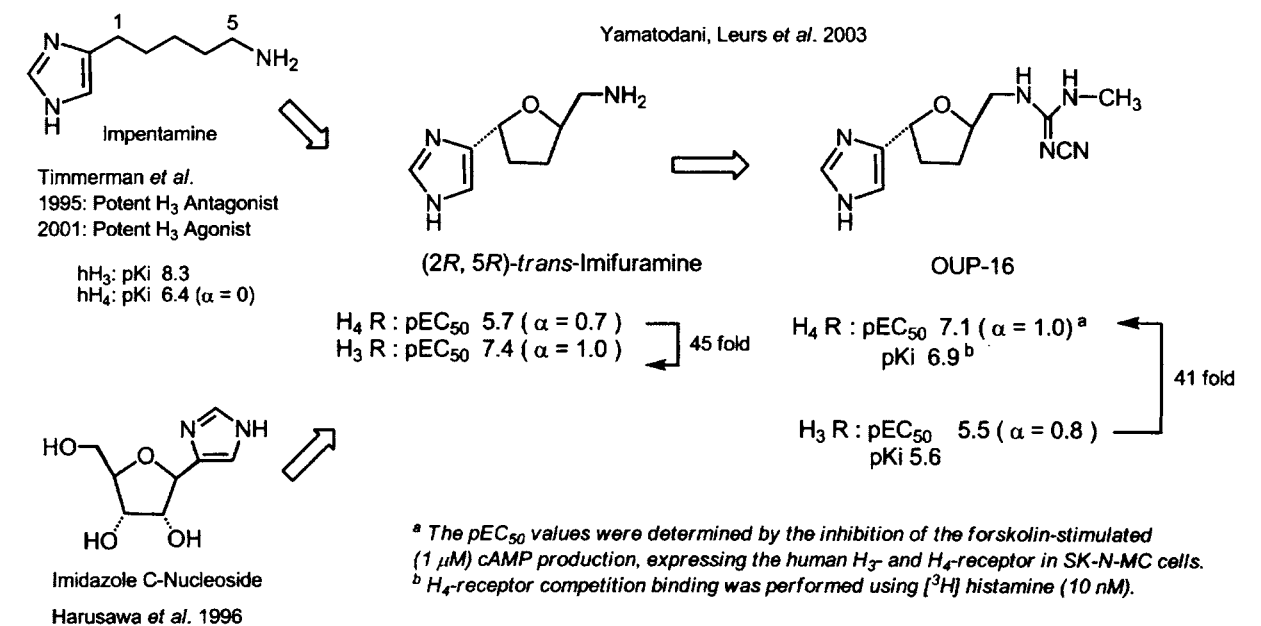


Fig. 3. The First Selective hH_4R Agonist: OUP-16

ここで Leurs らが用いた hH₃R と hH₄R は、小児の癌細胞由来の SK-N-MC 細胞に hH₃R と hH₄R を遺伝子工学的に強制発現させたものである。この手法は J&J 社が開発し、特許を持つもので、Leurs らは研究目的でのみその使用が認められているものであった。このため、SK-N-MC 細胞を用いる評価法を用いることの出来る J&J 社と Leurs らが、その後の hH₄R リガンド開発のほとんどを独占的に進めることとなった。

4-2. 4-MHA と VUF 8430

ヒスタミンの特定の部位にメチル基を導入すると H₁R ～ H₃R に選択性を持つアゴニストを作り分けることができる。2-MHA は、選択的 H₁R アゴニストであり、アミノ基の α 位炭素にメチル基を入れた RAMH は、H₃R アゴニストのプロトタイプ

である。4-MHA は、弱い H₂R アゴニスト (hH₂R: pKi = 5.1) とされていたが、Leurs らは、4-MHA の hH₃R と hH₄R に対する結合親和性と機能性評価を先に述べた SK-N-MC 細胞を用いる手法で調べたところ、4-MHA は hH₄R の選択的アゴニストであることを明らかにした。この場合、4-MHA は hH₃R (Ki = 5200 nM) より hH₄R (Ki = 50 nM) で 100 倍以上の親和性を示すことが明らかとなった。⁴⁰⁾ また Tocris 社は、2006 年より 4-MHA・2HCl を発売している。

Leurs らは、さらにこの研究の中で H₂R アゴニスト、ジマプリットが hH₄R で緩和ながらもアゴニスト活性 (pKi = 6.5) を示すことから、さらに構造活性相関を進めた。ジマプリットのジメチルアミノ基をさらに塩基性の強いグアニジル基に置換した場合、アゴニスト活性は弱くなるものの (pKi

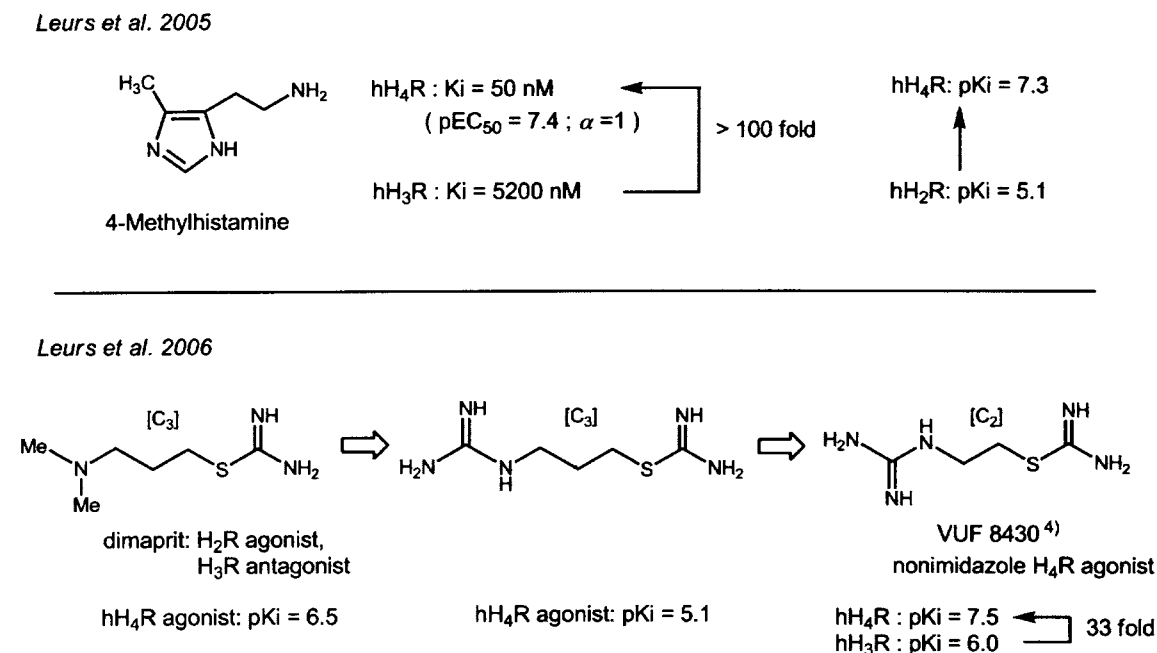


Fig. 4. MHA and VUF8430

= 5.1), 中間炭素鎖を一つ短くした S-(2- グアニジルエチル) イソチオウレア (VUF8430) は、hH₃R (pKi = 6.0) より hH₄R (pKi = 7.5) で 33 倍の選択性を示した。⁴¹⁾ VUF8430 は、最初の非イミダゾール hH₄R アゴニストである。

4-3. クロザピンアナログ

ベンゾジアゼピン誘導体である抗精神薬クロザピンは、H₄R 発見の初期の段階で H₃R に親和性がなく、弱いながらも H₄R 選択的アゴニストとして知られていた。^{3,5)} Leurs らは、クロザピンが、大抵の GPCR に対してアンタゴニストとして作用することに興味を持ち、hH₄R に対して緩和なアゴニスト (pKi = 6.8; pEC₅₀ = 6.7; α = 1) であることをあらためて明らかとした。⁴⁰⁾ そこで、クロザピンのジアゼピン環の N の一つを O に置換したオキサゼピン

では、そのアゴニスト活性は上昇した。さらに、塩素を 8 位から 7 位に置換した 7- クロロジベンゾオキサゼピン体は、hH₄R アゴニスト (pKi = 7.6; pEC₅₀ = 7.7; α = 1) であり、hH₃R (pKi = 5.0) より 330 倍の選択性を示した。⁴²⁾ このジベンゾオキサゼピンは、hH₁R (pKi = 8.1) に対して、hH₄R よりさらに 5 倍の親和性を合わせ持つ。H₁R と H₄R に同時に作用するということは、hH₁R と hH₄R のダブルブロックによる新しいタイプの抗アレルギー剤の開発に繋がる可能性があり興味深い。このジベンゾオキサゼピンは、次に述べる hH₄R アンタゴニストの JNJ7777120 と比べると N-メチルピペラジンとクロロベンゼン部分が共通であり、H₄R のファーマコフォアモデルに対する示唆を与えている。

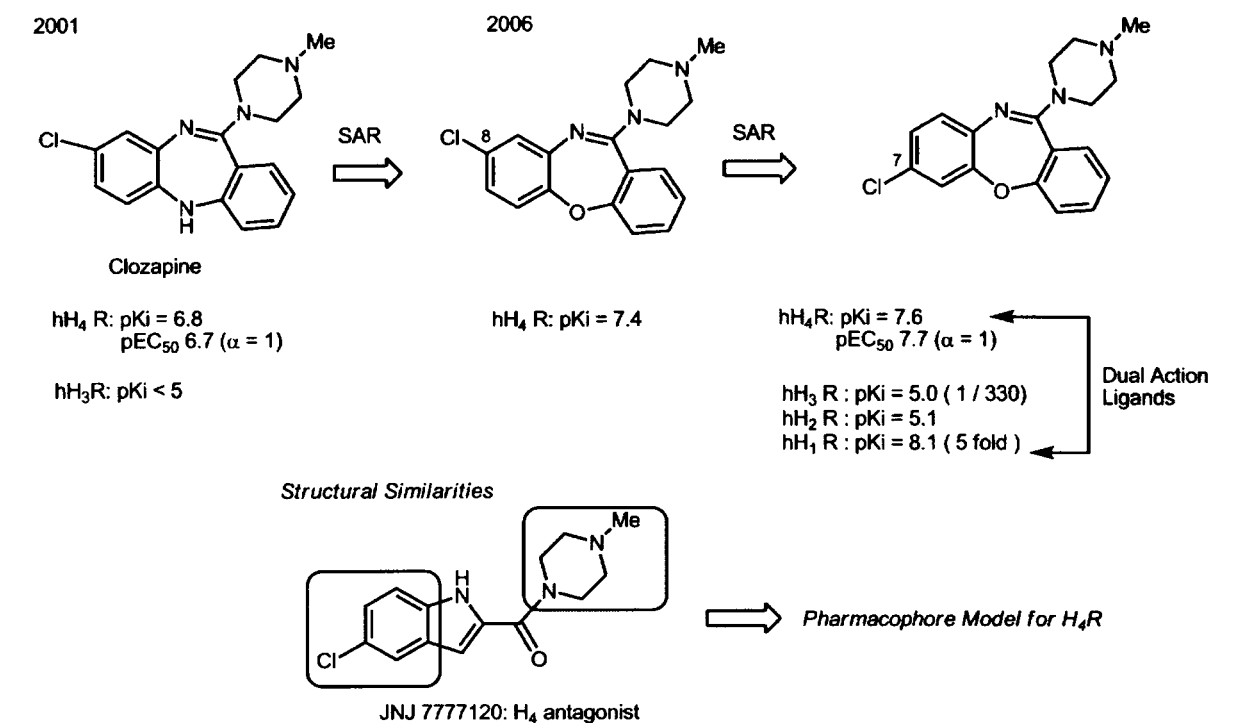


Fig. 5. Clozapine Analogues

5. hH₄R アンタゴニスト

5-1. JNJ7777120 と JNJ10191584

最初の強力な選択的 hH₄R アンタゴニスト JNJ7777120 は、2003 年に J&J 社の研究陣が発表した⁴³⁾。彼らは、H₃R に親和性の高いイミダゾール含有化合物では、H₄R の高選択性は期待できないという判断から、自社の化合物ライブラリーの中から非イミダゾール化合物を選び、ハイスループットスクリーニングで、リード化合物となるインドリールピペラジンを見つけた。この化合物は、hH₄R で Ki = 38 nM, hH₃R で Ki = 9000 nM の結合親和性を示し、240 倍の hH₄R 選択性を持つ。このリードの SAR から 5 位に塩素を加え、

さらに N-メチルピペリジンとした JNJ7777120 (hH₄R: Ki = 4 nM; hH₃R: Ki = 5152 nM) は、hH₄R と hH₃R の差が 1240 倍の高選択的 hH₄R アンタゴニストであった。さらに、インドールをベンズイミダゾールにした JNJ10191584 を発表した^{44,45)}。JNJ10191584 (hH₄R: Ki = 26 nM; hH₃R: Ki = 14053 nM) は、hH₄R と hH₃R の選択性は 540 倍と JNJ7777120 より劣るが、分子内にイミダゾール部位を持つため二つの N 間で H が移動する互変異性体を生じ、極性が生まれる。J&J 社が開発したこれらは 2007 年より試薬として発売されている。JNJ7777120 は、Sigma 社を含む 6 社から購入でき、水に不溶で DMSO に溶解する。また、JNJ10191584 は、Tocris 社ともう一社よりマレイン酸塩として発売されている。

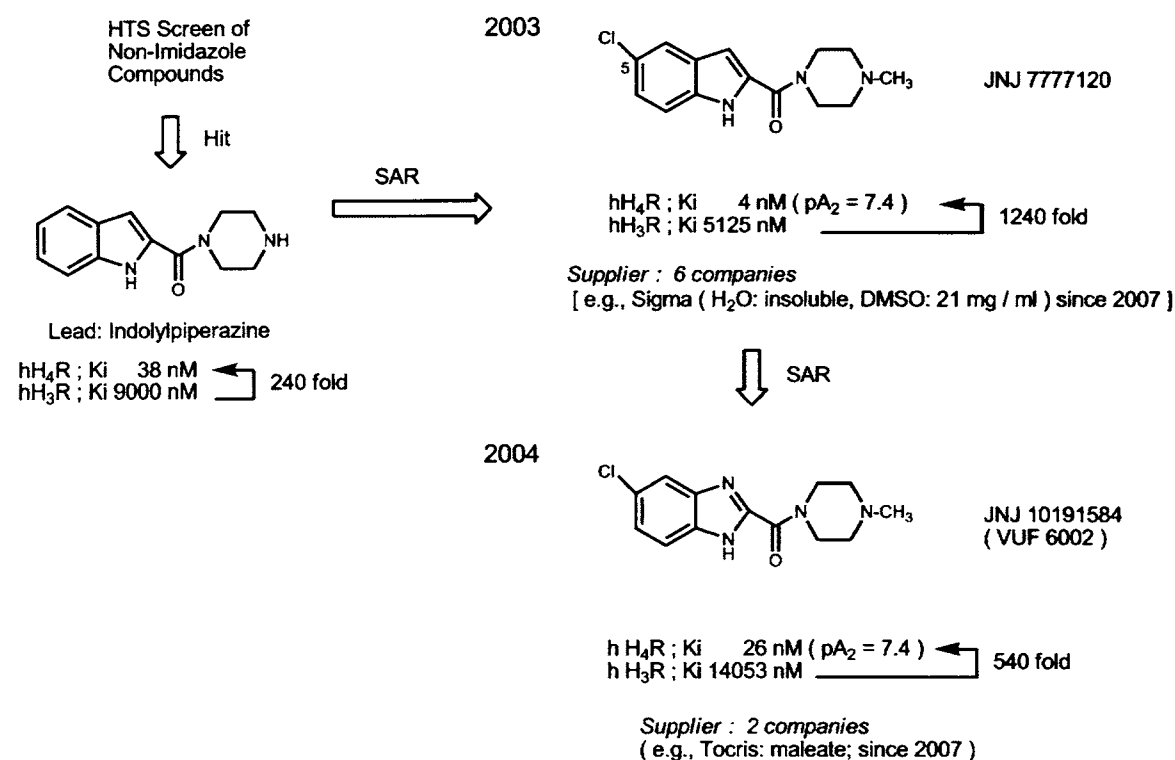


Fig. 6. The First Potent and Selective Non-imidazole hH₄R Antagonists

一方、Leurs らは、JNJ10191584 と同一化合物を VUF6002 として同時期に報告した⁴⁵⁾。彼らはさらにこれらの hH₄R アンタゴニストの詳細な薬理実験を行ない、これらはニュートラルアンタゴニストであることを明らかにした^{13,45)}。

5-2. チエノピロールピペリジンカルボキシアミドと 2-アリールベンツイミダゾール

J&J 社は、JNJ7777120 のベンゼン環をチオフェンに置換した hH₄R アンタゴニスト、チエノピロールピペリジンカルボキシアミドを報告した⁴⁶⁾。チオフェンの S とピロールの N が同じ方

向を向く head-to-head 型 (hH₄R: Ki = 25 nM) と、逆向きのものを head-to-tail 型 (hH₄R: Ki = 3 nM) は、ともに hH₄R の高親和性物質である。彼らは、さらに 2-アリールベンツイミダゾール類を見出し⁴⁷⁾、中でも末端に N-メチルホモピペラジン持つものは hH₄R で Ki = 1 nM という高い値を示した。

5-3. シクロプロパン骨格に基づく H₄R アンタゴニスト

周東らは、2-アミノエチルシクロプロピルイミダゾール [(1S, 2S)-cis-AECI (Ki = 1.31 nM)] が、選択的 H₃R アゴニストであることを見出し、そ

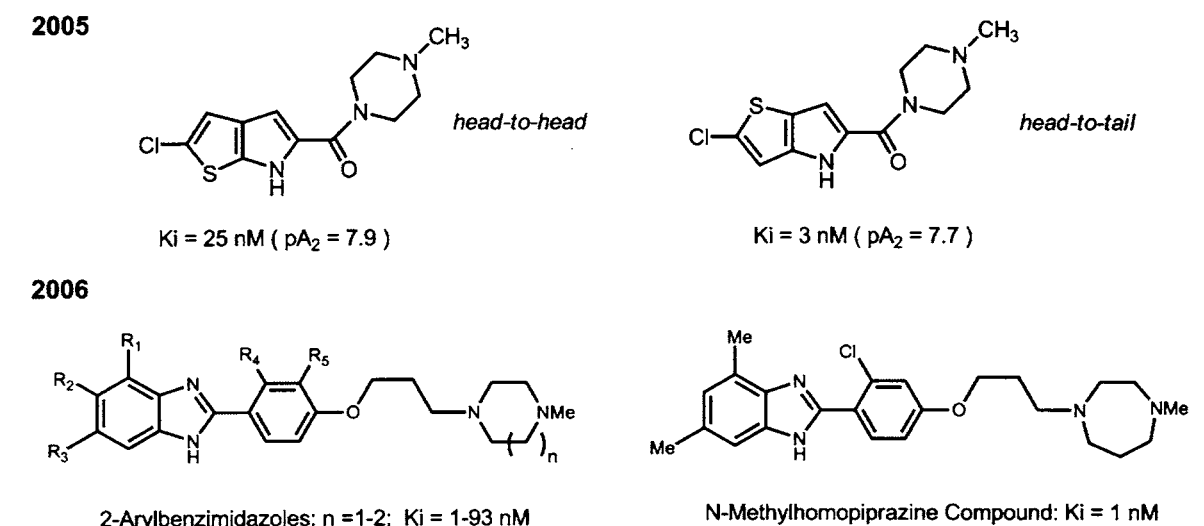


Fig. 7. Thienopyrrole Piperidine Carboxamides and 2-Arylbenzimidazoles

れを基にシクロプロパン環の立体配置と側鎖疎水性部位の検討を行った。その結果、N-クロルベンジル基を持つ (1R, 2S)-*trans*-CAIC が、hH₄R (K_i = 8.4 nM) と hH₃R (K_i = 7.6 nM) の両方でアンタゴニスト活性を示すこと、さらに 1R, 2R 配置を持ち側鎖を 1 炭素減らした (1R, 2R)-*trans*-CAIC は、hH₄R アンタゴニストとして hH₃R (K_i = > 1000 nM) より hH₄R (K_i = 118 nM) で 8.5 倍の結合親和性を示すことを報告した。⁴⁸⁾

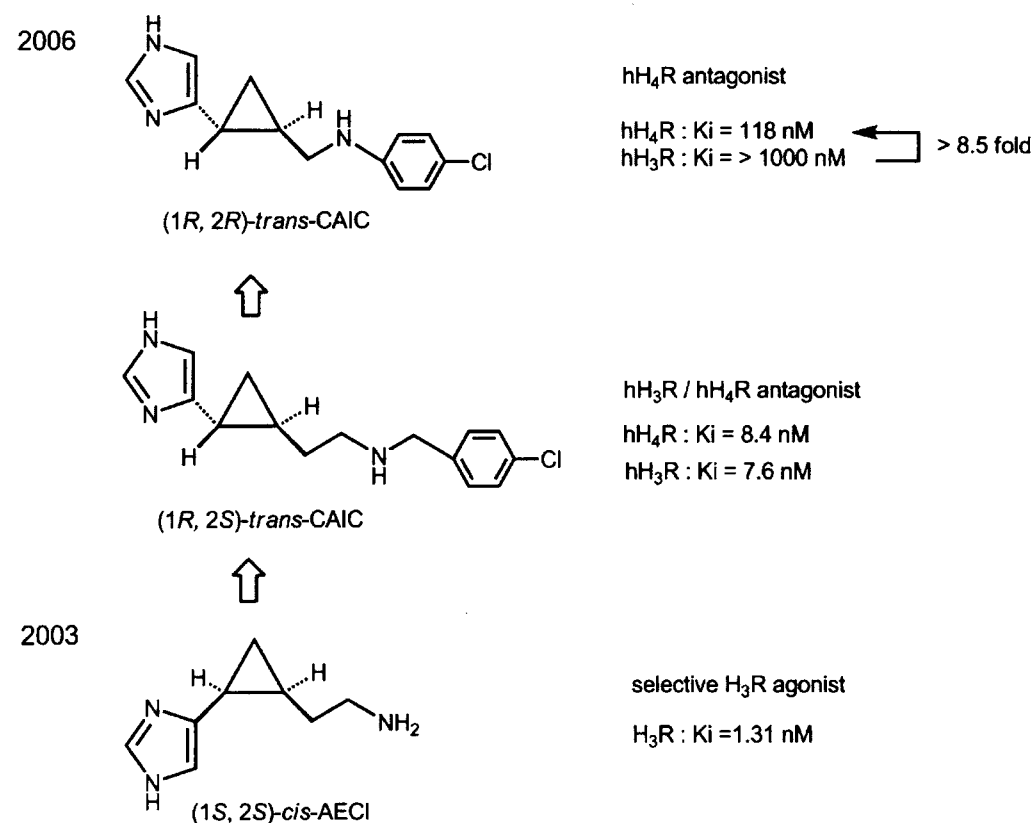


Fig. 8. Cyclopropane-based H₃R or H₄R Antagonists

6. 特許化合物

特許審査中のものから H₄R アンタゴニストを調べると、Bayer 社と Pfizer 社から新しい構造を持つものとして 2-アミノピリジン^{49,50)} と 4-アルキルアミノピリジン類⁵¹⁾ が見られる。また、JNJ 化合物由来のベンズイミダゾール⁵²⁾ やチエノイミダゾール類⁵³⁾ がある。また、重原子に富む Janssen 社のトリア

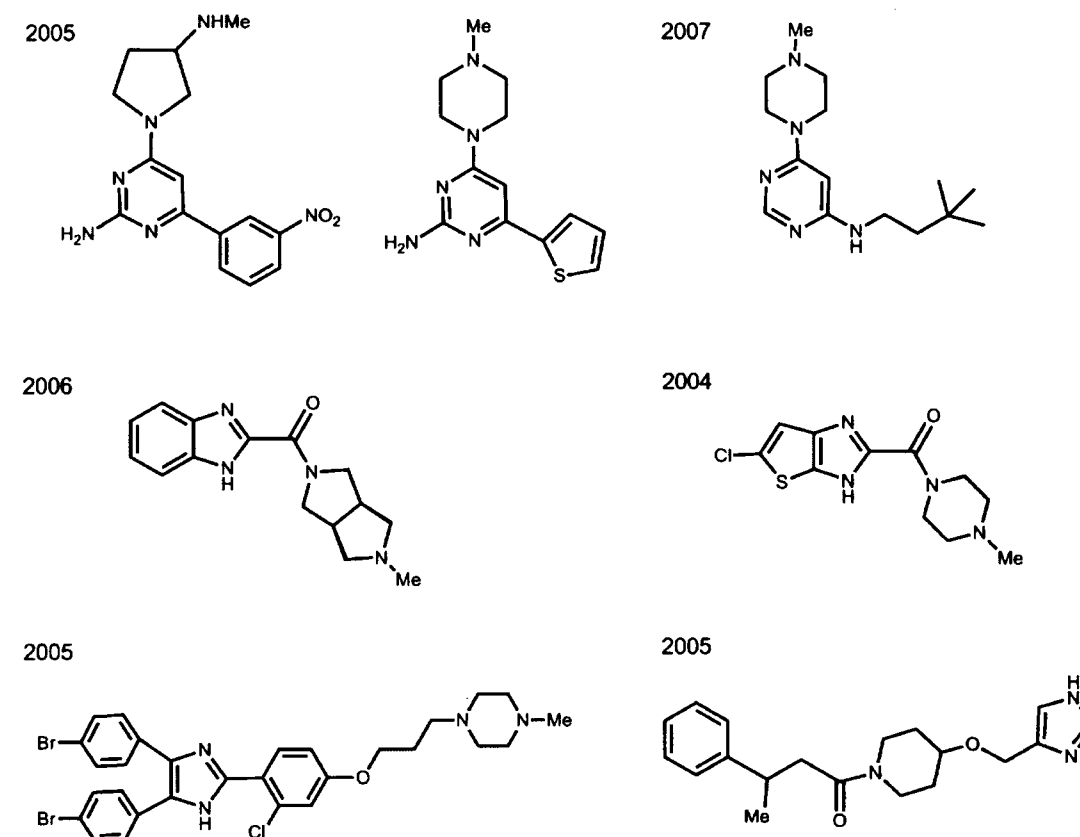


Fig. 9. Patent Compounds

リールイミダゾール⁵⁴⁾ と AstraZeneca 社のアシルペリジン化合物⁵⁵⁾ などが見られた。

7. おわりに

ここで、薬理学ツールとして有用であり、且つ購入できるリガンドをまとめると、H₄R アゴニストとしては 4-MHA、ニュートラルアンタゴニストとしては、JNJ7777120 と JNJ10191584、hH₄R と hH₃R 共通のインバースアゴニストとしてチオ

ペラミドをあげることができる (Table 2)。なお、hH₄R 選択的インバースアゴニストは、今回の調査ではまだ確認できなかった。J&J 社の Venable と Thurmond は、優れた総説を出し、2005 年ぐらゐまでがよくまとめられている。⁵⁶⁾ 本稿では、これを踏まえ 2005 年以降の報告分と我々が得た知見を加えた。

H₄R は、2000 年に確認されて以来 8 年になろうとしているが、既存の H₁R アンタゴニストに対して H₄R アンタゴニストが新しい作用機序を持つ

Table 2. Key hH₄R Ligands as Pharmacological Tools

	In vitro Ki Values (nM)		
	Agonist	Neutral Antagonist	Inverse Agonist
	4-MH	JNJ 7777120 JNJ 10191584	Thioperamide
hH ₄ R	50	4 26	27
hH ₃ R	5200	5100 14000	25

抗アレルギー剤となる可能性が次第に明らかにされている。そうした中、有機合成化学者と薬理学者が協力することで、我が国から優れた H₄R リガンドが創製されることを期待するものである。この小文が、hH₄R リガンドの研究の発展に寄与することが出来るなら筆者のこれに勝る喜びはない。

謝辞 本稿をまとめるにあたって、大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座の大和谷厚教授と波多野浩太修士にご指導を賜り深く御礼申し上げます。香川大学医学部の橋本剛博士には、ご助言をいただき御礼申し上げます。また、アルフレッサファーマの坂本靖彦博士と下田綾子氏には、助言及び特許調査などでご協力をいただき深謝いたします。さらに大阪薬科大学の栗原拓史元学長からは終始全面的な協力をしていただき深く御礼申し上げます。最後に、機会あるごとに暖かく励ましていただいた名古屋市立大学名誉教授、塩入孝之先生に深く感謝の意を表します。

REFERENCES

1) Arrang J.-M., Garbarg M., Schwartz J.-C., *Nature*, **302**, 832-837 (1983).
2) Lovenberg T. W., Roland, B. L., Wilson S. J., Jiang X., Pyati J., Huvar A., Jackson M. R., Erlander M. G., *Mol. Pharmacol.* **55**, 1101-1107 (1999).

3) Oda T., Morikawa N., Saito Y., Masuho Y., Matsumoto S., *J. Biol. Chem.*, **275**, 36781-36786 (2000).
4) Nakamura T., Itadani H., Hidaka Y., Ohta M., Tanaka K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 615-620 (2000).
5) Liu C., Ma X. -J., Jiang X., Wilson S. L., Hofstra C. L., Blevitt K., Li X., Chai, W., Carruthers, N, Lovenberg T. W., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 420-426 (2001).
6) Morse K. L., Behan J., Laz, T. M., West R. E., Jr., Greenfender S. A., Anthes J. C., Umland S., Wan Y., Hipkin R. W., Gonsiorek W., Shin N., Gustafson E. L., Qiao X., Wang S., Hendrick J. A., Green J., Bayne M., Monsma F. J., Jr., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 1058-1066 (2001).
7) Nguyen T., Shapiro D. A., George S. R., Setola V., Lee D. K., Cheng R., Rauser L., Lee S. P., Lynch K. R., Roth B. L., O’Dowd B. F., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 427-433 (2001).
8) Zhu Y., Michalovich D., Wu H. -L., Tan K. B., Dytko, G. M., Mannan I. J., Boyce R., Alston J., Tierney L. A., Li X., Herrity N. C., Vawter L., Sarau H. M., Ames R. S., Davenport C. M., Hieble, J. P., Wilson, S., Bergsma D. J., Fitzgerald L. R., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 434-444 (2001).
9) Raible D. G., Lenahan T., Fayvilevich Y., Kosinski, R., Schulman E. S., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **149**, 1506-1511 (1994).

10) Hough L. B., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 415-419 (2001) and references therein.
11) Thurmond R. L., Desai P. J., Dunford P. J., Fung-Leung W.-P., Hofstra C. L., Jiang W., Nguyen S., Riley J. P., Sun. S., Williams K. N., Edwards J. P., Karlsson L., J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 404-413 (2004).
12) Ling P., Ngo K., Nguyen S., Thurmond R. L., Edwards J. P., Karlsson L., Fung-Leung W.-P., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 161-171 (2004).
13) de Esch I. J. P., Thurmond R. L., Jongejan A., Leurs R., *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 462-469 (2005).
14) Daugherty B. L., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 5-7 (2004).
15) Jablonowski J. A., Carruthers N. I., Thurmond R. L. J. A., *Mini Rev. Med. Chem.*, **4**, 993-1000 (2004).
16) Bell J. K., McQueen D. S., Rees J. L., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 374-380 (2004).
17) Fung-Leung W. P., Thurmond R. L., Ling P., Karlsson L., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **5**, 1174-1183 (2004).
18) Buckland K. F., Williams T. J., Conroy D. M., *Br. J. Pharmacol.*, **140**, 1117-1127 (2003).
19) Lim H. D., van Rijin R. M., Ling, P., Bakker, R. A., Thurmond R. L., Leurs R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 1310-1321 (2005).
20) Celanire, S., Wijtmans, M., Talaga, P., Leurs R., de Esch I. J. P., *Drug Discovery Today*, **10**, 1613-1627 (2005).
21) Leurs R., Bakker R. A., Timmerman H., de Esch I. J. P., *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**, 107-120 (2005).
22) Morisset S., Rouleau A., Ligneau X., Gbahou F., Tardivel-Lacombe J., Stark H., Schunack W., Ganellin C. R., Schwartz J.-C., Arrang J.-M., *Nature*, **408**, 860-864 (2000).
23) Bakker R. A., Leurs R., “Constitutively Active Histamine Receptors, Part 13, G Protein-Coupled Receptors,” eds. by Seifert R., Wieland T., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. kGaA, Weinheim, 2005, pp. 195-222.

24) Ali S. M., Tedford C. E., Gregory R., Handley M. K., Yates S. L., Hirth W. W., Phillips J. G., *J. Med. Chem.*, **42**, 903-909 (1999).
25) Tedford C. E., Mant T. G. K.,Mah M., Shaffer L. M., Program & Abstract for International Sendai Histamine Symposium: Nov. 22-25; O-12, p 53 (2000).
26) From Wikipedia, USA (2007).
27) Wulff B. S., Hastrup S., Rimvall K., *Eur. J. Pharmacol.*, **453**, 33-41 (2002).
28) Liu H., Kerdesky F. A., Black L. A., Fitzgerald M., Henry R., Esbenshade T. A., Hancock A. A., Bennani, Y. L., *J. Org. Chem.*, **69**, 192-194 (2004).
29) Kitbunnadaj R., Hoffmann M., Fratanтони, S. A., Bongers G., Bakker R. A., Wieland K., Jilali A. el, De Esch I. J. P.; Menge W. M. P. B., Timmerman H., Leurs R., *Bioorg. & Med. Chem.*, **13**, 6309-6323 (2005).
30) Kitbunnadaj R., Zuiderveld O. P, Christophe B., Hulscher S., Menge W. M. P. B., Gelens E., Snip E., Bakker R. A., Celanire S., Gillard M., Talaga P., Timmerman H., Leurs R., *J. Med. Chem.*, **47**, 2414-2417 (2004).
31) Vollinger R. C., Menge W. M. P. B., Leurs R., Timmerman H., *J. Med. Chem.*, **38**, 266-271 (1995).
32) Wieland K., Bongers G., Yamamoto Y., Hashimoto T., Yamatodani A., Menge W. M. P. B., Timmerman H., Lovenberg T. W., Leurs R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 908-914 (2001).
33) Govoni M., Lim H. D., El-Atmioui D., Menge W. M. P. B., Timmerman H., Bakker R. A., Leurs R., De Esch I. J. P., *J. Med. Chem.*, **49**, 2549-2557 (2006).
34) Harusawa S., Murai Y., Moriyama H., Imazu T., Ohishi H., Yoneda R., Kurihara T., *J. Org. Chem.*, **61**, 4405-4411 (1996).
35) 総説：春沢信哉，荒木理佐，栗原拓史，有合化，**61**, 682-693 (2003).
36) Harusawa S., Imazu T., Takashima S., Araki L., Ohishi H., Kurihara T., Yamamoto Y., Yamatodani A., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2561-2564 (1999).

- 37) Harusawa S., Imazu T., Takashima S., Araki L., Ohishi H., Kurihara T., Sakamoto Y., Yamamoto Y., Yamatodani A., *J. Org. Chem.*, **64**, 8608-8615 (1999).
- 38) Hashimoto T., Harusawa S., Araki L., Zuiderveld O. P., Smit M. J., Imazu T., Takashima S., Yamamoto Y., Sakamoto Y., Kurihara T., Leurs R., Bakker R. A., Yamatodani A., *J. Med. Chem.*, **46**, 3162-3165 (2003).
- 39) Harusawa S., Araki L., Terashima H., Kawamura M., Takashima S., Sakamoto Y., Hashimoto T., Yamamoto Y., Yamatodani A., Kurihara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 832-837 (2003).
- 40) Lim H. D., van Rijn R. M., Ling P., Bakker R. A., Thurmond R. L., Leurs R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 1310-1321 (2005).
- 41) Lim H. D., Smits R. A., Bakker R. A., van Dam C. M. E., de Esch I. J. P., Leurs R., *J. Med. Chem.*, **49**, 6650-6651 (2006).
- 42) Smits R. A., Lim H. D., Stegink B., Bakker R. A., de Esch I. J. P., Leurs R., *J. Med. Chem.*, **49**, 4512-4516 (2006).
- 43) Jablonowski J. A., Grice C. A., Chai W., Dyorak C. A., Venable J. D., Kwok A. K., Ly K. S., Wei J., Baker S. M., Desai P. J., Jiang W., Wilson S. J., Thurmond R. L., Karlsson L., Edwards J. P., Lovenberg T. W., Carruthers N. I., *J. Med. Chem.*, **46**, 3957-3960 (2003).
- 44) Venable J. D., Cai H., Chai W., Dvorak C. A., Grice C. A., Jablonowski J. A., Shah C. R., Kwok A. K., Ly K. S., Pio B., Wei J., Desai P. J., Jiang W., Nguyen S., Ling P., Wilson S. J., Dunford P. J., Thurmond R. L., Lovenberg T. W., Karlsson L., Carruthers N. I., Edwards J. P., *J. Med. Chem.*, **48**, 8289-8298 (2005).
- 45) Terzioglu N., van Rijn R. M., Bakker R. A., de Esch I. J. P., Leurs R., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **14**, 5251-5256 (2004).
- 46) L.-Dutra A., Arienti K. L., Buzard D. J., Hack M. D., Khatuya H., Desai P. J., Nguyen S., Thurmond R. L., Karlsson L., Edwards J. P., Breitenbucher J. G., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **16**, 6043-6048 (2006).
- 47) Kazuta Y., Hirano K., Natsume K., Yamada S., Kimura R., Matsumoto S., Furuichi K., Matsuda A., Shuto S., *J. Med. Chem.*, **46**, 1980-1988 (2003).
- 48) Watanabe M., Kazuta Y., Hayashi, H., Yamada S., Matsuda A., Shuto S., *J. Med. Chem.*, **49**, 5587-5596 (2006).
- 49) Sato H., Fukushima K., Shimazaki M., Urbahns K., Sakai K., Gantner F., Bacon K., *Eur. Pat. Appl.* 1505064, Feb. 9, 2005.
- 50) Sato H., Tanaka K., Shimazaki M., Urbahns K., Sakai K., Gantner F., Bacon K., *PCT Int. Appl.* WO 2005054239, Jun. 16, 2005.
- 51) Bell A. S., Lane C. A. L., Mowbray C. E., Selby M. D., Swain N. A., Williams D. H., *PCT Int. Appl.* WO 2007072163, Jun. 28, 2007.
- 52) Lane C. A. L., Price D. A., *U. S. Pat. Appl.* 2006111416, May 25, 2006.
- 53) Cai H., Carruthers N. I., Dvorak C. A., Edwards J. P., Kwok A. K., *U. S. Pat. Appl.* 2004048878, Mar. 11, 2004.
- 54) Buzard D. J., Edwards J. P., Kindrachuk D. E., Venable J. D., *PCT Int. Appl.* WO 2005092066, Jan. 6, 2005.
- 55) Burns S., Hamley P., *PCT Int. Appl.* WO 2005014579, Feb. 17, 2005.
- 56) Venable J. D., Thurmond R. L., *Anti-Inflamm. & Anti-Allergy Agents in Med. Chem.*, **5**, 307-322 (2006).

—Reviews—

錐体外路系運動障害治療におけるセロトニン 5-HT_{1A} 受容体の役割

大野 行弘*, 清水 佐紀, 今木 淳太

Therapeutic Role of 5-HT_{1A} Receptors in Treating Extrapyrimal Motor Disorders

Yukihiro OHNO, Saki SHIMIZU, and Junta IMAKI

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 24, 2008; Accepted November 14, 2008)

Serotonergic neurons play an important role in modulating extrapyramidal motor disorders such as Parkinson's disease and drug-induced parkinsonism. Here we reviewed the actions of 5-HT_{1A} agonists in animal models of extrapyramidal symptoms (EPS) and discussed their therapeutic potential in treating EPS. 5-HT_{1A} agonists (e.g., 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tertraline and tandospirone) significantly improved various types of EPS including antipsychotic-induced bradykinesia and catalepsy, and dopaminergic neurotoxin-induced bradykinesia. The antiparkinsonian action of 5-HT_{1A} agonists was blocked by 5-HT_{1A} antagonists (e.g., WAY-100135), but was unaffected by cerebral 5-HT depletion with *p*-chlorophenylalanine (5-HT synthetase inhibitor). Immunohistochemical studies revealed that 5-HT_{1A} agonists preferentially reduced antipsychotic (D₂ antagonism)-induced Fos expression in the striatum and the core part of the accumbens, the areas presumably related to EPS induction. These findings suggest that 5-HT_{1A} agonists stimulate postsynaptic 5-HT_{1A} receptors, which region-specifically counteract the D₂ blocking actions of antipsychotics and alleviate EPS. The 5-HT_{1A} receptors may serve as a favorable therapeutic target for the treatment of drug-induced parkinsonism and Parkinson's disease.

Key words—5-HT_{1A} receptor; extrapyramidal motor disorders; antipsychotics; Parkinson's disease; Fos expression

1. はじめに

近年、セロトニン神経研究の進展により、精神神経疾患の治療は大きく進歩してきた。主な成果としては、①新たな抗不安薬としての 5-HT_{1A} 受容体作動薬の開発、②非定型抗精神病薬としての 5-HT_{2A} およびドパミン D₂ 受容体複合拮抗薬 (SDA: serotonin-dopamine antagonist) の開発、③うつ病および不安障害治療薬としての選択的セロトニン再取込み阻害薬 (SSRI: selective serotonin

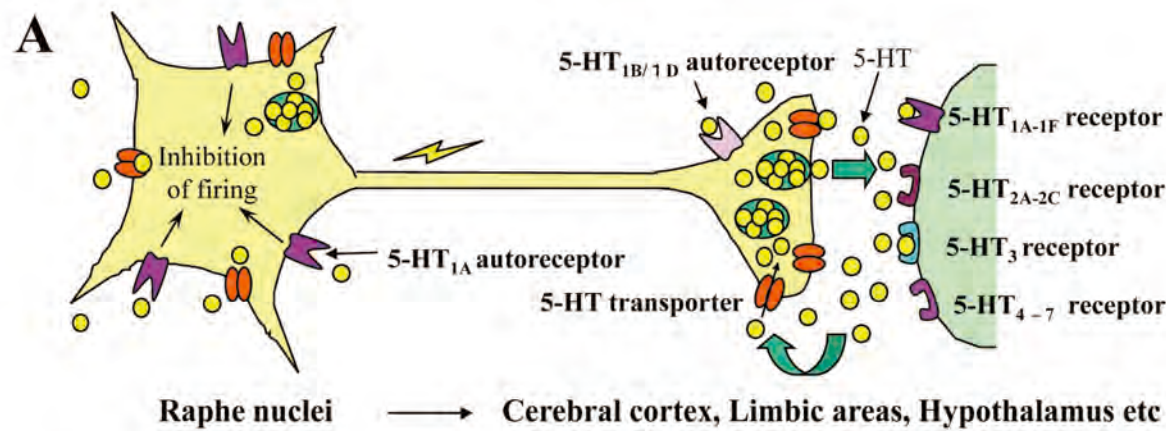
reuptake inhibitor) の開発、④片頭痛治療薬としての 5-HT_{1B/1D} 受容体作動薬の開発などがあげられる。これら新薬を用いた治療によって、これまで臨床において問題となっていた副作用が軽減され、従来の治療薬では効果不十分であった症状が改善されつつある¹⁾。

脳内セロトニン神経は中脳の縫線核に局在しており、その軸索を大脳皮質・大脳辺縁系・大脳基底核・視床下部などの広汎な脳内部位に投射し、ヒトの精神機能および運動機能の調節に重要な役

* 大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室, e-mail: yohnoh@gly.oups.ac.jp

割を果している (Fig. 1A). 一方, セロトニン神経の機能を仲介する 5-HT 受容体には約 15 種のサブタイプが存在する.^{2,3)} これら受容体サブタイプは, その細胞内シグナル伝達系の違いにより 5-HT₁ ~ 5-HT₇ 受容体の 7 種に大別され, さらに 5-HT₁ 受容体は 5-HT_{1A} ~ 5-HT_{1F} 受容体, 5-HT₂ 受容体は 5-HT_{2A} ~ 5-HT_{2C} 受容体に細分される (Fig. 1). このうち 5-HT_{1A} 受容体は, 7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体であり, G_{i/o} 蛋白と共役してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制すること, また内向き整流性カリウムチャンネルを活性化して

神経活動を抑制(過分極)することが知られている.^{2,3)} 5-HT_{1A} 受容体は不安障害やうつ病の治療標的分子として長く研究されてきたが (Fig. 1B), 最近になって, 統合失調症やパーキンソン病の新たな治療ターゲットとしても注目されるようになってきた.^{1,4,5)} 我々はこれまで, 5-HT_{1A} 受容体の錐体外路系運動調節における役割に着目し, 種々の動物モデルを用いて 5-HT_{1A} 作動薬の作用について研究してきた. 本稿では, 当研究室で得られた知見を中心に, 錐体外路障害治療における 5-HT_{1A} 受容体の役割とその作用機構について概説する.



B

5-HT receptors	Type	Signal transduction	Clinical implication
5-HT _{1A-1F}	GPCR	AC activation	Anxiety, Depression, Migraine
5-HT _{2A-2C}	GPCR	Stimulation of PI turnover	Schizophrenia, Depression
5-HT ₃	Ion channel	Depolarization	Emesis
5-HT ₄₋₇	GPCR	AC inhibition	?

GPCR: G-protein coupled receptor, AC: adenylate cyclase, PI: Phosphatidylinositol

Fig. 1 Serotonergic neurons and 5-HT receptor subtypes. A: A diagram of the serotonergic neuron and synaptic transmission. B: Classification of 5-HT receptor subtypes.

2. ドパミン神経系と錐体外路系運動障害

錐体外路系運動機能の調節には, 中枢ドパミン神経系が主要な役割を果たしている. 中枢ドパミン神経系には主として①黒質-線条体路, ②中脳-大脳皮質路, ③中脳-大脳辺縁系路, ④視床下部-脳下垂体路の 4 つの投射路が存在する (Fig. 2A). このうち①黒質-線条体ドパミン神経系が錐体外路系運動 (主として不随意運

動) の調節機能を担っている.^{3,6)} この黒質-線条体ドパミン神経が変性・脱落するとパーキンソン病が発症し, 無動・筋固縮・振戦・姿勢反射障害などを主症状とする重篤な錐体外路系運動障害が出現する (Fig. 2A).⁶⁾ また, 統合失調症の治療に用いられる多くの抗精神病薬によっても, 線条体ドパミン D₂ 受容体の遮断に基づく薬剤性パーキンソン症候群が発症する (Fig. 2A).^{6,7)}

錐体外路系の運動中枢である線条体は, 大脳皮

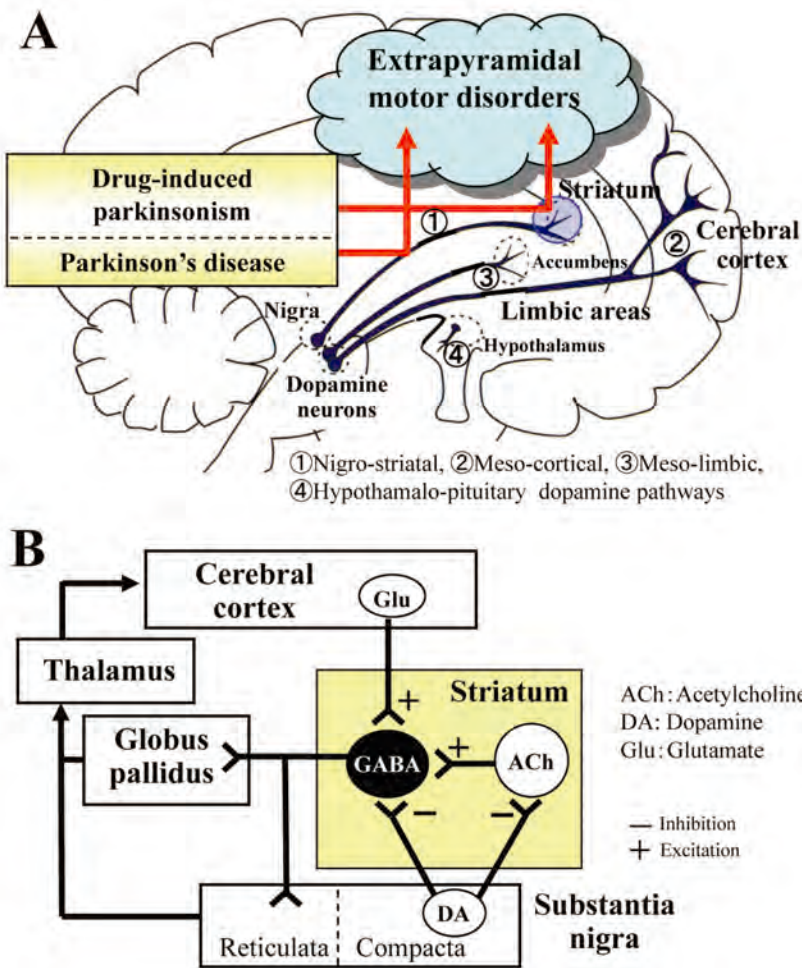


Fig. 2 Brain dopaminergic neurons and regulation of the extrapyramidal motor functions in the basal ganglia. A: Main dopaminergic pathways and extrapyramidal disorders (i.e., drug-induced parkinsonism and Parkinson's disease). B: Neuronal network regulating the extrapyramidal motor functions in the basal ganglia.

質からグルタミン酸神経の興奮性入力と、黒質緻密層からドパミン神経の抑制性入力を受けている (Fig. 2B). また、線条体内には介在ニューロンとして興奮性のアセチルコリン神経が分布しており、線条体から出力される抑制性 GABA 神経はドパミン神経とアセチルコリン神経による相反的な調節を受けている。線条体からの出力は、淡蒼球および視床に伝達され、これは大脳皮質→線条体→視床→大脳皮質の制御ループを形成している⁶⁾ (Fig. 2B). 例えばパーキンソン病の場合、黒質ドパミン神経が変性して線条体ドパミン機能が低下すると、相対的にアセチルコリン神経活動が優位になる。同様の現象は抗精神病薬によって線条体 D₂ 受容体が遮断された場合にも起こり、パーキンソン病および薬剤性パーキンソン症候群の治療に抗アセチルコリン薬が広く使用されている。

一方、1990 年以降になってセロトニン神経系の機能研究が進み、特に 5-HT_{2A} 受容体遮断による錐体外路系運動障害の改善効果が注目されてきた^{1,3,7-9)}。これまでに、セロトニン神経がドパミン神経活動を抑制的に制御し、5-HT_{2A} 受容体刺激が、黒質ドパミン神経の発火（神経活動）を抑制すること、線条体でのドパミン神経終末からのドパミン遊離を抑制することなどが知られている^{7,8)}。しかし、その他の 5-HT 受容体サブタイプの錐体外路系運動機能に及ぼす影響とそのメカニズムについては、未だ不明な点が多い。

3. 5-HT_{1A} 作動薬の錐体外路障害改善作用

これまで 5-HT_{1A} 作動薬が抗精神病薬によるカタレプシー行動を抑制することは多く報告されてきた¹⁰⁻¹²⁾。しかし、その作用機序については一致した見解が得られていなかった。また、これまでの研究で用いられてきたカタレプシー試験は容易な評価法ではあるものの、その反応特異性は乏しく、5-HT_{1A} 作動薬の錐体外路障害に対する効果

についてもさらに確認する必要があった。そこで我々はブラジキネジア（寡動）評価法であるポールテストなど、複数のモデルを用いて 5-HT_{1A} 作動薬の作用を評価してきた。ポールテストでは、マウスを垂直に立てたポールの先端に上向きに置き、動物が下向きに回転するために要する回転時間 (T_{turn}) と、床面まで降下するポール降下時間 (T_{total}) を計測する (Fig. 3D)。小川らによって最初に考案された評価系であり、ドパミン神経毒の 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) による黒質ドパミン神経の障害に応じて、マウスのポール降下時間が延長する。その後、多くの抗精神病薬が D₂ 拮抗作用の力価に応じて特異的にブラジキネジアを誘発することが示され¹³⁾、錐体外路障害の評価系として現在広く利用されている¹⁴⁾。

Fig. 3 に、ポールテストにおける haloperidol のブラジキネジア誘発作用と、これに対する抗アセチルコリン薬 (trihexyphenidyl) および 5-HT_{1A} 作動薬の作用を示す¹⁵⁾。マウスに haloperidol を処置すると、T_{turn} および T_{total} 値は用量依存的に上昇し、明らかなブラジキネジアが観察された。この haloperidol による行動遅延は抗パーキンソン病薬の trihexyphenidyl との併用によって顕著に改善された。一方、選択的な 5-HT_{1A} 作動薬である 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tertraline (8-OH-DPAT) および tandospirone の作用を検討した結果、いずれの化合物も haloperidol のブラジキネジア誘発作用を有意に改善することが示された (Fig. 3)。同様の 5-HT_{1A} 作動薬による改善は haloperidol によるカタレプシー発現においても確認された¹⁶⁾。5-HT_{1A} 作動薬のブラジキネジア改善作用は、trihexyphenidyl の効果に匹敵するものであり、5-HT_{1A} 作動薬が臨床においても薬剤性パーキンソン症候群に有効であることが示唆される。

さらに、ドパミン神経の変性を伴うパーキンソン病モデルにおける 5-HT_{1A} 作動薬の効果を検

討する目的で、選択的なドパミン神経毒である MPTP を用いてマウスにブラジキネジアを誘発させた。MPTP は脳内でモノアミン酸化酵素 B (MAO_B) によって 1-methyl-4-phenylpyridinium

イオン (MPP⁺) に変換され、特異的にドパミン神経に取り込まれた後、ミトコンドリア電子伝達系を阻害して神経毒性を発現する。MPTP (30 mg/kg を 1 日 1 回、4 日間投与) 処置により運動障

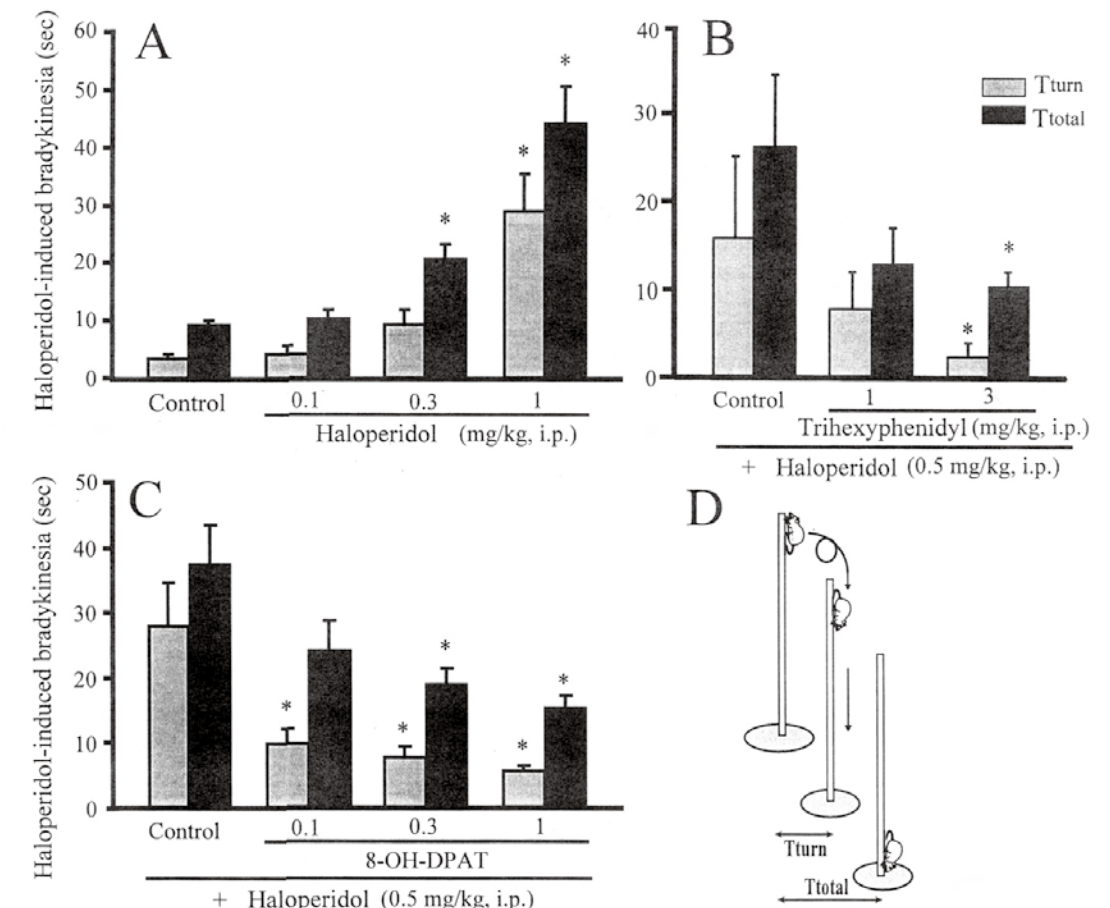


Fig. 3 Effects of the 5-HT_{1A} agonist (i.e., 8-OH-DPAT) and the muscarinic acetylcholine antagonist (i.e., trihexyphenidyl) on haloperidol-induced bradykinesia in mice. **A:** A dose-response of haloperidol-induced bradykinesia. **B and C:** Effects of trihexyphenidyl and 8-OH-DPAT on haloperidol-induced bradykinesia, respectively. **D:** A diagram of the mouse pole-test. *P<0.05, significantly different from respective control value.

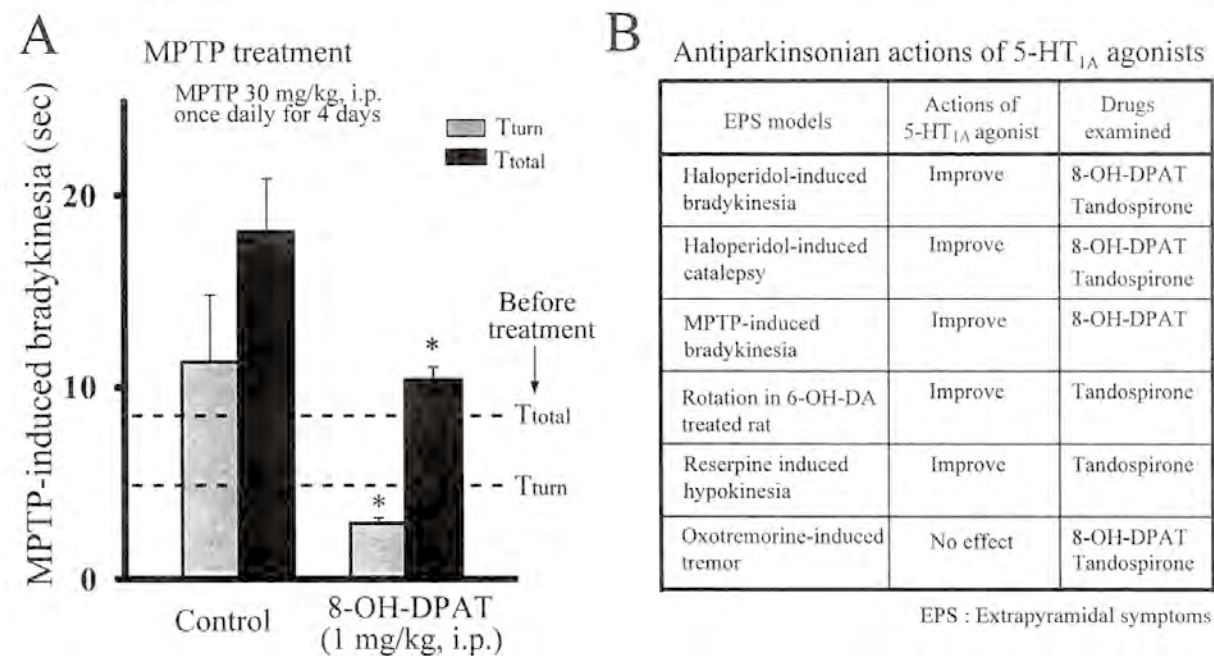


Fig. 4 Antiparkinsonian actions of 5-HT_{1A} agonists (i.e., 8-OH-DPAT and tandospirone) in various animal models of extrapyramidal disorders. A: Antibradykinetic actions of 8-OH-DPAT in the dopamine-lesioned mice by MPTP. *P<0.05, significantly different from the control value. B: Antiparkinsonian actions of 5-HT_{1A} agonists in various animal models.

害が現れた動物を用いて 5-HT_{1A} 作動薬の作用をポールテストによって検討したところ、5-HT_{1A} 作動薬は MPTP 誘発ブラジキネジアに対しても有意な改善効果を示した (Fig. 4A).

Fig. 4B に、これまでに検討した各種動物モデルにおける 5-HT_{1A} 作動薬の効果をまとめる。^{5, 15-17)} 5-HT_{1A} 作動薬は、前述したブラジキネジアおよびカタレプシー発現の他、ドパミン神経毒の 6-hydroxydopamine (6-OH-DA) をドパミン神経路に注入した片側ドパミン破壊モデルや、モノアミン枯渇薬であるレセルピンにより誘発される無動症状に対しても、有意な改善作用を示した。

4. 5-HT_{1A} 作動薬の錐体外路障害改善メカニズム

1) 5-HT_{1A} 拮抗薬の効果

5-HT_{1A} 作動薬の改善作用が、5-HT_{1A} 受容体を介した反応であるかを確かめる目的で、選択的な 5-HT_{1A} 拮抗薬である WAY-100135 の効果を検討した。¹⁵⁻¹⁷⁾ WAY-100135 を 5-HT_{1A} 作動薬と併用投与した結果、ポールテストにおいて認められた 5-HT_{1A} 作動薬の改善作用は有意に拮抗された (Fig. 5A)。また、カタレプシー試験においても同様の結果が得られ、5-HT_{1A} 作動薬の抗カタレプシー作用は WAY-100135 によって拮抗された (Fig.

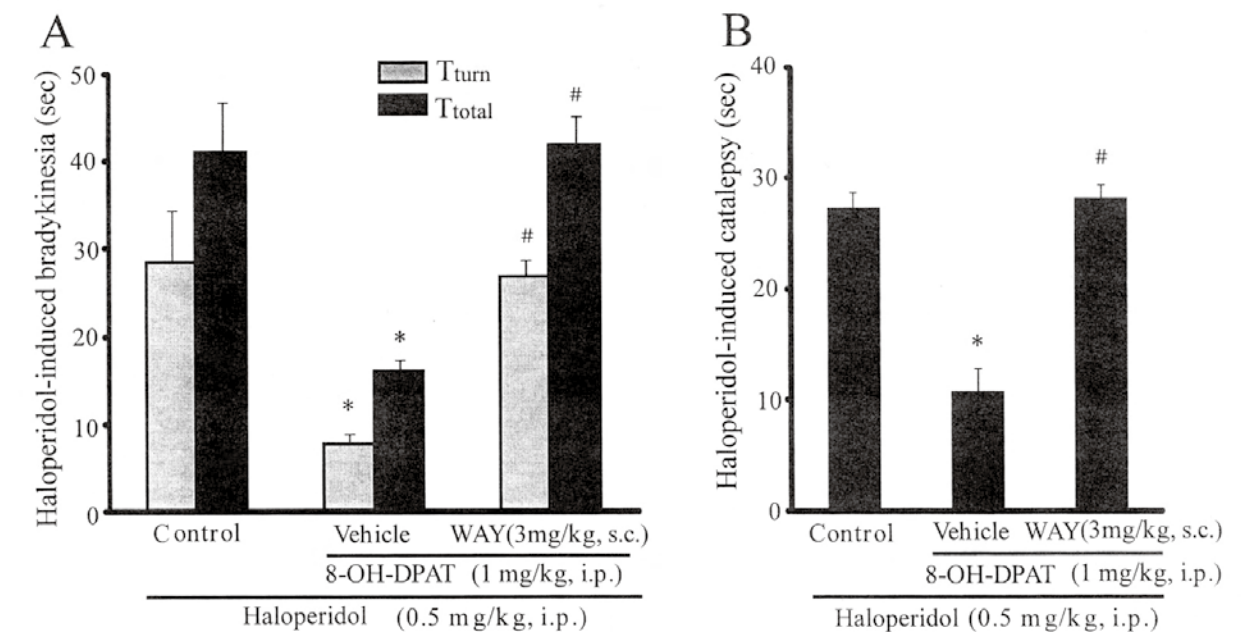


Fig. 5 Reversal of the Antiparkinsonian actions of 5-HT_{1A} agonists by the selective 5-HT_{1A} antagonist WAY-100135 (WAY). A: Effects of WAY on haloperidol-induced bradykinesia in the mouse pole-test. B: Effects of WAY on haloperidol-induced catalepsy in mice. *P<0.05, significantly different from respective control value. #P<0.05, significantly different from the value with 8-OH-DPAT + haloperidol.

5B)。これらの結果から、5-HT_{1A} 作動薬の錐体外路障害改善作用が 5-HT_{1A} 受容体の活性化を介した反応であることが確認された。

2) *p*-Chlorophenylalanine (PCPA) によるセロトニン神経不活性化の影響

セロトニン神経は縫線核に細胞体を有しており、そこから種々の脳内部位に神経線維を投射している。一方、5-HT_{1A} 受容体は縫線核のセロトニン神経細胞体上に存在するシナプス前 5-HT_{1A} 自己受容体と、投射先のシナプス後膜上に存在するシナプス後 5-HT_{1A} 受容体の 2 種が存在する (Fig. 1A)。シナプス前 5-HT_{1A} 自己受容体は、セロトニン神経自身の過剰な発火を抑制する negative feedback 機構の一つとして働き、セロトニン神経

活動を抑制している。そこで、5-HT_{1A} 作動薬の錐体外路障害改善作用が、シナプス前 5-HT_{1A} 自己受容体もしくはシナプス後 5-HT_{1A} 受容体のどちらを介する反応であるかを明らかにする目的で、5-HT 合成酵素阻害薬である PCPA による 5-HT 神経の不活性化を試みた。¹⁵⁾

PCPA は 300 mg/kg を動物に 3 日間 3 回腹腔内投与した。Fig. 6A に背側縫線核におけるセロトニン免疫陽性細胞数の変化を示す。PCPA 処置後のマウスでは、背側縫線核のセロトニンは明らかに減少しており、PCPA 群の 5-HT 免疫陽性細胞数は生理食塩水を投与した対照群の 10 % 以下であった。次に、このようなセロトニン枯渇動物を用いてポールテストを行ったが、対照動物の場合と同様に、haloperidol によるブラジキネジアは 8-OH-

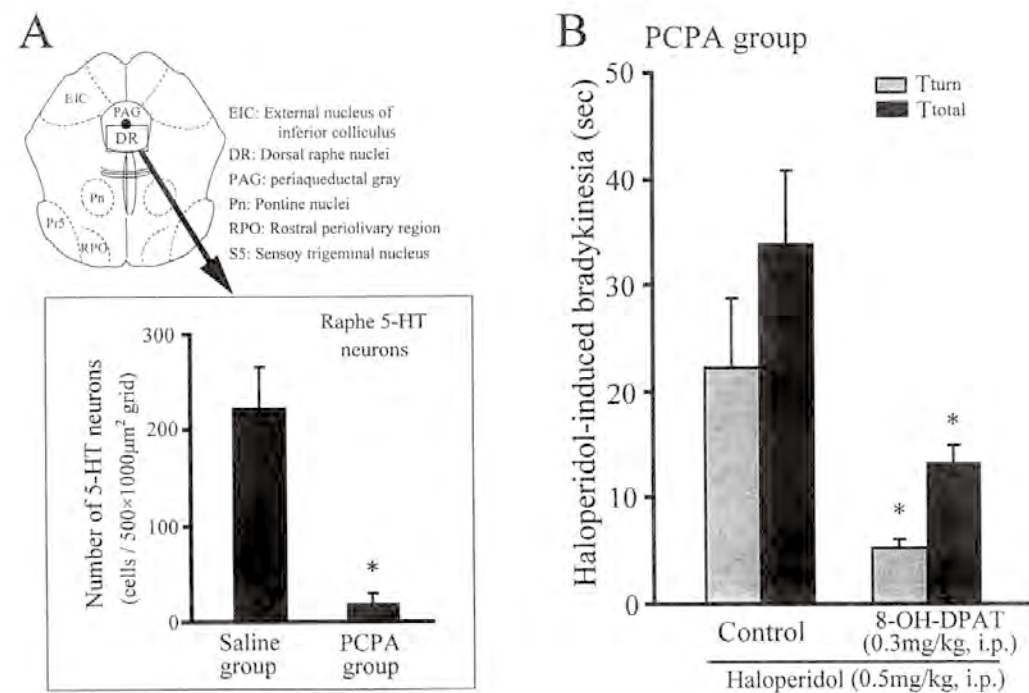


Fig. 6 Effects of cerebral 5-HT depletion by p-chlorophenylalanine (PCPA) on the antibradykinetic actions of 8-OH-DPAT. **A:** Loss of 5-HT-containing neurons in the dorsal raphe nuclei by the PCPA treatment. * $P < 0.05$, significantly different from the saline-treated group. **B:** Effects of 8-OH-DPAT on haloperidol-induced bradykinesia in the PCPA-treated animals. * $P < 0.05$, significantly different from the control value.

DPATによって顕著に改善された (Fig. 6B). このように, 5-HT_{1A} 作動薬のブラジキネジア改善作用がセロトニン神経の不活性化により影響を受けなかったことから, これら薬剤は主としてシナプス後 5-HT_{1A} 受容体を活性化することにより錐体外路障害を改善するものと考えられる.

3) 脳内 Fos 発現を指標としたドパミン D₂ 遮断応答に対する作用

一般に, 最初期遺伝子である c-fos あるいはその遺伝子産物である Fos 蛋白は痛み, ストレス, 痙攣, 薬物処置など様々な刺激に応じて脳部位特異的に発現する¹⁸⁾. このため, 各種生体刺激に対する脳内興奮部位の探索や, 薬物の作用部位探索マーカーとして広く評価されている. 一方, 大脳

基底核のニューロンにおいてはドパミン D₂ 受容体が Fos 発現を常に抑制制御しており, 各種の抗精神病薬投与による D₂ 受容体遮断に応じて, 大脳皮質, 側坐核 (大脳辺縁系の一部), 線条体, 外側中隔などでの Fos 蛋白が特異的に発現誘導されることが示されている¹⁹⁻²²⁾. そこで, ① 5-HT_{1A} 作動薬が抗パーキンソン病作用を示す用量で抗精神病薬による D₂ 遮断応答を減弱するか否か, さらに, ② その 5-HT_{1A} - D₂ 受容体相互作用が脳内のどこで起こるかを検討する目的で, Fos 免疫組織学的検討を行った (Fig. 7)¹⁶⁾.

Haloperidol は過去の報告ともよく一致し, 側坐核のコア領域とシェル領域, 線条体および外側中隔などにおいて Fos 発現を顕著に上昇させた. 一方, 5-HT_{1A} 作動薬の 8-OH-DPAT は, 線条体お

よび側坐核コア領域においてのみ haloperidol による Fos 発現を顕著に軽減し, 側坐核のシェル領域, 外側中隔などの脳部位では有意な作用を示さなかった (Fig. 7). 一般に, 線条体および側坐核コア領域は抗精神病薬による錐体外路障害の発現に關与する副作用部位として知られ, 側坐核シェル領域は抗精神病薬の治療効果発現部位であると考えられている^{19, 21, 23)}. このため, 8-OH-DPAT による 5-HT_{1A} 受容体の刺激が, 抗精神病薬の副作用部位選択的に作用し, D₂ 遮断応答を軽減するものと考えられた. さらに, 5-HT_{1A} 受容体の活性化は主作

用部位である側坐核シェル領域における Fos 発現には影響しなかったことから, 抗精神病薬との併用に際しても, 5-HT_{1A} 作動薬は抗精神病薬の治療効果を減弱しないものと考えられる.

4) 小括

5-HT_{1A} 作動薬の錐体外路障害改善作用のメカニズムについてまとめる. これまでの検討で, ① 5-HT_{1A} 作動薬の錐体外路障害改善効果が, 5-HT 枯渇によるセロトニン神経の不活性化により影響を受けなかったことから, 5-HT_{1A} 受容体による

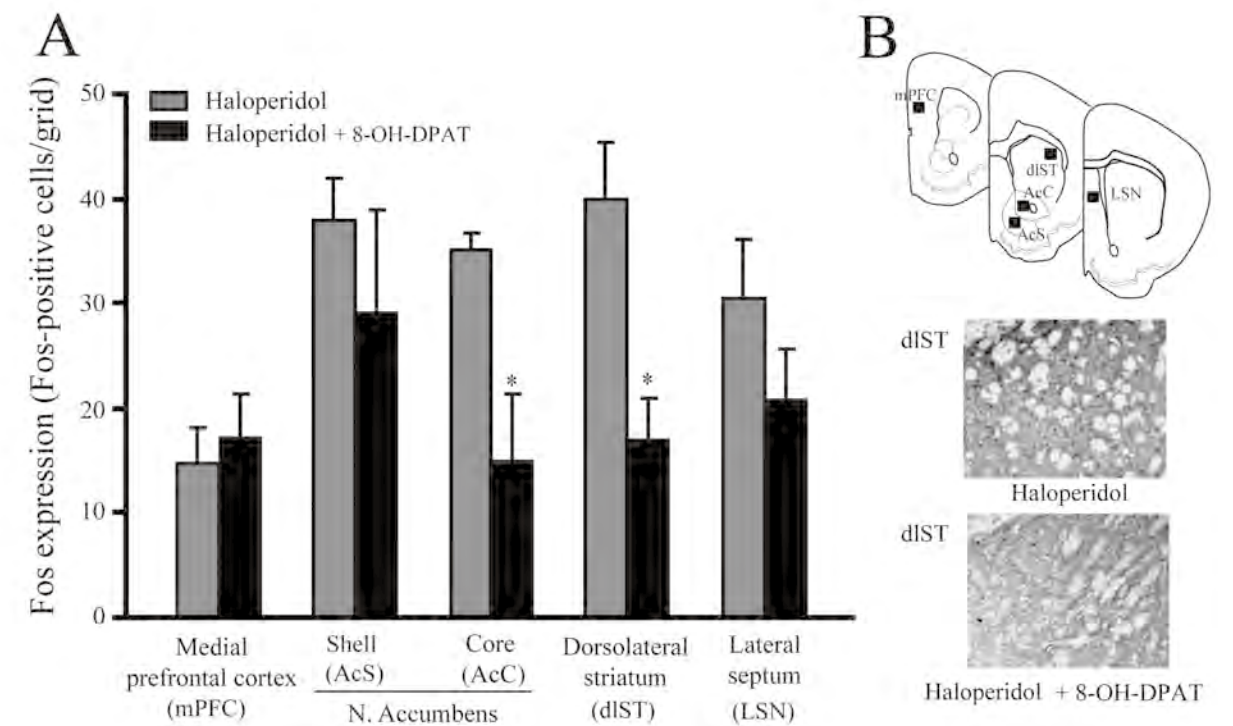


Fig. 7 Effects of the 5-HT_{1A} agonist (i.e., 8-OH-DPAT) on the forebrain Fos expression induced by haloperidol (D₂ receptor antagonist). Right panels show the forebrain areas selected for quantitative analysis of Fos expression and the representative photographs of Fos-positive neurons in the dorsolateral striatum. * $P < 0.05$, significantly different from the value with haloperidol alone.

錐体外路系運動機能の調節は主としてシナプス後 5-HT_{1A} 受容体を介する反応であると考えられた。また、② 5-HT_{1A} 作動薬は、抗精神病薬の副作用部位である線条体および側坐核コア領域において選択的に haloperidol による Fos 発現を減弱した。5-HT_{1A} 受容体の活性化がこれら副作用部位におけるドパミン神経の機能低下を改善することにより、錐体外路障害を改善するものと考えられた (Fig. 8)。さらに、③ 5-HT_{1A} 作動薬は、線条体 D₂ 遮断による薬剤性パーキンソン症候群のみでなく、MPTP や 6-OH-DA 処置によるドパミン神経障害モデルにおいても顕著な改善作用を示した。このことから、5-HT_{1A} 受容体の改善効果は、5-HT_{2A} 受容体の場合と異なり、ドパミン神経の賦活化を介する二次的なものでなく、ドパミン神経投射先での直接作用によるものと推察された (Fig. 8)。

一方、5-HT_{1A} 受容体の刺激が線条体 D₂ 遮断応

答を軽減する細胞レベルでのメカニズムは未だ不明である。一般に、線条体 D₂ 受容体は内因性のドパミンの刺激によって Fos 発現を tonic に抑制していると考えられている。^{19, 21, 24)} D₂ 受容体は G_{i/o} 蛋白に共役する G 蛋白共役型受容体であり、アデニル酸シクラーゼを抑制することにより protein kinase-A (PK-A) 系を介して Fos 発現を抑制する。抗精神病薬はこの D₂ 受容体を介する抑制制御を解除し、Fos 発現を上昇すると考えられており、PK-A をロックアウトした動物では抗精神病薬による線条体 Fos 発現ならびに錐体外路障害の発現は消失する。²⁴⁾ このため、同じく G_{i/o} と共役する GPCR である 5-HT_{1A} 受容体の活性化が、アデニル酸シクラーゼー PK-A 系を介して抗精神病薬の Fos 発現 (D₂ 遮断応答) を軽減する可能性が考えられる。他方、5-HT_{1A} 作動薬は線条体における大脳皮質由来のグルタミン酸遊離を抑制することが

報告されている。^{25, 26)} グルタミン酸神経系の刺激は、NMDA 受容体を介して線条体での Fos 発現ならびに錐体外路障害の発現を促進することが知られており、²²⁾ 5-HT_{1A} 作動薬が線条体でのグルタミン酸遊離抑制を介して抗パーキンソン作用を発現した可能性も考えられる (Fig. 8)。線条体内における 5-HT_{1A} 受容体の作用機構に関しては、今後さらなる検討が必要である。

5. 錐体外路障害治療における 5-HT_{1A} 受容体の役割

以上のごとく、5-HT_{1A} 作動薬は抗精神病薬の投与によって起こる薬剤性パーキンソン症候群およびドパミン神経の変性に伴う錐体外路障害を共に改善した。これらの作用は臨床で使用されている抗アセチルコリン薬 (trihexyphenidyl など) に匹敵する効果であり、5-HT_{1A} 作動薬が抗パーキンソン病薬として有用であることが示唆された。一方、5-HT_{1A} 受容体を介する錐体外路障害の改善機構は、これまでに知られている 5-HT_{2A} 受容体遮断による改善機構とは異なるものであった。すなわち、5-HT_{2A} 受容体は黒質—線条体ドパミン神経上に存在し、その神経発火と神経終末からのドパミン遊離を制御している (Fig. 8)。5-HT_{2A} 拮抗薬はこのドパミン神経の抑制機構を解除することにより錐体外路障害改善作用を示すと考えられている。^{7, 8)} このため、ドパミン神経が脱落・変性するようなパーキンソン病の病態では、その効果が減弱する可能性がある。この点、5-HT_{1A} 作動薬はドパミン神経を介さず、投射先で直接改善作用を示すと考えられ、幅広い病態に有効であると期待される。さらに、5-HT_{1A} 受容体と 5-HT_{2A} 受容体の作用メカニズム (作用部位、作用様式) が異なることから、例えば 5-HT_{1A} 作動薬と 5-HT_{2A} 拮抗薬が併用された場合にも、相加的な治療効果が得られるものと期待される。今後、5-HT_{1A} 作動薬と 5-HT_{2A} 拮抗薬の併用療法や、5-HT_{1A} および 5-HT_{2A} 受容

体に対する作用を併せ持つような化合物の設計などが、錐体外路障害治療の新たな治療・創薬アプローチとして有望であろうと思われる。

6. 終わりに

老人人口が急増し、高齢化に直面している現代において、パーキンソン病など神経変性疾患の治療は医療上の大きな課題となっている。5-HT_{1A} 作動薬に関しては、古くから抑うつ、不安症状を改善することが知られてきたが、今回紹介したように、錐体外路障害に対しても新たな有効性が期待される。また、パーキンソン病患者では、錐体外路障害とともに、抑うつ・不安などの精神症状が高頻度にみられることが知られており、⁵⁾ 5-HT_{1A} 作動薬がパーキンソン病の運動障害と精神症状の両者に対して有用である可能性も考えられる。一方、その他の 5-HT 受容体サブタイプの錐体外路系運動調節における役割については、未だ不明な点が多い。最近では抗精神病薬を感情障害治療に用いるケースが非常に多くなっており、海外では、うつ病や双極性障害の治療に SDA 系抗精神病薬とセロトニン作用薬 (抗うつ薬など) が広く併用されている。これら薬物間の相互作用や副作用を薬動学的な見地から予測する上においても、錐体外路障害の発現における 5-HT 受容体サブタイプの役割とドパミン—セロトニン神経間の相互作用メカニズムについて、今後さらに検討して行く必要があると思われる。

謝辞 本研究の遂行にあたり、研究助成頂いた (財) 内藤記念科学振興財団に深謝する。

REFERENCES

- 1) Ohno Y., *Brain* 21, 11, 158-164 (2008).
- 2) Gerhardt C.C., van Heerikhuizen H., *Eur. J. Pharmacol.*, 334, 1-23 (1997).

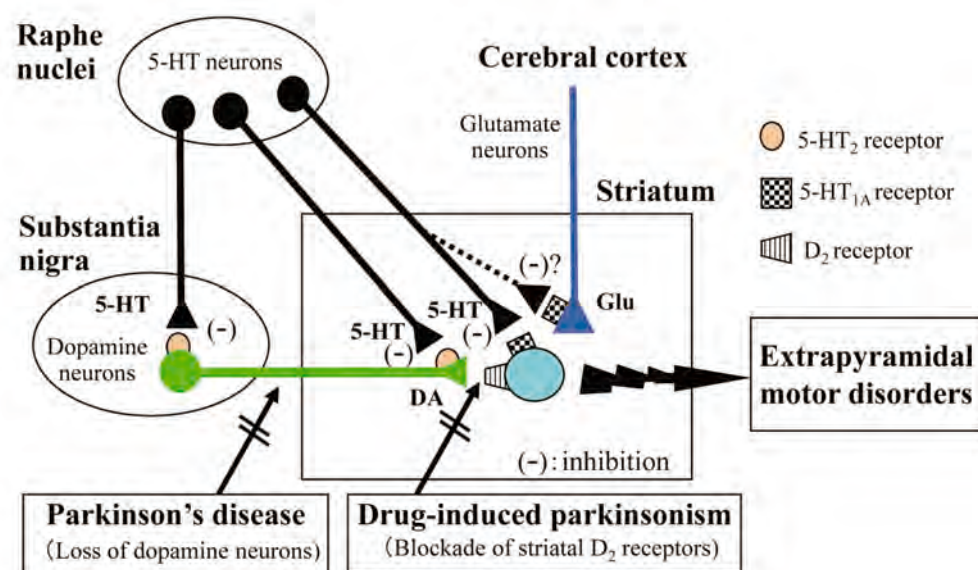


Fig. 8 Schematic diagrams illustrating the serotonergic mechanism in modulating extrapyramidal motor disorders (e.g., Parkinson's disease and drug-induced parkinsonism).

- 3) Alex K.D., Pehek E.A., *Pharmacol. Ther.*, **113**, 296-320 (2007).
- 4) Millan M.J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**, 853-861, (2000)
- 5) Ohno Y., "Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease." ed. by Mizuno Y., Fisher A., Hanin I., Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Y., 2002, pp. 423-428.
- 6) Nomoto M., Iwata S., Kaseda S., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **117**, 111-122 (2001).
- 7) Ohno Y., Ishida-Tokuda K., Ishibashi T., Sakamoto H., Tagashira R., Horisawa T., Yabuuti K., Matsumoto K., Kawabe A., Nakamura M., *Pol. J. Pharmacol.*, **49**, 213-219, (1997).
- 8) Kapur S., Remington G., *Am. J. Psychiat.*, **153**, 466-476 (1996).
- 9) Meltzer H.Y., Li Z., Kaneda Y., Ichikawa J., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **27**, 1159-1172 (2003).
- 10) Wadenberg M.L., Young K.A., Richter J.T., Hicks P.B., *Neuropharmacology*, **38**, 151-156 (1999).
- 11) Neal-Beliveau B.S., Joyce J.N., Lucki I., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **265**, 207-217 (2003).
- 12) Prinssen E.P., Colpaert F.C., Koek W., *Eur. J. Pharmacol.*, **453**, 217-221 (2002).
- 13) Ogawa N., Mizukawa K., Hirose Y., Kajita S., Watanabe Y., *Eur Neurol* **26** (Suppl. 1), 16-23 (1987).
- 14) Ohno Y., Ishida K., Ikeda K., Ishibashi T., Okada K., Nakamura M., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **49**, 19-23 (1994).
- 15) Ohno Y., Shimizu S., Imaki J., Ishihara S., Sofue N., Sasa M., Kawai Y., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **32**, 1302-1307 (2008)
- 16) Ohno Y., Shimizu S., Imaki J., Ishihara S., Sofue N., Sasa M., Kawai Y., *Neuropharmacology*, **55**, 717-723, (2008).
- 17) Ishibashi T., Ohno Y., *Biog. Amines.*, **18**, 329-338 (2004).
- 18) Morgan J.I., *Trends Neurosci.*, **12**, 459-462 (1989)
- 19) Robertson G.S., Matsumura H., Fibiger H.C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1058-1066 (1994).
- 20) Ishibashi T., Ikeda K., Ishida K., Yasui J., Tojima R., Nakamura M., Ohno Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **303**, 247-251 (1996).
- 21) Ishibashi T., Tojima R., Nakamura M., Noguchi H., Ohno Y., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **63**, 535-541 (1999).
- 22) Hussain N., Flumerfelt B.A., Rajakumar N., *Neuroscience*, **102**, 391-399 (2001).
- 23) da Cunha I.C., Lopes A.P., Steffens S.M., Ferraz A., Vargas J.C., de Lima T.C., Marino Neto J., Paschoalini M.A., Faria M.S., *Behav. Brain Res.*, **188**, 91-99 (2008).
- 24) Adams M.R., Brandon E.P., Chartoff E.H., Idzerda R.L., Dorsa D. M., McKnight G.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 12157-12161 (1997).
- 25) Antonelli T., Fuxe K., Tomasini M.C., Bartoszyk G.D., Seyfried C.A., Tanganelli S., *Synapse*, **58**, 193-99 (2005).
- 26) Mignon L., Wolf W.A., *Neuroreport* **16**, 699-703 (2005).

—Reviews—

天然物由来食品・医薬品原料の電子線殺菌処理に関する研究
—電子スピン共鳴による照射処理生薬の検知—

山沖 留美

Studies on Sterilization Technology by Electron Beam Radiation
of Natural Food or Raw Pharmaceutical Material
—Detection of Electron Beam Irradiated Crude Drugs by Electron Spin Resonance—

Rumi YAMAOKI

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 23, 2008; Accepted November 9, 2008)

Natural products such as food and herbal medicine are susceptible to insects and mold. To develop disinfection and sterilization technology, the author applied electron beam (EB) irradiation to spices or crude drugs and used electron spin resonance (ESR) spectroscopy in order to establish a method for detecting irradiated products.

A single line ESR spectrum near $g = 2.005$ was observed in spices and crude drugs. The intensity of the main signal near $g = 2.005$ increased, and sub-signals at ca. 3 mT on either side of the main signal ($g = 2.02$ and 1.99) were observed after EB irradiation. The before and after irradiation radical concentrations were high in herbs. Multicomponent spectra with specific shapes of mono- or disaccharides were observed in irradiated roots drugs. The observed spectrum of a post-irradiation plant sample was approximately similar to the summation of a spectral component derived from the pre-irradiated sample and components derived from post-irradiation of carbohydrates, including cellulose. The time decay of intensity spectral components was well explained by first order kinetics with a variety of rate constants. The sub-signal at near $g = 2.02$ was ascribed to the high-dose response and stable cellulose-derived radical components. It was revealed that the specificity of the ESR spectra derived from these carbohydrates was detectable for 6 months in herbs and for 1 year in spices, barks and roots drugs after 10 kGy EB irradiation. Therefore, it is expected that the evaluation of radical signals derived from carbohydrates will be utilized to judge whether plant foods and pharmaceutical materials have been irradiated.

Key words—radio irradiation; electron spin resonance; crude drug; carbohydrate; radical; kinetics

1. はじめに

天然物由来の食品や医薬品原料において、虫や微生物による汚染は避けられない。そのため、微生物に汚染された食品や医薬品原料は殺滅菌処

理し、衛生学的品質を改善する必要がある。^{1), 2)} γ 線 (^{60}Co , ^{137}Cs), X線 (5 MeV 以下), 電子線 (electron beam, EB; 10 MeV 以下) による放射線照射殺滅菌法は、加熱法に比べて対象物の色調の変化が少なく、香辛料や生薬の精油成分や薬理成分の損失を低

く抑えることのできる有用な処理技術である³⁾。特に、EB 照射では、線量率が高いため、短時間の処理が可能であり、また、照射を電氣的にコントロールできるため、経済性が高い。ただし、EB の物質中の透過力は γ 線などに比べて小さい。したがって、EB 照射による効果的な殺滅菌作用を得るためには、予め、対象物中の線量分布を把握しておくことが重要となる。

さらに、1980 年の国際原子力機関 (The International Atomic Agency, IAEA) / 世界保健機関 (World Health Organization, WHO) / 食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) の合同委員会において、10 kGy 以下の照射食品の健全性の宣言⁴⁾が行われて以降、世界 55 カ国において香辛料・ハーブ類を初めとした食品照射が認可され、その実用照射が始まっている⁵⁾。したがって、照射処理品の市場流通における健全性を保障するため、輸入品が照射処理品であるか、またそれらの照射線量が許容限度値内であるか否かの判別を迅速に行う検知技術の開発は急務である⁶⁾。

そこで、食品や医薬品原料として利用される天然物における EB 殺菌処理技術の開発及び放射線殺菌処理品の検知技術の確立を目的とし、実験検討を行った。黒胡椒とウイキョウをモデル原料として EB 照射の殺菌効果を検討した結果、5 MeV の EB を表面線量が 15 kGy となるように上面照射した場合、充填原料内の深度線量分布は、充填量 0.9 – 1.0 g/cm² において表面線量の約 1.2 倍となる最大値を示し、充填量の増加とともに急激に減少する特性を有すること、その結果、黒胡椒粒 (細菌数; 10⁷ colony forming unit per gram, cfu/g) では、充填量 1.5 g/cm² 以下、吸収線量 12 kGy 以上、さらに、ウイキョウ粒 (細菌数; 10⁵ cfu/g) では、充填量 2.3 g/cm² 以下、吸収線量 3 kGy 以上で生残菌数 10³ cfu/g 以下の殺菌効果が見出した。また、殺菌レベルの EB 照射による精油成分の変化は確認されなかった。

本稿では、EB 照射した香辛料・生薬の有機フリーラジカル特性やラジカル動態を電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) により解析し、放射線殺菌処理品の検知技術としての ESR 法の有用性について詳述する。

2. ESR 法による放射線照射した生薬の検出

殺滅菌目的の放射線照射による被照射物の物理化学的、生物学的変化は極僅かである。放射線照射後、被照射物の組織内に生じた活性種の大半は、極短時間で再結合により消滅する。一方、一部の活性種は被照射物の固相内にトラップされ、比較的長期間安定なフリーラジカルになる場合がある。この固相にトラップされた極微量のフリーラジカルを ESR で同定することにより、照射品を判別できる。特に、ESR 法は、非破壊的な短時間測定が可能であるため、放射線殺滅菌処理した食品や医薬品原料の迅速な検知技術として有望である。EU では、骨付き肉及び魚の骨 (骨由来のラジカル) や、ピスタチオナッツの殻、パプリカ及びベリー類 (セルロース由来ラジカル)、さらに、パパイヤ、マンゴなどの乾燥果物類 (結晶性糖由来ラジカル) を対象とした照射品の検知に ESR 法を採用している⁷⁾⁻⁹⁾。したがって、乾燥植物を原料としている生薬では、それらの主成分は糖質であることより、放射線照射後、ESR による有機成分ラジカルの観測が期待できる。

2.1 植物性生薬の ESR スペクトル特性

葉、樹皮または根を原料とする植物性生薬、ソヨウ (Perillae Herba)、センナ (Sennae Folium)、ケイヒ (Cinnamomi Cortex)、オウバク (Phellodendri Cortex)、ニンジン (Ginseng Radix)、カンゾウ (Glycyrrhizae Radix)、シャクヤク (Paeoniae Radix)、ショウキョウ (Zingiberis Rhizoma) の照射前と、大気雰囲気、25℃で 10

kGy の EB 照射した後の ESR スペクトル特性を Table 1 及び Fig. 1 に示す。照射前の生薬には、g = 2.005 付近に一重線スペクトルが検出され、スピン濃度は 10¹⁵ – 10¹⁶ spins/g のレベルであった。10 kGy 照射後では、シグナル強度は 10¹⁶ – 10¹⁷ spins/g のレベルに増した。原料となる植物部位によりスピン濃度は変動し、葉を原料としているソヨウとセンナでは、照射前と後のいずれのスピン濃度も他の生薬原料に比べて高かった。このような乾燥植物の ESR スペクトルに観察される g = 2.005 付近のシグナルは、放射線照射に限らず、光や熱などにもより増大することが知られており、ポリフェノールを直接的あるいは間接的に酸化する過程で産生されるセミキノンラジカルに^{10), 11)} 帰属されている。つまり、ソヨウなどでは、葉の表皮細胞にアントシアニンなどのポリフェノールが多く分布するため、スピン濃度が高いと考えられる。

一方、EB 照射後のスペクトルには、いずれの生薬原料においても、g = 2.005 付近の中央シグナルの約 3 mT 間隔の両脇 (g ≒ 2.02, g ≒ 1.99) にサブシグナルが観察された。ラジカル成分解析の結果、これらはセルロースのグルコースユニットの C2, C3 位に生じるヒドロキシルアルキルラジカルによるトリプレットシグナルに帰属された。また、セルロース由来のラジカルシグナル強度は吸収線量と相関性を示した。特に、Fig. 1 に示している (拡大図) トリプレットの低磁場側 (g ≒ 2.02) のシグナルは、他成分由来のラジカルシグナルとの重なりが少なく、セルロース由来シグナルの中でも特異性の高いことが判明した。

さらに、ニンジン、シャクヤク、ショウキョウの照射後のスペクトルは、線幅の広い非対称に分裂した形状を呈した。このようなスペクトル特性は、照射した乾燥果物において観察される単糖ま

Table 1 Characteristics of spectra obtained with crude drugs.

Sample	g value		spins g ⁻¹		
	Irradiation	before	10 kGy	before	10 kGy
Perillae Herba		2.0056	2.0057	4.49×10 ¹⁶	3.71×10 ¹⁷
Sennae Folium		2.0041	2.0053	2.29×10 ¹⁶	3.37×10 ¹⁷
Cinnamomi Cortex		2.0049	2.0053	1.56×10 ¹⁶	1.37×10 ¹⁷
Phellodendri Cortex		2.0060	2.0059	1.03×10 ¹⁶	3.45×10 ¹⁷
Ginseng Radix		2.0052	2.0062	2.61×10 ¹⁵	1.73×10 ¹⁶
Glycyrrhizae Radix		2.0059	2.0058	9.53×10 ¹⁵	1.90×10 ¹⁷
Paeoniae Radix		2.0067	2.0060	3.40×10 ¹⁵	8.26×10 ¹⁶
Zingiberis Rhizoma		2.0044	2.0042	3.34×10 ¹⁵	3.45×10 ¹⁶

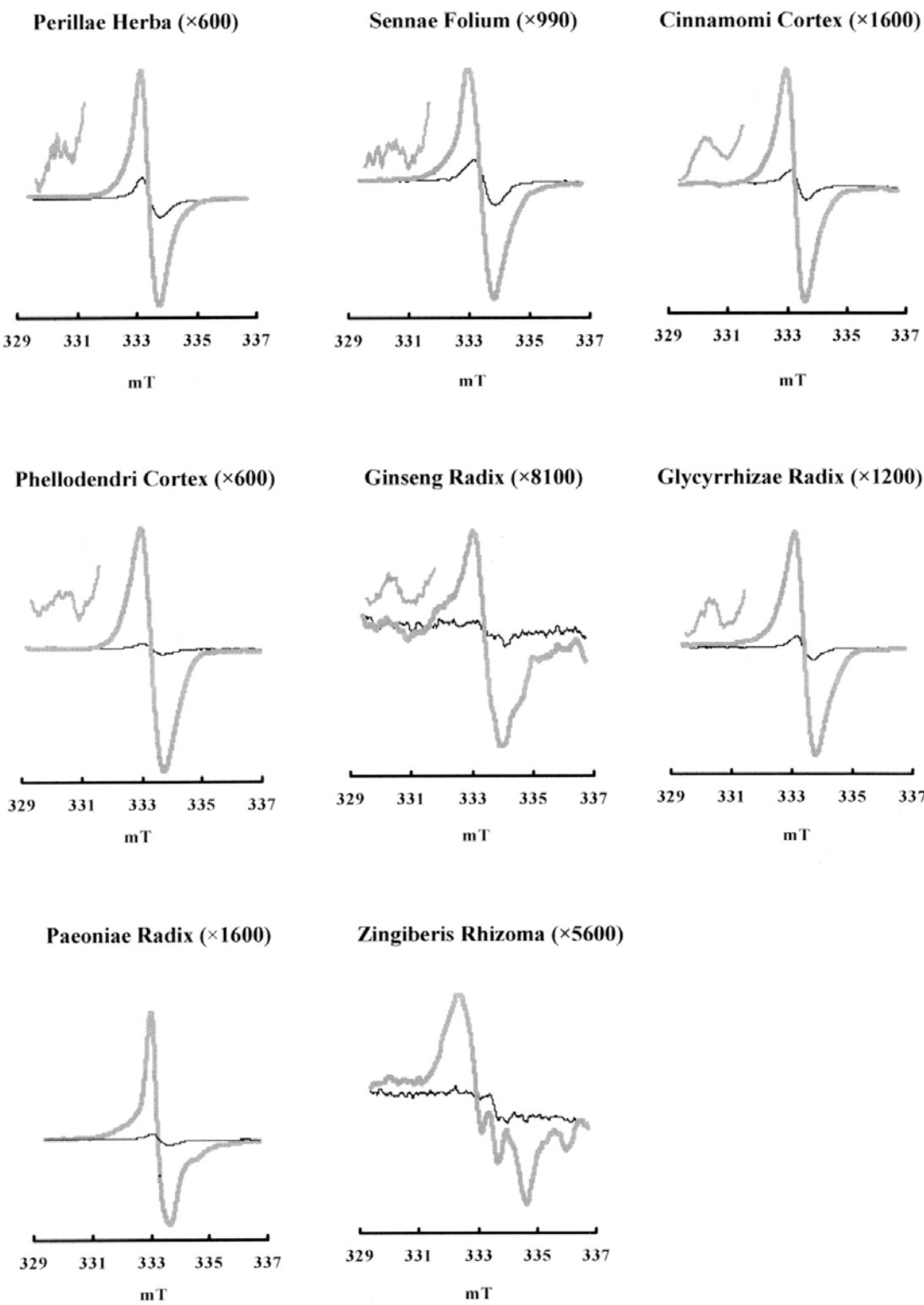


Fig. 1 ESR spectra of crude drugs, un-irradiated (solid line) and irradiated at 10 kGy (bold line) on modulation width 0.2 mT. Inset shows sub-signal ($g \approx 2.02$) on modulation width 1 mT.

たは二糖類由来のラジカルスペクトルに似てい^{11),12)}る. Fig. 2 に EB 照射した単糖・二糖類の ESR スペクトルを, Fig. 3 に EB 照射後の糖類のスピン

濃度を示す. 単糖・二糖類では, EB 照射後に線幅の広い非対称スペクトルが観察され, セルロースのような多糖類よりも単糖・二糖類の放射線感受性の

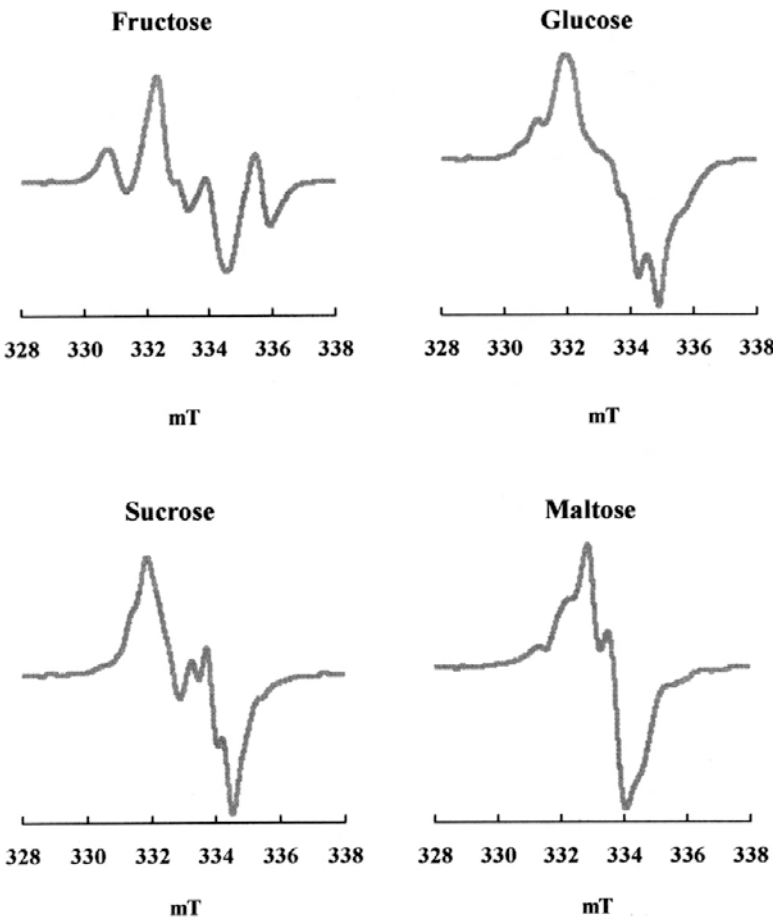


Fig. 2 ESR spectra of mono- and disaccharides after 15 kGy EB irradiation.

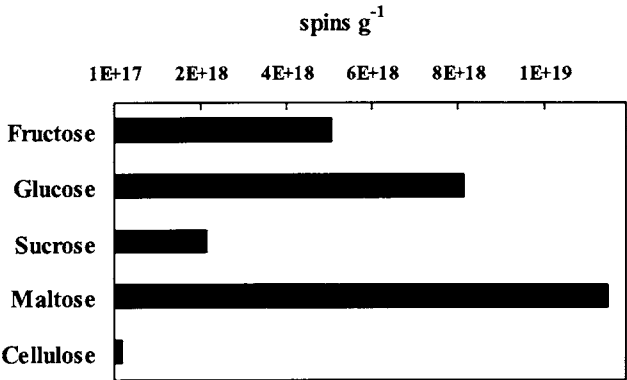


Fig. 3 Spin concentrations of carbohydrates after 5 hr of 15 kGy EB irradiation.

高いことが示唆された。したがって、スクロースやマルトース、フルクトースなどの含有量が高い根などの貯蔵組織を原料とする生薬では、放射線照射後に単糖・二糖類由来ラジカルのスペクトル特性を確認することができる。

2.2 照射生薬の検知可能期間

EB 照射後の生薬を、湿度 $40 \pm 5\%$ 、室温 ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) 保存した場合に観測される ESR スペクトル変

化を Fig. 4 に示す。 $g \approx 2.02$ 付近のセルロース由来シグナルは極微量成分であるが、照射後から長期間観測され、10 kGy 照射したソヨウとセンナでは約 6 ヶ月、その他の生薬では約 1 年間にわたり、シグナルのベースラインからのピーク高さ (S) が未照射生薬の同位置のベースラインのノイズ幅 (N) の 2 倍以上 ($S/N > 2$) の強度で検出された。さらに、Fig. 5 に示すように、シャクヤクとショウキョウで観測された単糖・二糖類特有の非対称

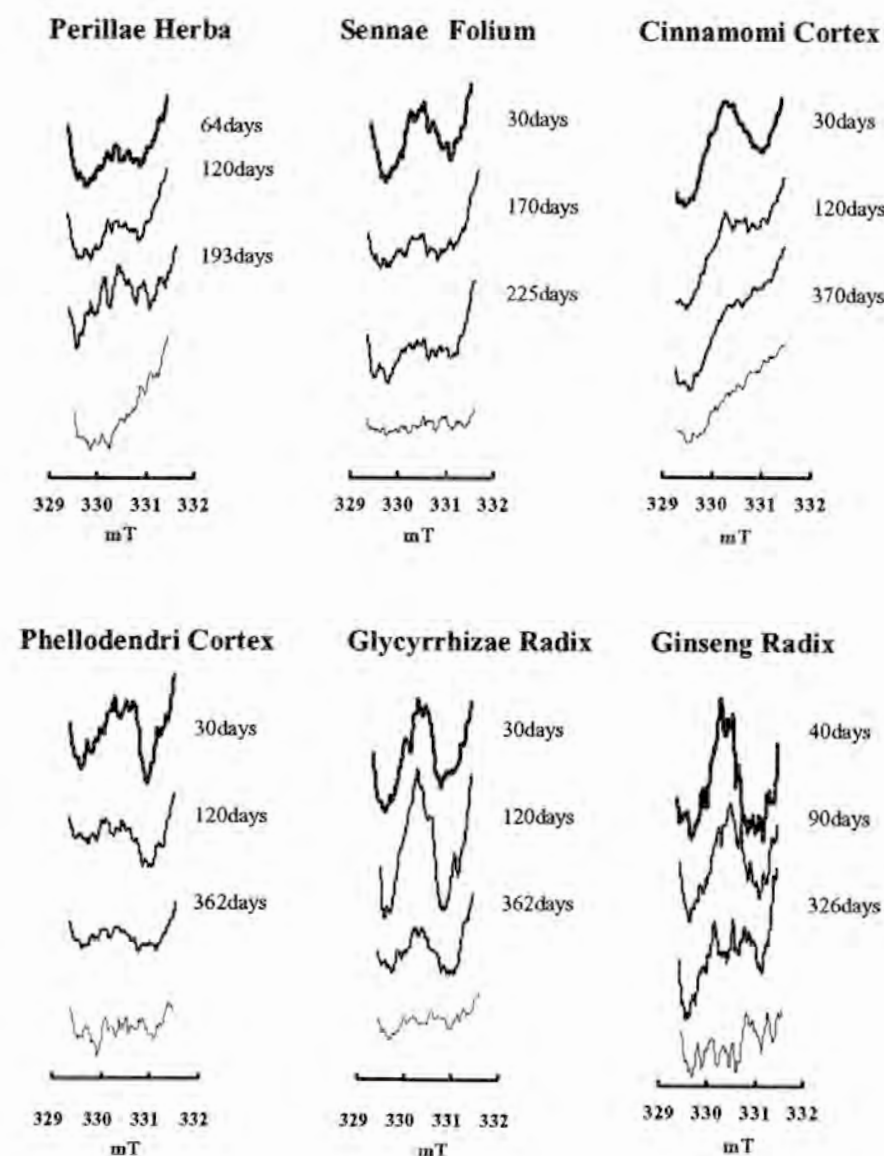


Fig. 4 ESR spectra of sub-signals ($g \approx 2.02$) obtained with crude drugs after 10 kGy irradiation. The dashed lines represent ESR spectra of the drugs before irradiation. (modulation width; 1 mT).

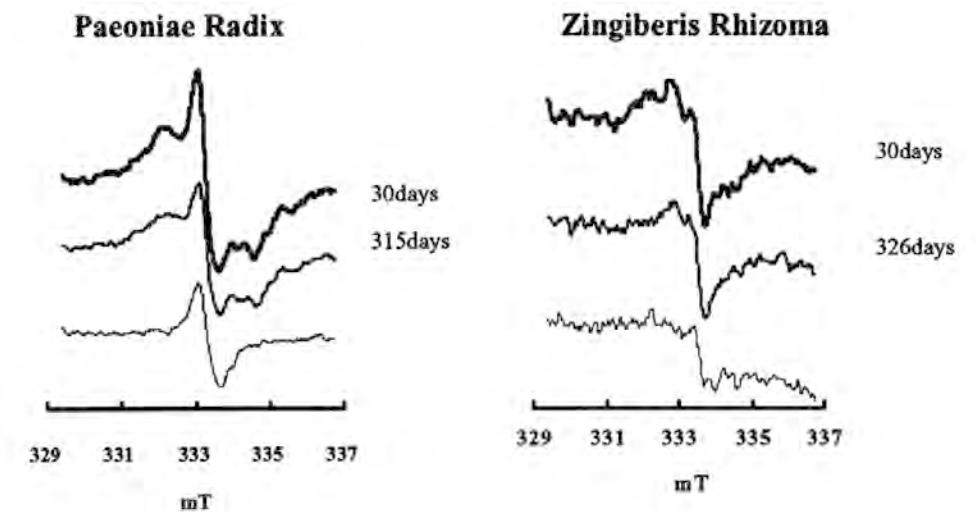


Fig. 5 ESR spectra of Paeoniae Radix and Zingiberis Rhizoma after 10 kGy irradiation. The dashed lines represent ESR spectra before irradiation.

な分裂シグナルは、照射から約 1 年後においても、それらのスペクトル特性を確認できた。現在、食品照射認可国の大半は、香辛料類の殺菌目的における最大吸収線量を $10 - 30 \text{ kGy}$ と定めている。⁵⁾したがって、これらの事実は、セルロース及び単糖・二糖類などの糖質由来ラジカルシグナルが、保存期間を含めた長期間において、放射線殺菌植物性生薬を判別する指標になり得ることを明示している。

2.3 有機ラジカルの減衰挙動

Fig. 6 に照射生薬の有機ラジカル動態を示す。照射後の有機ラジカルシグナル強度は、初期時の減少率が大きく、照射後 1 日以内に、その $30 - 40\%$ が減弱した。その後、次第に減衰速度は遅くなり、約 2 ヶ月以降では、定常状態に近づいた。このような有機ラジカルの減衰挙動は、トラップ準位が一種類しかない単純な一次反応 ($I(t) = I_0 e^{-at}$) で近似することはできず、複数の準位のトラップが連続分布する場合の近似式 ($I(t) = I_0(1 + \gamma t)^{-1}$) に

よく一致した。この n 次近似により、アントシアニンを含有しているソヨウでは、照射後の数日間内の有機ラジカルシグナルの減衰率が大きく、一方、スクロース含有量の高いニンジン、カンゾウ、シャクヤクでは、有機ラジカルシグナルの減衰率が他の生薬よりも小さい傾向にあることが数値化された。つまり、生薬原料毎に異なる有機ラジカルの減衰挙動は、植物組織成分と関連しており、短期的には植物組織中のポリフェノールに由来するラジカル、長期的には糖類含有量や植物組織での糖類の結晶状態による寄与が大きいと考えられ、現在、さらなる解析を進めている。EU などで統一化されている照射食品の検知技術は、いずれも照射済原料を判別する定性法であり、照射線量を推定する定量技術は確立されていない。¹⁴⁾したがって、本法により、例えば、植物成分含有量と有機ラジカルシグナル動態に関連性を見出すことが出来れば、照射線量の定量化に応用できる。

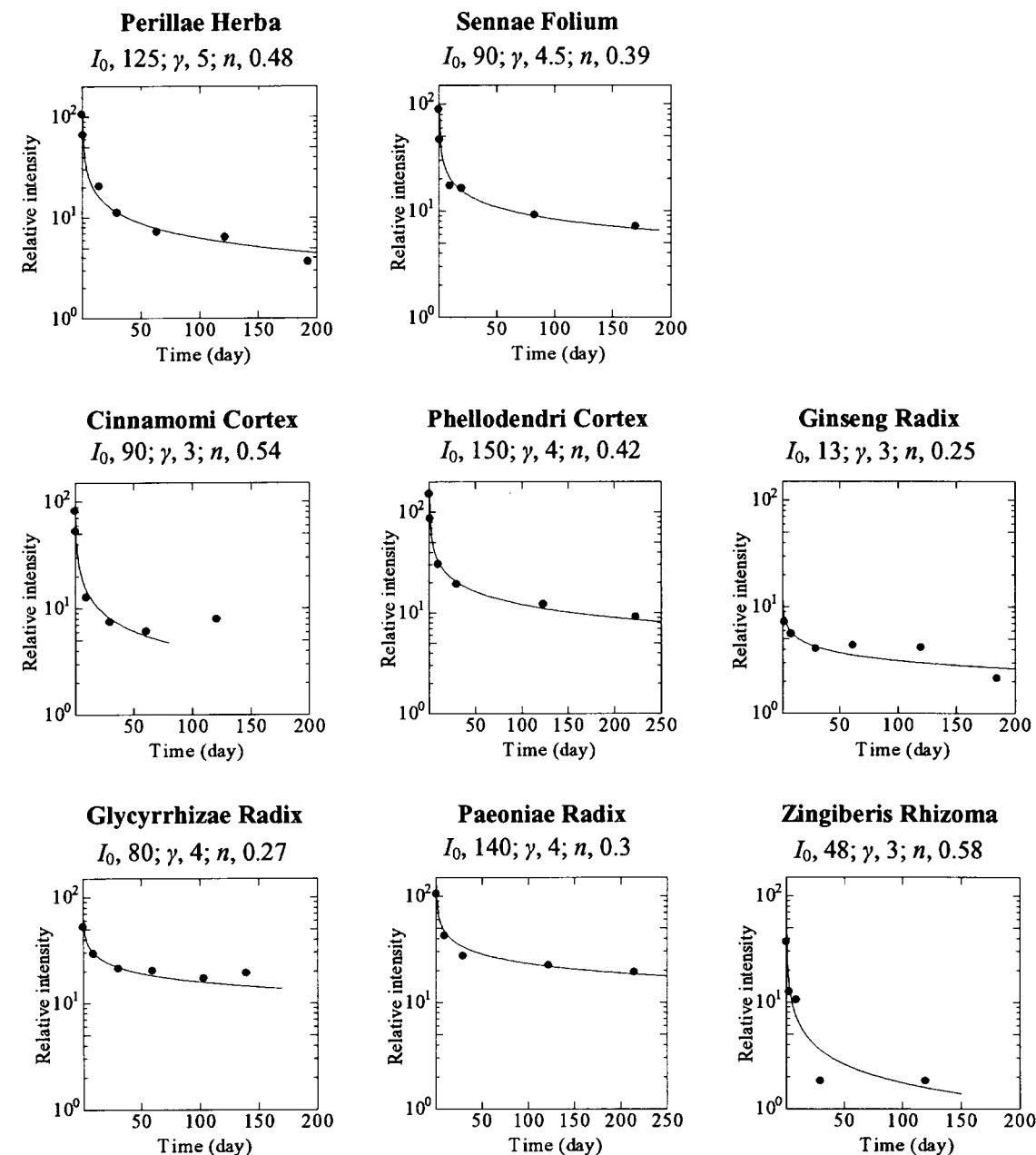


Fig. 6 Time dependence of total intensity of ESR spectra (from $g = 2.031$ to $g = 1.979$) amplitude obtained for irradiated crude drugs (10 kGy). The solid lines represent simulated plots ($I = I_0 (1 + \gamma(t-0.2))^{-\gamma}$). The ESR measurement were performed after 5 hr of EB irradiation ($t \geq 0.2$).

3. まとめ

EB照射した植物性生薬のESRスペクトルをラジカル成分解析し、セルロース ($g \approx 2.02$) 及び単糖・二糖類などの糖質由来の有機ラジカル検知法が、非常に有用性の高い放射線殺菌処理品の検知技術であることを明らかにした。今後、照射香辛料や生薬を対象とした有機ラジカル検知法の公定化に向けて、感度や再現性の評価、さらに、有機ラジカル測定に特化した安価なESR装置とスペクトル解析ソフトの開発が重要である。

謝辞 本研究にあたり、終始、御指導御鞭撻を賜りました、新潟大学自然科学系材料生産システム系列(工学部)太田雅壽准教授、ならびに、大阪薬科大学 木村捷二郎名誉教授に深く感謝致します。種々のご教示を頂きました、新潟大学自然科学系 田口洋治教授、安田守宏教授、今泉洋教授、古市尚高准教授、また、大阪薬科大学 栗原拓史前学長、三野芳紀教授のご厚意に感謝致します。試料をご提供頂きました、小林桂株式会社、クラシエ製薬株式会社、EB照射して頂きました、日本電子照射サービス株式会社 青木和世様、青木研二様、微生物試験をご教授頂きました、社団法人日本アイソトープ協会甲賀研究所 越川富比古博士に御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご協力頂きました、大阪薬科大学 応用放射化学研究室 卒業生の皆様に深く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Food Sanitation Law, "Standards for Food, Food Additives," Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, 1959.
- 2) The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition, "Microbial Attributes of Nonsterile Pharmaceutical Products," Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, 2007.

- 3) Ando, S., Taniyama, T., Fukuda, Y., Kitagawa, N., Mirin, Y., Ishida, M., Kawakatu, Y., Hayashi, T., *Nat. Med.*, **53**, 283–290 (1999).
- 4) Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, "Wholesomeness of Irradiated Food, Technical report series 659," WHO, Geneva, 1981.
- 5) Joint FAO/IAEA programme, "Food and Environmental Protection, Food irradiation clearance database," IAEA, Vienna, 2007.
- 6) Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Department of Food Sanitation, "Inspection and Safety Division, No. 0706003," Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, 2007.
- 7) EN1786, "Foodstuffs, Detection of irradiated food containing bone, Method by ESR spectroscopy," European Committee for Standardization, Brussels, 1996.
- 8) EN1787, "Foodstuffs, Detection of irradiated food containing cellulose, Method by ESR spectroscopy," European Committee for Standardization, Brussels, 1996.
- 9) EN13708, "Foodstuffs, Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy," European Committee for Standardization, Brussels, 2001.
- 10) Dismukes, G.C., McGuire, A., Blankenship, R., Sauer, K., *Biophys. J.*, **21**, 239–256 (1978).
- 11) Yang, G.C., Mossoba, M.M., Merin, U., Rosenthal, I., *J. Food Qual.*, **10**, 287–294 (1987).
- 12) Esteves, M.P., Andrade, M.E., Empis, J., *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 737–742 (1999).
- 13) Phosphor Research Society, "Phosphor Handbook," Ohmsha, Tokyo, 1991, p.68.
- 14) Food safety: <http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/irradiation/anal_methods_en.htm>, Activities of the European Union, June, 2007.

虚血性急性腎不全における性差発現に関する研究

高山 淳二^{*,a}, 高岡 昌徳^c, 松村 靖夫^b

Studies on the Sex Difference in Ischemic Renal Failure

Junji TAKAYAMA^a, Masanori TAKAOKA^c, and Yasuo MATSUMURA^b

^a*Translational Research, Ltd., 2438, Miyanoura, Kagoshima 891-1394, Japan*

^{b,c}*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan*

(Received September 26, 2008; Accepted November 10, 2008)

It is known that female rats are more resistant than male rats to ischemic acute renal failure (ARF). To elucidate the meaning of this sex difference in ischemic ARF, we first searched for proteins, using the proteomic technique, which show sex difference by a change of expression after ischemia/reperfusion in rat kidneys. Ischemic ARF was induced by 45-min ischemia followed by reperfusion. Increased or decreased protein spots were detected in the post-ischemic kidney, by means of two-dimensional gel electrophoresis, 2 h after reperfusion, and at this point there were no significant alterations in the renal function parameters of both sexes. The quantitative change in the detected proteins tended to be much greater in males than in females. Several significant ($P < 0.01$) up- or down-regulated (more than 1.5-fold) proteins, in males only, were identified, respectively, as ezrin, glucose-regulated protein 78, heat shock protein 70 and protein disulfide isomerase A3 precursor, are which are known that the expression or post-translational modification is regulated by intracellular ATP content. In addition, F_1F_0 -ATPase β subunit and meprin α subunit were identified in significant up-regulated protein spots in males, but not in females. We next examined whether an F_1F_0 -ATPase inhibitor oligomycin and a meprin inhibitor actinonin would overcome the ischemia/reperfusion-induced renal injury in male and female rats. At 24 h after reperfusion, renal function and histology of both males and females showed significant deterioration, although the degree of both renal dysfunction and histological damage was much more severe in males than in females. Pre-ischemic treatment with oligomycin (0.5 mg/kg, i.v.) or actinonin (10, 30 mg/kg, i.v.) attenuated the ischemia/reperfusion-induced renal injury in male rats, but failed to improve the renal injury in female rats. In contrast, female rats, as well as male rats, were protected against ischemia/reperfusion-induced renal injury when verapamil (1 mg/kg, i.v.) was administered. These results indicate that the renoprotective effect of oligomycin and actinonin is male-specific, thereby suggesting that F_1F_0 -ATPase and meprin are involved in the sex difference in terms of exacerbation of ischemic renal injury in male rats. The possibility that F_1F_0 -ATPase and meprin are key factors in the sex difference in the pathogenesis of ischemic ARF warrants further attention.

Key words—acute renal failure; sex difference; proteomic analysis; meprin; F_1F_0 -ATPase

^{*}, ^a トランスレーショナル リサーチ株式会社, 〒 891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438, e-mail: takayama-junji@snbl.co.jp

^b 大阪薬科大学 病態分子薬理学研究室

^c 大阪薬科大学 生体機能解析学研究室

本論考は、高山淳二の博士論文をもとに再構成したものである。

虚血性急性腎不全は、出血や体液の喪失、ショックによる循環不全あるいは腎移植手術時にしばしば認められる。好氣的代謝を営む組織の機能は、間断的な血流が運ぶ酸素と栄養素により支えられているが、虚血状態ではミトコンドリアの酸化的リン酸化によるATP産生が低下することから、腎臓においては、老廃物の排泄、体液電解質のバランスおよびホルモンの分泌などが機能不全に陥る。¹⁾

最近の疫学調査では、急性腎不全による死亡率は女性より男性で2倍以上高いことが示されており、²⁾性別は急性腎不全による死亡率の独立した予測因子の一つであることが見い出されている。また、虚血性急性腎不全モデル動物でみられる腎障害は雌より雄で極めて重篤であり、³⁾本病態の発症に雌雄差のあることが知られている。しかしながら、本病態における性差発現のメカニズムには未だ不明な点が残されている。

近年飛躍的に進歩したプロテオーム解析技術は、種々の病態で特異的に発現変動するタンパク質を同定し、医薬品開発のターゲットを迅速に発見することを可能にする。すなわち、本解析技術は、多く

の細胞生物学的現象や各種疾患動物モデルにおいて、タンパク質の発現変動を体系的かつ網羅的に解析することができるため、それぞれの疾患とその治療に関連した因子を絞り込み、それらを標的とする医薬品の探索ができるものと期待されている。⁴⁾

本研究では、虚血性急性腎不全で認められる性差発現において、腎臓で発現するタンパク質の雌雄差を網羅的に解析し、さらに、この解析結果に基づいた薬理学的アプローチにより、本病態の性差発現とその原因候補タンパク質との関連性について検討を行った。

1. 虚血性急性腎不全の性差発現に関するタンパク質の解析

実験動物として、8週齢の雄性および雌性Sprague-Dawley系ラットを用いた。右腎摘除2週間後に左腎を45分間虚血状態にし、その後再灌流処置を施すことにより、虚血性急性腎不全モデルを作製した。Figure 1に示すように、血中尿

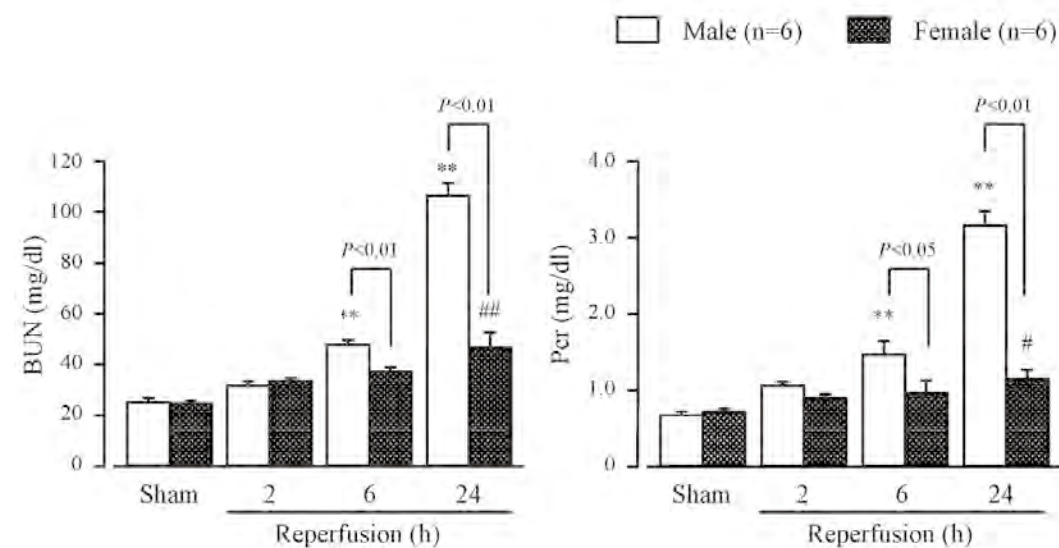


Figure 1. Time course of blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinin (Pcr) in male and female rats subjected to 45-min ischemia. Each column and bar represents the mean $\pm$ S.E.M. ** $P < 0.01$, compared with sham-operated male rats. * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with sham-operated female rats.

素窒素濃度 (BUN) および血漿クレアチニン濃度 (Pcr) は、雌雄ラットともに、再灌流2時間後において有意な変化は認められないものの、再灌流の時間経過と共に上昇し、再灌流24時間後には有意な上昇を示した。さらに、再灌流6および24時間後には、これらの腎機能パラメーターが雌性ラットに比し雄性ラットで有意な高値を示し、虚血再灌流処置によって引き起こされる腎機

能低下の程度に雌雄差が認められた。

腎機能低下が認められない虚血再灌流処置2時間後の腎臓について、二次元ゲル電気泳動法によりタンパク質を分離し (Figure 2)、雌雄における発現変動の差異を比較した。その結果、Figure 3に示すように、虚血再灌流処置により、雌雄ラットの腎臓で同程度の増減を示すタンパク質 (破線周囲) も数多くあるが、実線で示されるように著

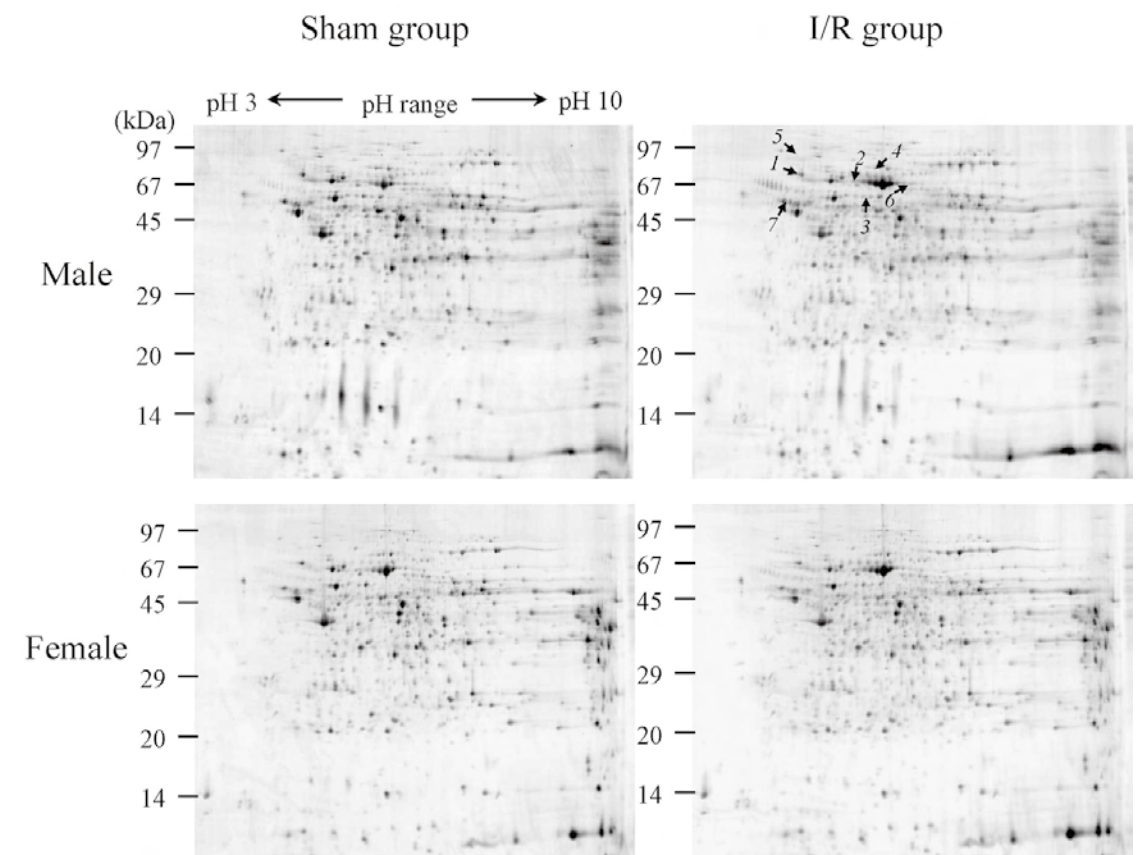


Figure 2. Two-dimensional gel images of renal proteins from sham-operated male and female rats or I/R-treated male and female rats. Proteins labeled with CyDye DIGE Fluor dye were separated by two-dimensional gel electrophoresis on basis of differential isoelectric point (x-axis) and molecular weights (y-axis). The spot numbers correspond to the numbers described in the legend of Figure 3. I/R, ischemia/reperfusion.

明な増減を示すタンパク質の種類が雄性ラットで多い傾向を認めた。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法によりタンパク質の解析を行った結果, glucose regulated protein 78 (Figure 3; No. 1), heat shock protein 70 (Figure 3; No. 2), protein disulfide-isomerase A3 precursor (Figure 3; No. 3) および ezrin (Figure 3; No. 4) など, 細胞内 ATP 濃度の変化によってその発現や翻訳後修飾が制御されることの知られているタンパク質が, 虚血再灌流処置の初期に雄性ラットの腎臓で顕著に増加または減少することが明らかになった。さらに, 雄性ラットで著明な増加を示すタンパク質の中に, ATP の合成と分解に関与する F_1F_0 -ATPase の β サブユニット (Figure 3; No. 6 および 7) やタンパク分解酵素である meprin の α サブユニット (Figure

3; No. 5) が同定された。以上より, 虚血性急性腎不全における性差発現の一因として, F_1F_0 -ATPase および meprin が関与する可能性が示唆された。

2. 腎虚血再灌流障害に及ぼす F_1F_0 -ATPase 阻害薬 oligomycin の影響

第 1 編のプロテオーム解析の結果より, 虚血再灌流初期に腎臓で顕著に増減するタンパク質の種類は, 雌性ラットと比較して, 雄性ラットで多いことが示された。また, 雄性ラットで顕著な増減を示すタンパク質の中に, 細胞内 ATP 濃度の変化によってその発現や翻訳後修飾が制御されるものが認められた。さらに, ミトコンドリア F_1F_0 -ATPase の β サブユニットが腎虚血再灌流処置に

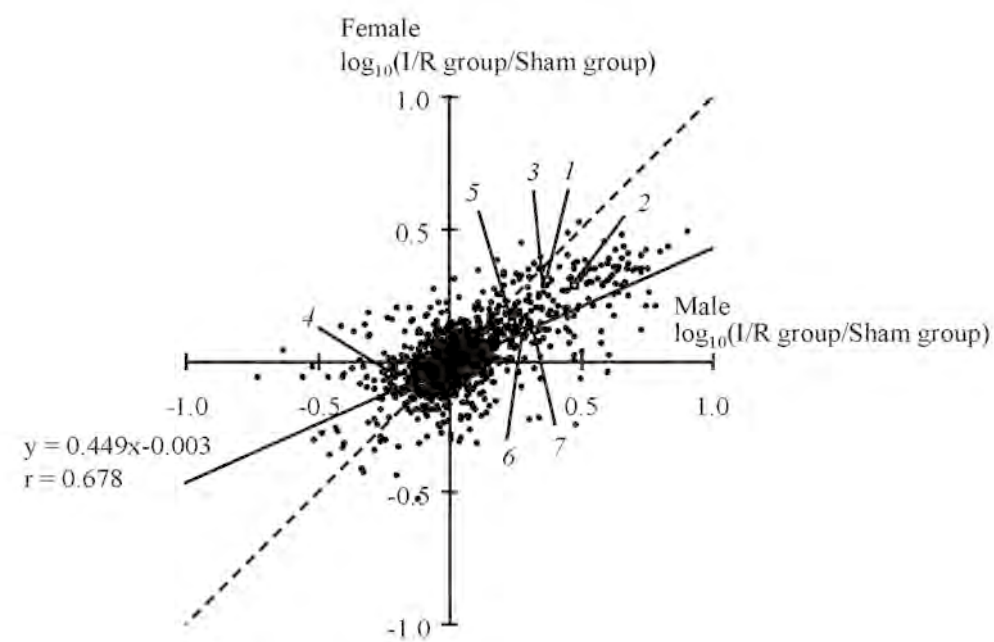


Figure 3. The profile of a change ratio in proteins gel spots of male and female rat kidneys after reperfusion. These gel spots were obtained on two-dimensional gel electrophoresis in kidneys of sham-operated rats (Sham group) and I/R-treated rats 2 h after reperfusion (I/R group). Values were expressed as logarithm of the volume ratio (I/R group/Sham group). Several proteins were identified as glucose regulated protein 78 (spot No. 1), heat shock protein 70 (spot No. 2), protein disulfide isomerase A3 precursor (spot No. 3), ezrin (spot No. 4), meprin α subunit (spot No. 5) and F_1F_0 -ATPase β subunit, (spot No. 6, 7). The numbers correspond to the spot numbers in Figure 2. I/R, ischemia/reperfusion.

よって雄性特異的に増加するタンパク質の一つとして同定された。 F_1F_0 -ATPase は, ミトコンドリア内膜に存在し, 酸素が十分に供給されている状態では電気化学ポテンシャル勾配を利用して ATP を合成している。しかしながら, ミトコンドリアの電位勾配が破綻する酸素欠乏状態では, F_1F_0 -ATPase は ATP の合成から加水分解へとその役割を切り替える。⁵⁾ これまでに, F_1F_0 -ATPase 阻害薬である oligomycin の処置により心筋虚血による ATP 枯渇が軽減することから, 虚血による

ATP 枯渇の一部に F_1F_0 -ATPase を介する ATP 加水分解の関与が示唆されている。⁶⁾ そこで本章では, 虚血性急性腎不全の性差発現における F_1F_0 -ATPase の役割を調べる目的で, 腎虚血再灌流障害に及ぼす oligomycin の影響について雌雄両ラットを用いて検討した。

Figure 4 に示すように, 虚血再灌流処置 24 時間後の雄性および雌性ラットでは, それぞれの虚血再灌流処置を施していない sham ラットと比較して, BUN および Pcr の有意な上昇が認められ, 腎髄質

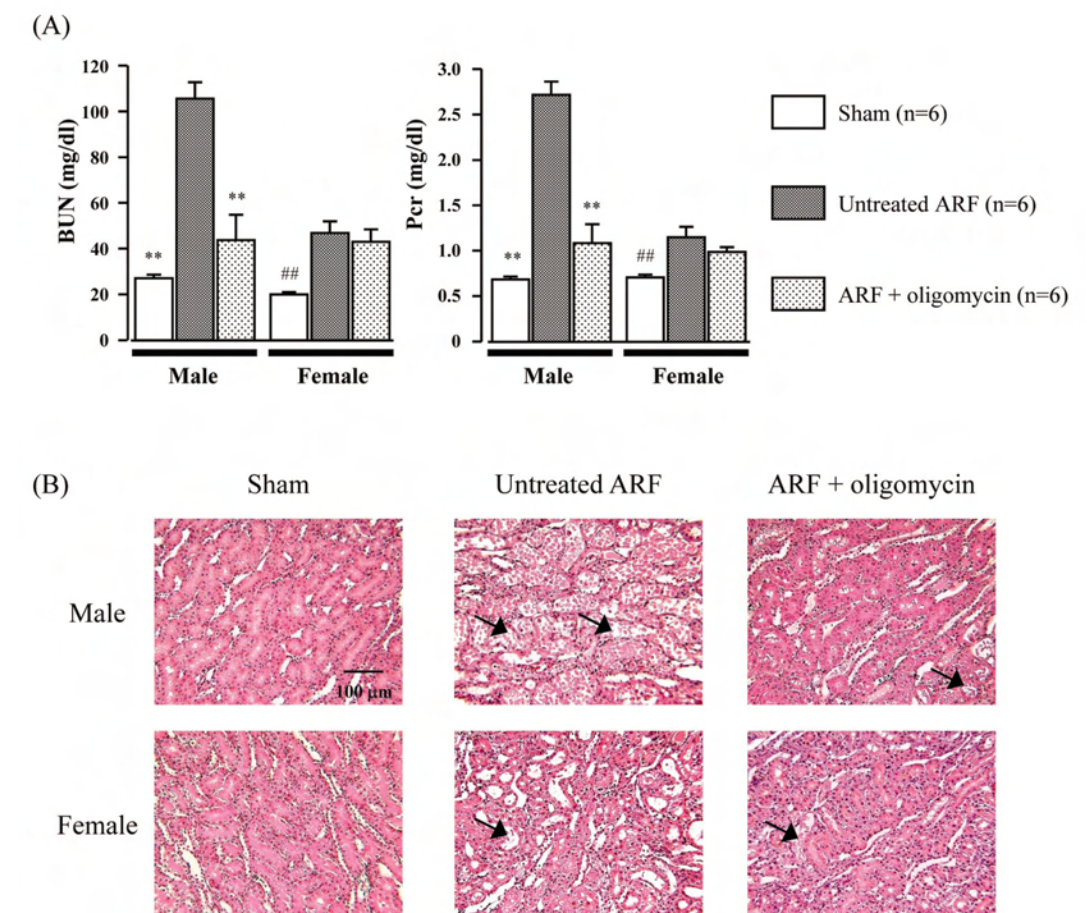


Figure 4. Effects of oligomycin on blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine (Pcr) at 24 h after reperfusion (A). Each column and bar represents the mean $\pm$ S.E.M. $**P<0.01$, compared with untreated ARF male rats. $^{##}P<0.01$, compared with untreated ARF female rats. Light microscopy of the outer zone outer stripe of medulla of the kidney of ARF male and female rats untreated and treated with oligomycin at 24 h after reperfusion, and sham-operated male and female rats (B). Arrows indicate tubular necrosis (hematoxylin and eosin staining). Oligomycin (0.5 mg/kg) or vehicle was given intravenously 5 min before ischemia. ARF, acute renal failure.

外層外帯において尿細管壊死も観察された。また、これらの腎機能低下および腎組織障害は雌性ラットと比較して雄性ラットでより重篤であった (BUN, Pcr; $P<0.01$)。oligomycin (0.5 mg/kg, i.v.) の虚血 5 分前投与は、虚血再灌流処置 24 時間後に認められる腎機能低下および腎組織障害に対して、雄性ラットでは有意かつ顕著に改善効果を示したが、雌性ラットには影響を及ぼさなかった。次に、雄性ラットの腎虚血再灌流障害に対する oligomycin の改善効果を調べる目的で、腎虚血による ATP 枯渇に及ぼす oligomycin の影響を検討した。雄性およ

び雌性ラットともに、腎組織中の ATP 含量は虚血処置後から急速に低下し、再灌流処置後には緩やかな回復を示したが、虚血 10 分後までの ATP 含量は雌より雄で有意な低値を示した (Figure 5A)。また、oligomycin (0.5 mg/kg) の虚血前処置によって、虚血 5 および 10 分後の腎組織中 ATP 含量は、雄性ラットでは有意な上昇を示したが、雌性ラットでは影響されなかった (Figure 5B)。すなわち、虚血による腎障害や腎 ATP 枯渇に対する oligomycin の抑制効果は、雄性ラットに対して特異的であることが判明した。

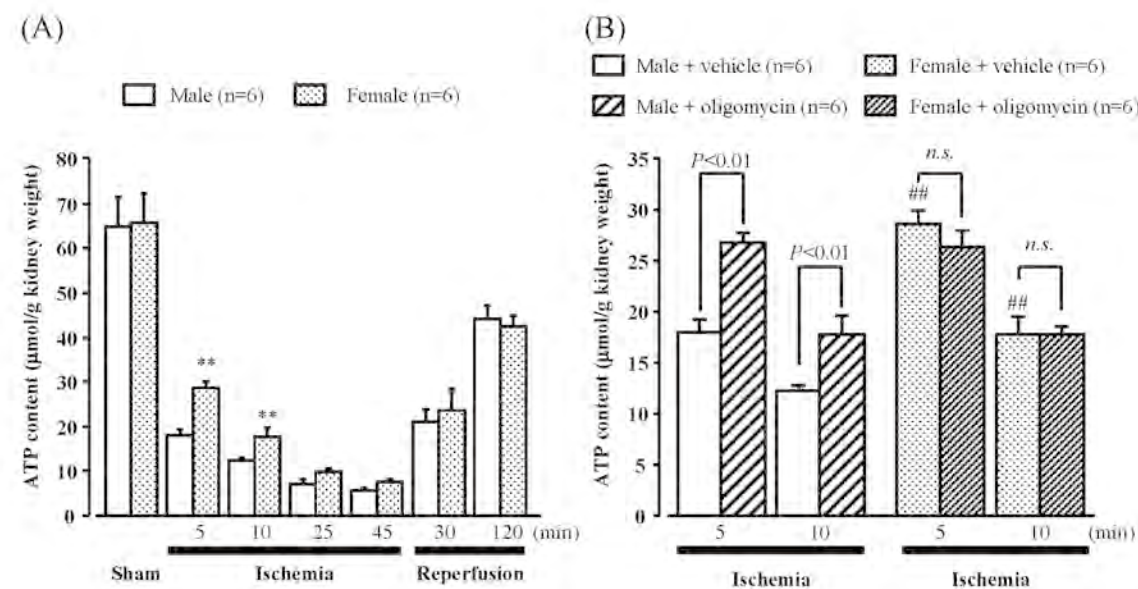


Figure 5. Time course of renal ATP content during ischemia/reperfusion in male and female rats (A), and effect of oligomycin on renal ATP depletion during ischemia (B). Oligomycin (0.5 mg/kg) or vehicle was given intravenously 5 min before ischemia. Each column and bar represents the mean $\pm$ S.E.M. ** $P<0.01$, compared with male rats at the same point. ## $P<0.01$, compared with vehicle-treated male rats at the same time point.

3. 腎虚血再灌流障害に及ぼす meprin 阻害薬 actinonin の影響

第 1 編のプロテオーム解析の結果より、腎虚血再灌流初期に meprin の α サブユニットが雄性ラットの腎臓で有意な増加を示すことが明らかになった。meprin は、腎近位尿細管細胞の刷子縁膜に存在するタンパク分解酵素の一種であり、細胞外マトリックスの構成成分である collagen IV、および nidogenなどを基質とする。⁷⁾ また、雄性ラットの腎臓に虚血再灌流処置を施すと、尿細管の laminin が分解されることや、laminin の分解に関わる酵素として meprin が同定されている。⁸⁾ さらに、meprin の α サブユニットが遺伝的に欠損している系統のマウスでは、 α サブユニットの発現が正常であるマウスに比べ、腎虚血再灌流障害が

軽度であることが示されている。⁹⁾ これらの知見は meprin が腎虚血再灌流障害の病態発症に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。そこで本章では、虚血性急性腎不全の性差発現における meprin の役割を調べる目的で、meprin 阻害薬である actinonin の腎虚血再灌流障害に及ぼす影響について雌雄両ラットを用いて比較検討した。さらに、雄性ラットの虚血性腎障害に対して保護効果を有することが知られているカルシウム拮抗薬 verapamil の雌雄ラットに対する効果と比較した。

Figure 6 に示すように、腎虚血再灌流処置 24 時間後の雄性および雌性ラットでは、それぞれの虚血再灌流処置を施していない sham ラットと比較して、BUN および Pcr の有意な上昇が認められた。また、これらの腎機能低下

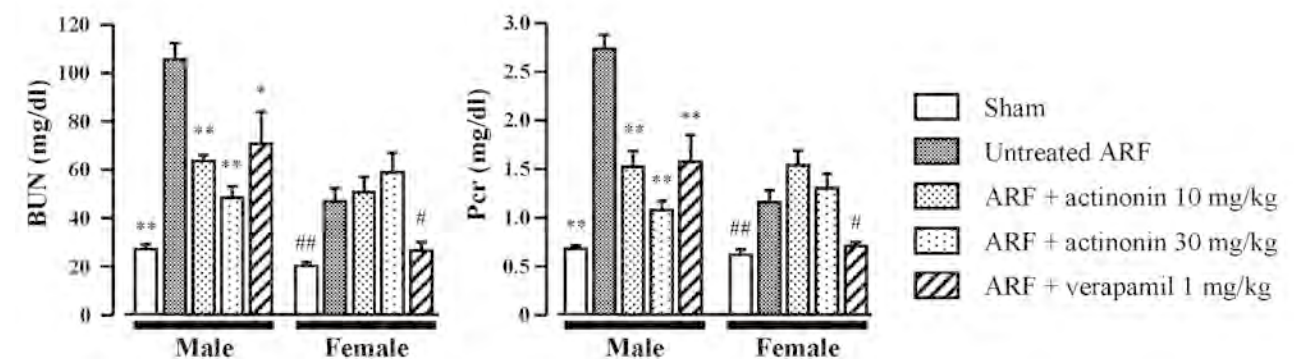


Figure 6. Effects of actinonin or verapamil on blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine (Pcr) at 24 h after reperfusion. Actinonin or verapamil was given intravenously 5 min before ischemia. Each column and bar represents the mean $\pm$ S.E.M. (n=6, except for 10 mg/kg actinonin group; n=3). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with untreated ARF male rats. # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with untreated ARF female rats. ARF, acute renal failure.

は雌性ラットと比較して雄性ラットでより重篤であった ($P<0.01$)。雄性ラットに actinonin (10, 30 mg/kg, i.v.) を虚血 5 分前に投与した場合、虚血再灌流処置による腎機能低下に対して用量依存的な有意な改善効果を示した。しかし、雌性ラットでは、高用量の actinonin (30 mg/kg) を投与しても、虚血再灌流処置による腎機能の悪化は影響されなかった。一方、verapamil (1 mg/kg, i.v.) の虚血前投与は、雄性ラットの虚血再灌流による腎機能の低下を有意に抑制し、さらに、雌性ラットに対しても保護効果を示した。

虚血再灌流処置 24 時間後の雄性ラットの腎組織を光学顕微鏡により観察したところ、腎髄質外層外帯における尿細管壊死の障害像が認められた

(Figure 7)。雌性ラットに虚血再灌流処置を施した場合にも腎組織障害は観察されたが、雄性ラットと比較して部分的なものであった。雄性ラットに actinonin を 30 mg/kg の用量で虚血前投与すると、虚血再灌流障処置による腎組織病変の形成は抑制されたが、雌性ラットに同用量の actinonin を投与しても、腎組織障害に影響を及ぼさなかった。一方、verapamil (1 mg/kg) の虚血前投与は、雄性および雌性ラットの腎組織障害に対して保護効果を示した。これらの結果より、verapamil は雌雄両ラットの虚血再灌流処置による腎障害を保護するが、一方の actinonin は雄性ラットの腎虚血再灌流障害に対して特異的に改善効果を発揮することが判明した。

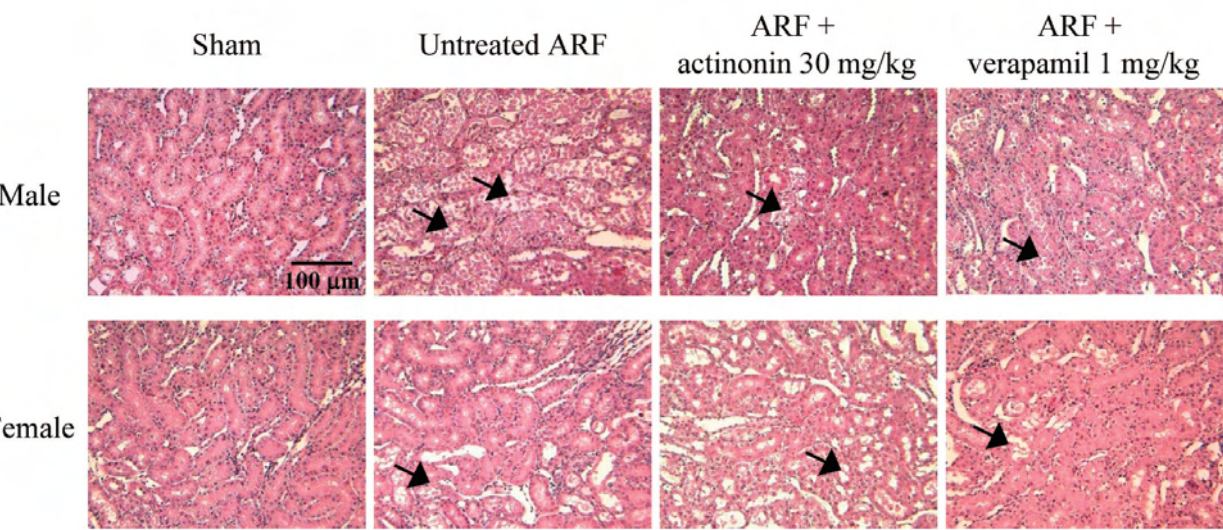


Figure 7. Light microscopy of the outer zone outer strip of medulla of the kidney of ARF male and female rats untreated and treated with actinonin (30 mg/kg) or verapamil (1 mg/kg) at 24 h after reperfusion, and sham-operated male and female rats. Actinonin or verapamil was given intravenously 5 min before ischemia. Arrows indicate tubular necrosis (hematoxylin and eosin staining). ARF, acute renal failure.

結語

腎虚血再灌流初期に F_1F_0 -ATPase β サブユニットや meprin α サブユニットのタンパク質発現が雄性ラットでのみ有意に増加すること、また、 F_1F_0 -ATPase 阻害薬の oligomycin あるいは meprin 阻害薬の actinonin が雄性ラットの腎虚血再灌流障害を顕著に抑制したことから、腎虚血再灌流障害の発症・進展過程において、 F_1F_0 -ATPase β サブユニットや meprin α サブユニットの発現増加とそれに伴う酵素活性の上昇が雌雄で異なり、このことが虚血性急性腎不全における性差発現に関与していることが示唆された。以上、 F_1F_0 -ATPase および meprin が本病態の性差発現に関わることを明らかにした。

なお、本研究は大阪薬科大学の実験動物委員会の承認を得て実施されたものである。

REFERENCES

1) Hishida A., *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, **44**, 94-101 (2002).
2) Mehta R.L., Pascual M.T., Gruta C.G., Zhuang S., Chertow G.M., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 1350-1357 (2002).
3) Park K.M., Kim J.I., Ahn Y., Bonventre A.J., Bonventre J.V., *J. Biol. Chem.*, **279**, 52282-52292 (2004).
4) Cunningham M.J., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **44**, 291-300 (2000).
5) Solaini G., Harris D.A., *Biochem. J.*, **390**, 377-394 (2005).
6) Jennings R.B., Reimer K.A., Steenbergen C., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **23**, 1383-1395 (1991).
7) Bond J.S., Matters G.L., Banerjee S., Duscheck R.E., *FEBS Lett.*, **579**, 3317-3322 (2005).
8) Kaushal G.P., Walker P.D., Shah S.V., *J. Cell Biol.*, **126**, 1319-1327, (1994).

9) Trachtman H., Valderrama E., Dietrich J.M., Bond J.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 498-505 (1995).
10) Burke T.J., Arnold P.E., Gordon J.A., Bulger R.E., Dobyan D.C., Schrier R.W., *J. Clin. Invest.*, **74**, 1830-1841 (1984).

—Reviews—

虚血性急性腎不全の発症における腎交感神経系の役割に関する研究藤井 俊秀^{*,a}, 高岡 昌徳^b, 松村 靖夫^c**Studies on the Role of Renal Sympathetic Nervous System
in the Pathogenesis of Ischemic Acute Renal Failure**Toshihide FUJII^a, Masanori TAKAOKA^b, and Yasuo MATSUMURA^c

^a*Pharmacology & Toxicology Laboratory, Frontier Biochemical & Medical Research Laboratories,
Corporate Research & Development Division, Kaneka Co., Ltd.,
1-8, Miyamae-machi, Takasago-cho, Takasago, Hyogo 676-8688, Japan*

^{b,c}*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan*

(Received October 22, 2008; Accepted November 10, 2008)

Kidneys are an abundantly innervated internal organ and the renal sympathetic nerve plays an important role in regulating body fluid volume and blood pressure via the modulation of renal functions. Here we summarized the relationship between the renal sympathetic nervous system and ischemia/reperfusion-induced acute renal failure (ARF). To clarify changes in the renal sympathetic nervous system during ischemia and reperfusion, we determined renal sympathetic nerve activity, renal interstitial norepinephrine (NE) levels and renal venous plasma NE levels. Results indicated enhanced renal sympathetic nerve activity during ischemia, accompanied by increases in renal interstitial NE level during ischemia and after reperfusion, and NE overflow in the renal vein after reperfusion. Taken together, it seems likely that the renal sympathetic nervous system is enhanced during ischemia and after reperfusion. We next demonstrated that renal denervation or a ganglion blocker markedly overcame the deterioration in renal function and tissue injury induced by ischemia/reperfusion and markedly suppressed NE overflow from renal sympathetic nerves after reperfusion. In addition, the administration of selective α_1 -adrenoceptor antagonists significantly attenuated ischemia/reperfusion-induced ARF, but had no effect on the elevation of renal venous plasma NE levels after reperfusion. These results suggest that NE excessively released from the postischemic kidney is involved in the pathogenesis of ischemic ARF, probably acting on the postsynaptic α_1 -adrenoceptors. Thus, the enhancement of the renal sympathetic nervous system is closely related to the pathogenesis of ischemia/reperfusion-induced ARF, thereby suggesting the possibility that selective inhibition of the sympathetic nervous system is useful for postischemic ARF.

Key words—ischemia/reperfusion; acute renal failure; renal sympathetic nerve activity; norepinephrine

^{*,a} 株式会社カネカ 研究開発本部 フロンティアバイオ・メディカル研究所 生物研究グループ
〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8, e-mail: Toshihide.Fujii@kn.kaneka.co.jp

^b 大阪薬科大学 生体機能解析学研究室

^c 大阪薬科大学 病態分子薬理学研究室

本論考は、藤井 俊秀の博士論文をもとに再構成したものである。

腎臓は豊富な神経支配を受けている臓器であり、特に腎機能の調節には腎交感神経が深く関与することはよく知られている。高頻度 (2.5–5.0 Hz) の腎神経刺激は、腎臓から血中へ過剰なノルエピネフリン (NE) 放出を起こし、腎血流量および糸球体濾過率を低下させる¹⁾。また、腎動脈に NE を持続注入した場合、腎組織障害や継続的な腎血行動態の異常が起こることも知られている²⁾。さらに、腎交感神経活動 (RSNA) の過剰亢進はデオキシコルチコステロンアセテート (DOCA)-食塩負荷高血圧モデル³⁾や脳卒中易発性自然発症高血圧ラット (SHR-SP)⁴⁾ の高血圧およびそれに伴う腎障害の病態発症と進展に重要な役割を果たしていることが知られており、これらの実験事実、RSNA の活性化または慢性的な亢進が、腎臓自体に種々の障害や機能変化をもたらすことを示している。

深刻な腎障害を生じる疾患の一つに急性腎不全があり、この病態は、虚血、種々の薬剤、エンドトキシン等が原因となって糸球体濾過量が急激に低下し、その結果、蛋白質の最終代謝産物である尿素窒素やクレアチニンなどの体内蓄積が起こり、体液・電解質の恒常性が維持できなくなった状態と定義される。その中でも、虚血性急性腎不全の病態発症には、活性酸素や一酸化窒素あるいはエンドセリン等の血管作動性物質を始めとした多くの因子が関与する一方で、腎交感神経系や循環カテコラミンが関与することも知られている。その状況証拠としては、腎除神経処置が虚血再灌流による糸球体濾過率の低下や腎血行動態不全を改善することや腎臓への NE 注入が虚血再灌流処置後の腎機能低下や致死率を悪化させることが挙げられる⁵⁾。また、腎虚血自体が化学受容体を介して求心性神経を活性化させることが明らかにされており⁷⁾、交感神経および活性化した神経終末から放出される神経伝達物質により、虚血再灌流による腎障害の発症に影響を与える可能性が想定される。しかし、虚血性急性腎不全の病態発症における腎交感神経系の役割とその機序については明ら

かにされていない。

本研究は虚血性急性腎不全における腎交感神経系の役割を明確にするために実施されたものである。

1. 腎臓の虚血再灌流処置による腎交感神経活動 (RSNA) およびノルエピネフリン (NE) 動態への影響

腎交感神経系は腎臓の機能を調節する重要な因子であるが、一方でその過剰亢進は、腎疾患に深く関与することが知られている。高頻度の腎神経刺激は、腎臓から血中へ大量の NE 放出を起こし、腎血流量および糸球体濾過率を低下させる¹⁾。以前の研究において、虚血再灌流により腎交感神経系が亢進することが示唆されているが、その根拠となる明確な証拠は示されておらず、本病態モデルにおける腎交感神経系との関連は明らかではなかった。そこで、まず虚血時における RSNA を直接電氣的に測定する方法を試みた。

RSNA は、虚血直後に過剰な亢進 (安定放置時の約 2.5 倍) が観察され、その後直ちに低下 (安定放置時の約 1.5 倍) したが、虚血中は高値を維持した (Figure 1)。このように、虚血自体により腎交感神経が刺激され、その後も RSNA が亢進していることが明らかになった。

次に、虚血中に亢進した RSNA により実際に神経終末からの NE 遊離を促進するかを検証する目的で、腎組織中の NE 濃度を in vivo マイクロダイヤライシス法を用いて測定した。その結果、虚血後半 (30–45 分) にはすでに腎組織 NE 濃度が増加し始め、再灌流直後に最大値を示した (Figure 2A)。この結果から、虚血時に RSNA が亢進することにより神経終末から腎間質への NE 遊離が増大したものと考えられる。

腎静脈への NE 遊離を測定することは RSNA の指標となり得るため、再灌流後の腎静脈血漿中 NE 濃度を測定したところ、NE 濃度は再灌流直後 (2

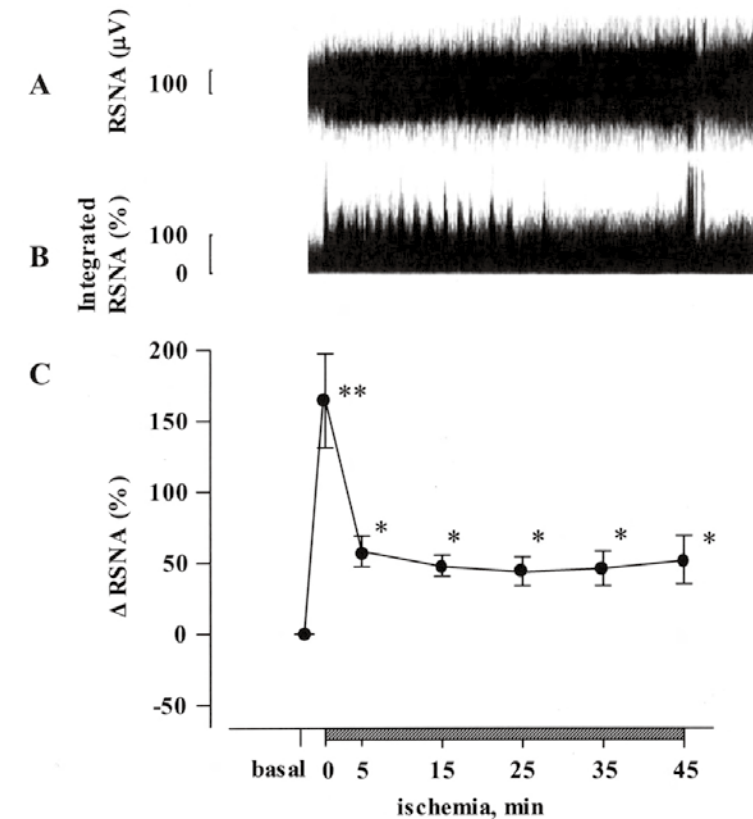


Figure 1. Typical responses of renal sympathetic nerve activity (RSNA, A) and integrated RSNA (B) to ischemia/reperfusion in an anesthetized rat. (C) Changes in RSNA during 45-min ischemia period. Values are means $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with pre-ischemic value.

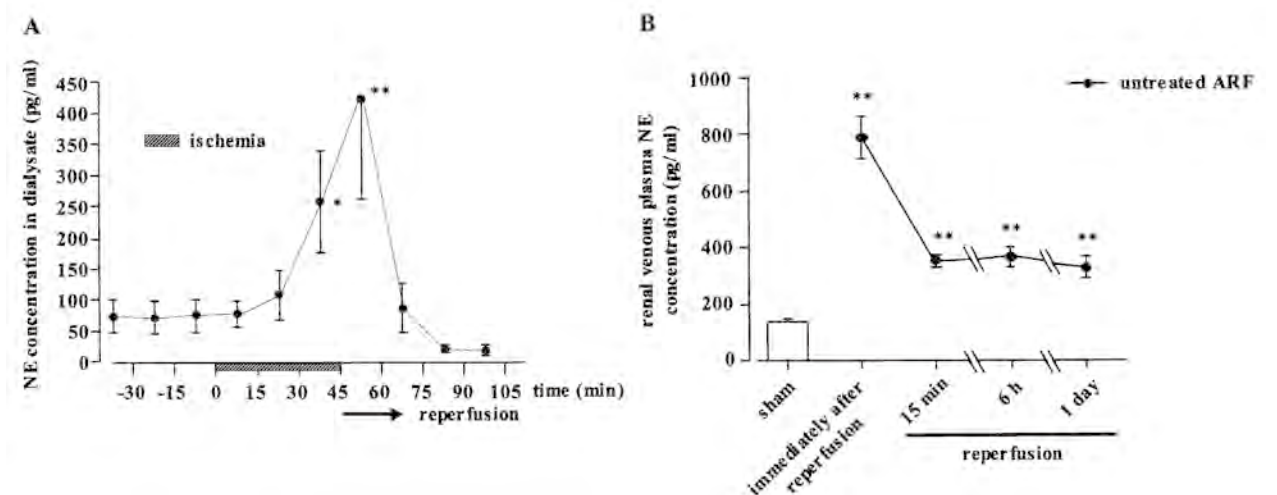


Figure 2. (A) Changes in norepinephrine (NE) concentrations in dialysate of kidneys with ischemia/reperfusion. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with pre-ischemic value. (B) NE concentrations in renal venous plasma of ischemia/reperfused and sham rats. Blood samples (one sample from each animal) of ischemia/reperfused rat were taken during 2 min at induced time points. ** $P < 0.01$, compared with sham-operated rats. Values are means $\pm$ S.E.M. ARF, acute renal failure.

分以内)に最大値を示し、その後すみやかに減少したものの、sham群と比較して高値を維持した(Figure 2B)。これは、虚血により亢進したRSNAが再灌流後のNE遊離に直接的に関わることを示唆している。

以上より、虚血時にRSNAが上昇し、腎組織中のNE濃度が上昇、さらに再灌流後には腎静脈血中へのNE遊離が増大することが確認されたことから、虚血再灌流後には腎交感神経系が亢進していることが実証された。

2. 虚血再灌流による腎障害並びにNE放出に対する腎除神経および自律神経節遮断薬の効果

急性腎不全発症モデルにおける腎障害⁵⁾やDOCA-食塩負荷高血圧モデル³⁾、SHR-SP⁴⁾の高血圧およびそれに伴う腎障害が腎除神経により改善されるこ

とが報告されており、これらの知見は病態由来による過剰な神経活動を抑制した結果、腎臓に効果的に作用した可能性がある。第1編において、腎臓の虚血中あるいは再灌流初期には、RSNAやその亢進に続く腎臓からのNE遊離の増大が確認されたため、虚血再灌流後の腎交感神経系活性化を抑制することにより、虚血再灌流による腎障害を軽減し得る可能性が考えられる。本編では、虚血再灌流後の腎交感神経系の亢進が腎障害の発症と密接に結びついているかを検証するため、虚血再灌流による腎障害に対する腎除神経処置および自律神経節遮断薬ペントリニウムの効果について検討した。

虚血再灌流処置1日後の対照群では、顕著な腎機能低下および腎組織障害を生じたが、これらは腎除神経の処置あるいは自律神経節遮断薬ペントリニウムの投与により改善された(Figure 3)。また、再灌流直後および1日後の腎静脈血漿中NE

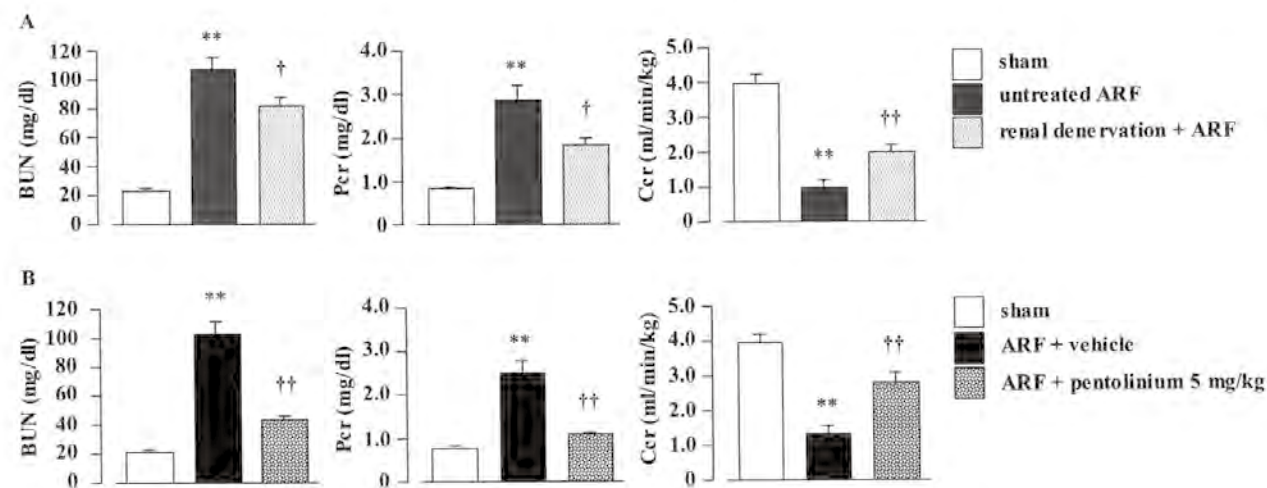


Figure 3. Effect of renal denervation (A) or pentolinium treatment (B) on blood urea nitrogen (BUN), plasma creatinine concentration (Pcr) and creatinine clearance (Ccr) at 1 day after reperfusion. Renal denervation was accompanied 5 min before ischemia. Pentolinium treatment (5 mg/kg) or vehicle (0.9% saline) treatment was given intravenously 5 min before ischemia. Each column and bar represents the mean $\pm$ S.E.M. $**P < 0.01$, compared with sham-operated rats. $^{\dagger}P < 0.05$, $^{\ddagger}P < 0.01$, compared with untreated (A) or vehicle-treated (B) rats. ARF, acute renal failure.

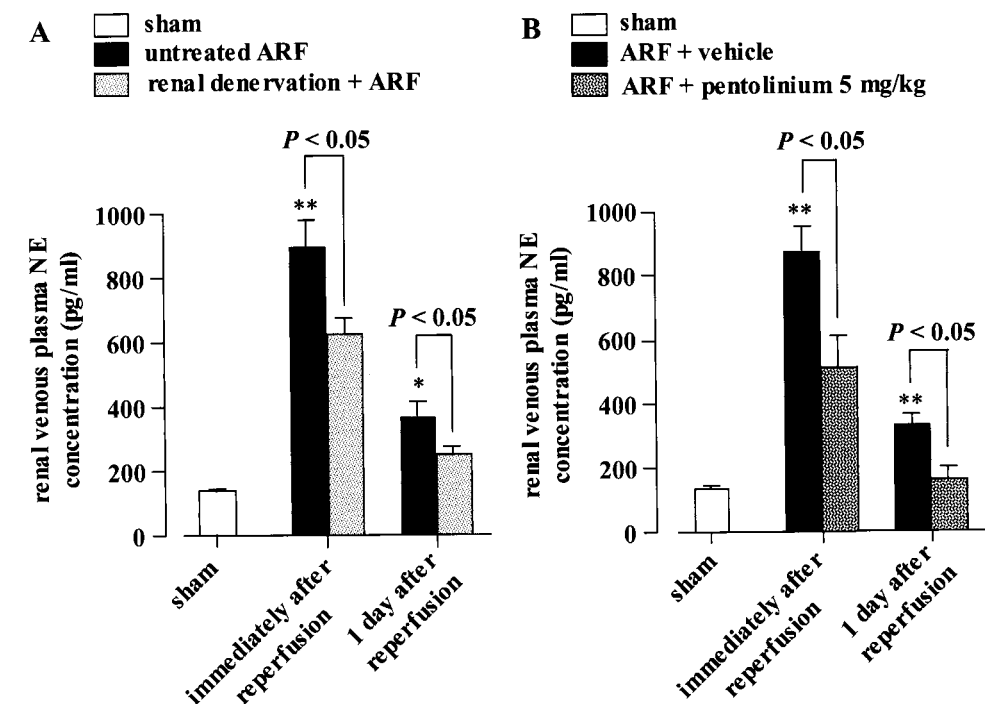


Figure 4. Effect of renal denervation (A) or pentolinium treatment (B) on norepinephrine (NE) concentrations in renal venous plasma of ischemia/reperfused rats. Blood samples (one sample from each animal) of ischemia/reperfused rats were taken during 2 min at induced time points. Renal denervation was accompanied 5 min before ischemia. Pentolinium treatment (5 mg/kg) or vehicle (0.9% saline) treatment was given intravenously 5 min before ischemia. Each column and bar represents means $\pm$ S.E.M. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with sham-operated rats. ARF, acute renal failure.

濃度の上昇についても、腎除神経処置あるいはペントリニウム投与によって有意に抑制された(Figure 4)。これらの結果から、虚血再灌流による腎交感神経終末からの過剰なNE遊離が、虚血性急性腎不全における腎障害の発症に関与することが明らかとなった。

3. 虚血再灌流による腎障害並びにNE放出に対するアドレナリン性 α_1 受容体遮断薬の効果

これまでの研究において、 α_2 受容体作動薬クロニジンを用いて、降圧作用を有する薬物濃度において、虚血再灌流による腎臓髄質外層にお

ける微小循環障害やクレアチニークリアランスの低下を抑制することが証明されている⁸⁾。また、 β_1/β_2 受容体遮断薬プロプラノロールを用いた知見では、虚血再灌流によるレニン放出増大を抑制することにより虚血性急性腎不全に有効であることが示されていた⁹⁾。しかし、遊離されたNEが腎臓のシナプス後アドレナリン性受容体を介して腎障害を引き起こしているかについて検討した報告はなされていない。なお、 α_1 受容体遮断薬プラザシンとアンギオテンシン AT_1 受容体遮断薬ロサルタンとの併用により、虚血性急性腎不全モデルにおける腎血行動態の低下を抑制したことを示されているが、具体的な腎障害について言及していない¹⁰⁾。そこで本編では、虚血再灌流により増大した

腎臓からの NE が、シナプス後膜におけるアドレナリン性 α_1 受容体を介して腎障害に関与しているかを調べる目的で、虚血再灌流による腎障害に対する α_1 受容体遮断薬プラゾシンの効果を検証した。

虚血再灌流処置 1 日後の対照群では、顕著な腎機能低下および腎組織障害を生じたが、これらはアドレナリン性 α_1 受容体遮断薬プラゾシンの

虚血前投与により改善された (Figure 5)。しかしながら、プラゾシンの再灌流後投与では、虚血前投与でみられた腎障害の抑制効果はみられなかった。これらの結果から、虚血性急性腎不全の発症には α_1 受容体を介したノルアドレナリン性神経伝達が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、再灌流後の腎静脈血漿中 NE 濃度を測定したところ、プラゾシンの虚血前投与は再

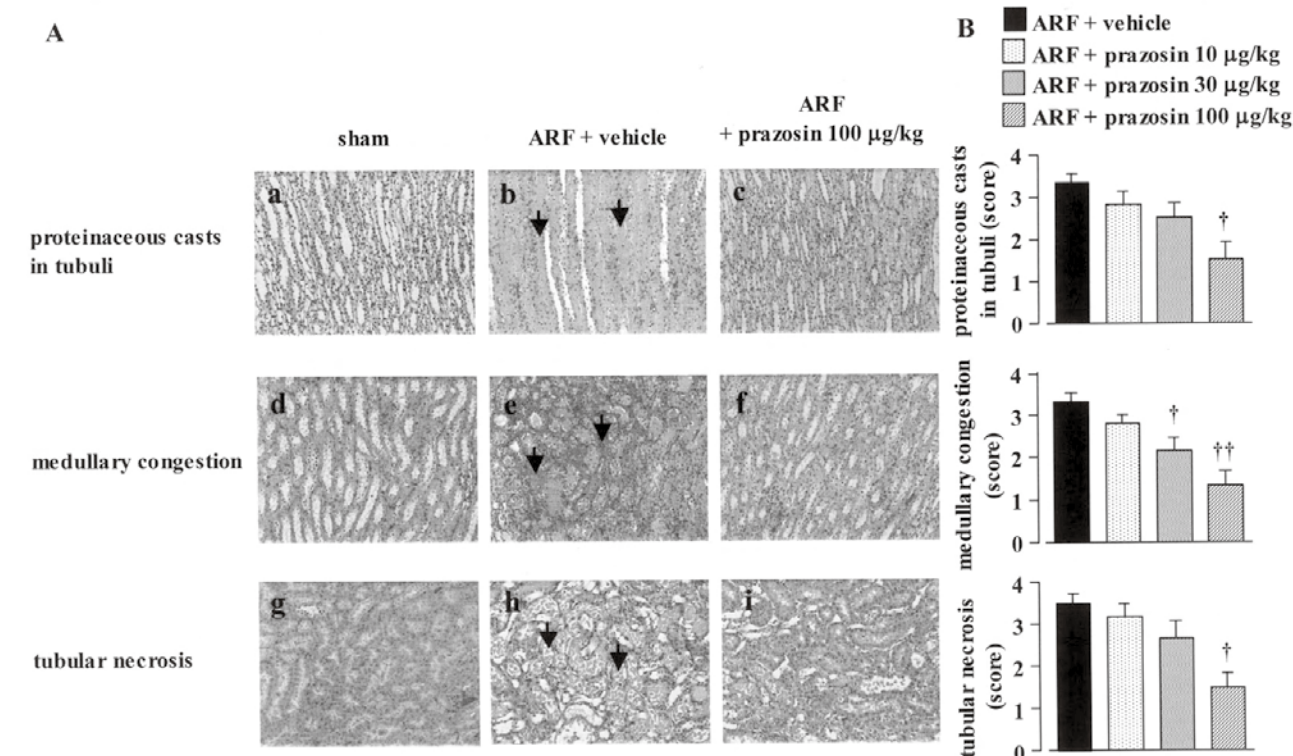


Figure 5. (A) Light microscopy of inner zone (a-c), outer zone inner stripe (d-f) and outer zone outer stripe (g-i) of medulla of the kidney of ARF rats treated with vehicle and prazosin (100 µg/kg) at 1 day after reperfusion, and sham-operated rats. Arrows indicate severe proteinaceous casts in tubuli (b), congestion and hemorrhage (e) and tubular necrosis (h) are observed in vehicle-treated ARF rats. (B) Effect of prazosin (10-100 µg/kg) treatment on histopathological changes in the kidneys of ARF rats. Each column and bar represents the mean ± S.E.M. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$, compared with vehicle-treated rats. Prazosin or vehicle [a mixture of 10% ethanol, 15% polyethylene glycol 400, 70% saline (0.9%)] was given intravenously 5 min before ischemia. ARF, acute renal failure.

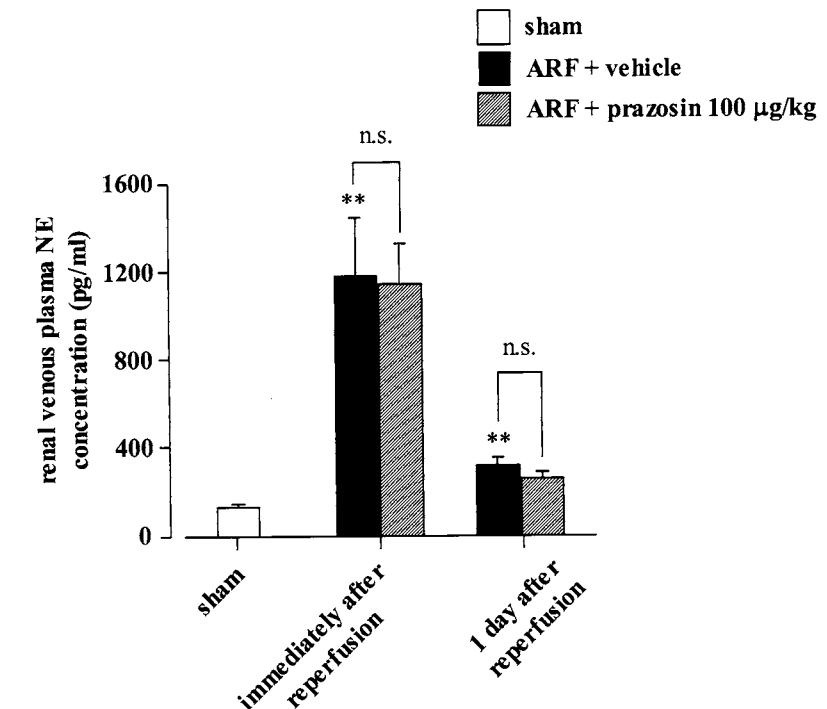


Figure 6. Effect of prazosin (10-100 µg/kg) treatment on norepinephrine (NE) concentrations in renal venous plasma of ischemia/reperfusion rats. Blood samples (one sample from each animal) of ischemia/reperfusion rats were taken during 2 min at induced time points. Prazosin or vehicle [a mixture of 10% ethanol, 15% polyethylene glycol 400, 70% saline (0.9%)] was given intravenously 5 min before ischemia. Each column and bar represents means ± S.E.M. ** $P < 0.01$, compared with sham-operated rats. ARF, acute renal failure.

灌流直後および 1 日後の NE レベルの上昇には影響を与えなかった (Figure 6)。この結果は、第 2 編で確認された腎除神経および自律神経節遮断薬投与においてみられた再灌流後の NE 濃度の上昇を抑制した結果と対照的であった。よって、虚血再灌流による腎障害の発症には、腎臓におけるシナプス後膜の α_1 受容体を介した NE の神経伝達に関与していることが示唆された。

結語

腎臓の虚血処置により RSNA が亢進することが明らかになった。また、亢進した RSNA および腎神経終末からの NE 遊離の増大が、虚血再灌流に

よる腎障害の発症に密接に関与していること、さらに腎臓におけるシナプス後膜の α_1 受容体を介したノルアドレナリン性神経伝達に関与していることが明らかになった。

以上、虚血再灌流による腎障害の発症には腎交感神経系の過剰な亢進が密接に関係していることを証明した。また、腎交感神経系に対する選択的な阻害が、虚血性急性腎不全に対して有効である可能性が示唆された。

REFERENCES

- 1) Egi Y., Matsumura Y., Murata S., Umekawa T., Hisaki K., Takaoka M., Morimoto S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **269**, 529–535 (1994).

- 2) Conger J.D., Robinette J.B., Hammond W.S., *Kidney Int.*, **39**, 1087–1097 (1991).
- 3) Ciccone C.D., Zambraski E.J., *Hypertension*, **8**, 925–931 (1986).
- 4) Nagaoka A., Kakihana M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **32**, 591–597 (1982).
- 5) Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M., *Acta Physiol. Scand.*, **174**, 291–297 (2002).
- 6) Gottmann U., Brinkkoetter P.T., Bechtler M., Hoeger S., Karle C., Schaub M., Schnuelle P., Yard B., van der Woude F.J., Braun C., *Kidney Int.*, **70**, 321–328 (2006).
- 7) Recordani G.M., Moss N.G., Waselkov L., *Circ. Res.*, **43**, 534–543 (1978).
- 8) Solez K., Ideura T., Silvia C.B., Hamilton B., Saito H., *Kidney Int.*, **18**, 309–322 (1980).
- 9) Solez K., D’Agostini R.J., Stawowy L., Freedman M.T., Scott W.W. Jr. Siegelman S.S., Heptinstall R.H., *Am. J. Pathol.*, **88**, 163–192 (1977).
- 10) Ajayi A.A.L., Hercule H.C., Pamugo J., Dixon D., Oyekan A.O., *Blood Press.*, **10**, 238–246 (2001).

LPS および CpG-DNA 投与ラットにおける digoxin 体内動態の変動

加藤隆児*, 井尻好雄, 田中一彦

Effects of LPS and CpG-DNA on Digoxin Pharmacokinetics

Ryuji KATO, Yoshio IJIRI, and Kazuhiko TANAKA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 22, 2008; Accepted November 18, 2008)

Lipopolysaccharide (LPS) is a highly bioactive substance that can cause local and systemic damages to various organs in both humans and animals, even at very low doses. Deoxyribonucleic acid (DNA) from bacteria or viruses has been reported as one of the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that can induce endotoxemia-like inflammation in animals. We have reported that digoxin pharmacokinetics was changed by the administration of LPS or bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs (CpG-DNA) in rats. However, there has been no report concerning the effects of LPS or CpG-DNA administration on the difference in digoxin pharmacokinetics. In this study, we compared the pharmacokinetics of digoxin as a probe ligand for a two-compartment model in a transient inflammatory model induced either by LPS or CpG-DNA. We also examined the changes in digoxin pharmacokinetics in rats after LPS or CpG-DNA administration. In addition, plasma concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and nitrite/nitrate (NOx) were determined after LPS or CpG-DNA administration (5 mg/kg, ip). The area under the plasma concentration-time curve (AUC_{po}) of digoxin increased significantly on Days 1-3 after LPS and CpG-DNA administration ($P < 0.05$). On Day 5 after LPS and CpG-DNA administration, there were no significant differences in either AUC_{po} or clearance compared with the control group. The elimination rate constant remained relatively unchanged throughout the experiment. The changes in digoxin pharmacokinetics in rats were similar for both LPS and CpG-DNA administration, but the amounts of plasma TNF- α , IL-1 β , and NOx production were significantly higher with LPS administration than with CpG-DNA administration. These findings suggest that a transient inflammatory condition is stronger when induced by LPS (5 mg/kg) than when induced by CpG-DNA (5 mg/kg), but the changes in digoxin pharmacokinetics in rats are influenced by both in a similar way.

Key words—lipopolysaccharide; CpG-DNA; digoxin; absorption; distribution

1. はじめに

Lipopolysaccharide (LPS) は多糖、脂質、リン酸からなるグラム陰性菌の細胞外膜の主要構成成分で、微量で諸臓器にさまざまな障害を起こす生理活性の高い物質である^{1,2)}。LPS は tumor necrosis

factor- α (TNF- α) および interleukin-1 β (IL-1 β) などのサイトカインの産生、遊離に関与し、発赤、発熱、腫張、疼痛などの炎症反応を伴う局所性および全身性の多様な病態生理学的反応を惹起する³⁾。一方、バクテリアまたはウイルス由来の DNA も pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)

* 大阪薬科大学 臨床薬剤学研究室, e-mail: rkato@gly.oups.ac.jp
本論考は、加藤隆児の博士論文をもとに再構成したものである。

の1つであり、エンドトキシン様の炎症を誘発することが報告されている⁴⁾。その機序としては、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入した非メチル化シトシン-リン酸-グアニンモチーフを含むDNA (CpG-DNA) が後期エンドソーム/リソソームにて Toll-like receptor (TLR) 9 により認識され nuclear factor kappa B (NF- κ B) の活性化が起こり、それにより炎症性サイトカインが産生され⁴⁾と考えられている。

現在までに我々は、LPS および CpG-DNA 投与により惹起された炎症時において、薬物体内動態が変動することを報告しているが^{5,6)}、変動の程度について両者を比較検討した報告はなされていない。

そこで、ラットに LPS および CpG-DNA 投与を行い、digoxin 体内動態に及ぼす LPS および CpG-DNA の影響について投与5日後までラットを用い比較検討した。また、炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-1 β) および NOx の挙動についても検討した。

2. 材料および方法

2-1. 薬剤および試薬

LPS (*Escherichia coli*, Lot No. 064K4010, Sigma-Aldrich Co., MO, USA), CpG-DNA (*Escherichia coli*, Lot No. 084K4008, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) および digoxin (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) を用いた。その他の試薬は特級品を用いた。

2-2. 実験動物

通常飼育の条件下にある Wistar ST 系雄性ラット (体重: 約 300 g, 8-9 週齢, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan) を用いた。動物は温度 24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 湿度 55 $\pm$ 10%, 照明時間 6:00 ~ 18:00 の環境下で、水道水および固形試料 (NMF, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を自由に

摂取させ、1 週間以上予備飼育を行った。全ての実験は、大阪薬科大学動物施設使用ガイドラインに従って行った。

2-3. Digoxin 経口投与実験

2-3-1. 投与薬液の調製

Digoxin を生理食塩液に溶解し、0.1 mg/mL 溶液を調製し、投与量が 0.1 mg/kg となるようにした。LPS については、生理食塩液を用いて 2.5 mg/mL となるように調製し、投与量が 5 mg/kg となるようにした。CpG-DNA については、生理食塩液を用いて 1.25, 2.5, 5 mg/mL となるように調製し、投与量が 2.5, 5, 10 mg/kg となるようにした。

2-3-2. 手術法および薬液投与法

一晩絶食したラットを diethyl ether によって麻酔した後、手術台に背位固定し、頸静脈に 100 U/mL のヘパリン生理食塩液を満たしたポリエチレンチューブ (PE50, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を用いてカニュレーションを施した。血液凝固を防止するため、カニュレより 100 U/mL のヘパリン生理食塩液を 0.1 mL 注入し、クレンメで止めた。LPS 投与群においては、LPS (5 mg/kg) を腹腔内投与し、投与 1, 2, 3, 5 日後に、コントロール群と同様の方法で digoxin の経口投与を行った。コントロール群には生理食塩液 (2.5 mL/kg) を腹腔内投与し、投与1日後に経口ゾンデを用いて digoxin (0.1 mg/kg) の経口投与を行った。実験中は、体温維持のために上方からランプで照射した。CpG-DNA 投与群においては、CpG-DNA (2.5, 5, 10 mg/kg) を腹腔内投与し、投与1日後に、コントロール群と同様の方法で digoxin の経口投与を行った。また、CpG-DNA (5 mg/kg) においては、投与 2, 3, 5 日後にも、コントロール群と同様の方法で digoxin の経口投与を行った。

2-3-3. 採血

各群とも採血前日から 15 時間以上絶食とした。採血は digoxin 投与直前、投与後 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 時間に頸静脈より採血を行った。採血に際しては、頸静脈カニュレより予備採血として血液約 0.3 mL を採血した後、本採血として血液約 0.5 mL を採血した。予備採血で得た血液は、頸静脈カニュレからラットに戻し、さらに 100 U/mL ヘパリン生理食塩液約 0.1 mL を注入してカニュレを満たした。採血した血液は、予めヘパリン処理したポリエチレンチューブにすばやく移し、遠心機 (himac CF16RX, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) を用いて遠心分離を行い (500 $\times$ g, 10 min), 得られた血漿 250 μ L を採取して血漿中濃度測定用サンプルとした。

2-4. Digoxin 濃度の測定

得られた血漿試料 200 μ L に除タンパク剤 (Abbott, IL, USA) 200 μ L を添加し、試験管ミキサーで 30 秒間攪拌後、500 $\times$ g で 5 分間遠心分離を行い、上清 250 μ L を用いて蛍光偏光免疫測定法 (FPIA 法: TDx Digoxin[®], Abbott, IL, USA) により digoxin の定量を行った。なお、5 ng/mL 以上の濃度については、希釈法により 150 ng/mL まで測定を行った。本検討における測定範囲は、0.5-150 ng/mL であり、日内変動および日間変動は 5% 以内であった。

2-5. 血漿中 TNF- α 、IL-1 β および NOx の測定

LPS (5 mg/kg), CpG-DNA (5 mg/kg) および生理食塩液投与前、投与後 3, 6, 9, 12 時間に、diethyl ether による麻酔下で、頸静脈より採血 (0.5 mL), 除タンパク後、目的物質の測定に供した。

採血した血漿試料を用いて、TNF- α および IL-1 β を ELISA 法 (Quantikine[®] TNF α /IL-1 β ,

R&D Systems, MN, USA), NOx は Nitric Oxide Assay kit (Fluorometric, Calibiochem, CA, USA) を用いて測定した。

2-6. データ解析

Digoxin の血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC_{po}) を台形近似法にて算出した。Digoxin の経口クリアランス (CL/F) については投与量 / AUC_{po} により、消失速度定数 (K_{el}) は消失相の傾きから算出した。

2-7. 統計解析

統計処理は Dunnett 検定を用い、両側危険率 5% 未満 ($P < 0.05$) を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1. Digoxin 経口投与実験

LPS (5 mg/kg) および CpG-DNA (5 mg/kg) 投与 1, 2, 3 日後ではコントロール群と比較して、AUC_{po} の有意な増加が認められた。LPS 投与 1, 2, 3 日後および CpG-DNA 投与 1, 2 日後では CL/F の有意な減少が認められた。LPS および CpG-DNA 投与 5 日後においては AUC_{po}, CL/F とも有意な差は認められなかった。一方、K_{el} に関しては、コントロール群と比較して、CpG-DNA 投与群において有意な差は認められなかった (Figure 1, Figure 2, Table 1, Table 2)。

CpG-DNA (2.5, 5, 10 mg/kg) 投与1日後ではコントロール群と比較して、CpG-DNA 10 mg/kg 投与群において、Cmax の有意な増加が認められたが、CpG-DNA 各投与群間では有意な変動は認められなかった。AUC_{po} については、コントロール群と比較して CpG-DNA 投与群において、有意な増加が認められたが、CpG-DNA 各投与群間では有意な変動は認められなかった (Figure 3)。

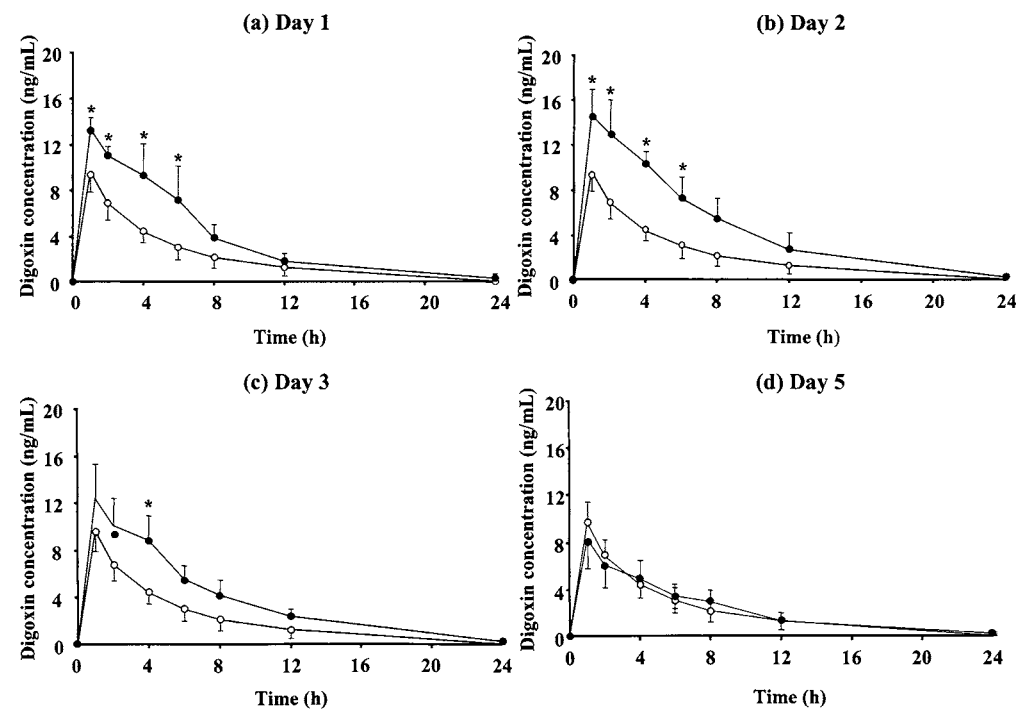


Figure 1. Plasma digoxin concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). LPS was administered to rats intraperitoneally, and digoxin (0.1 mg/kg) was then administered orally on Day 1-3, and Day 5. LPS, lipopolysaccharide. Each bar indicates the standard deviation (mean ± SD, n = 4-5). **P* < 0.05, compared with the control group.

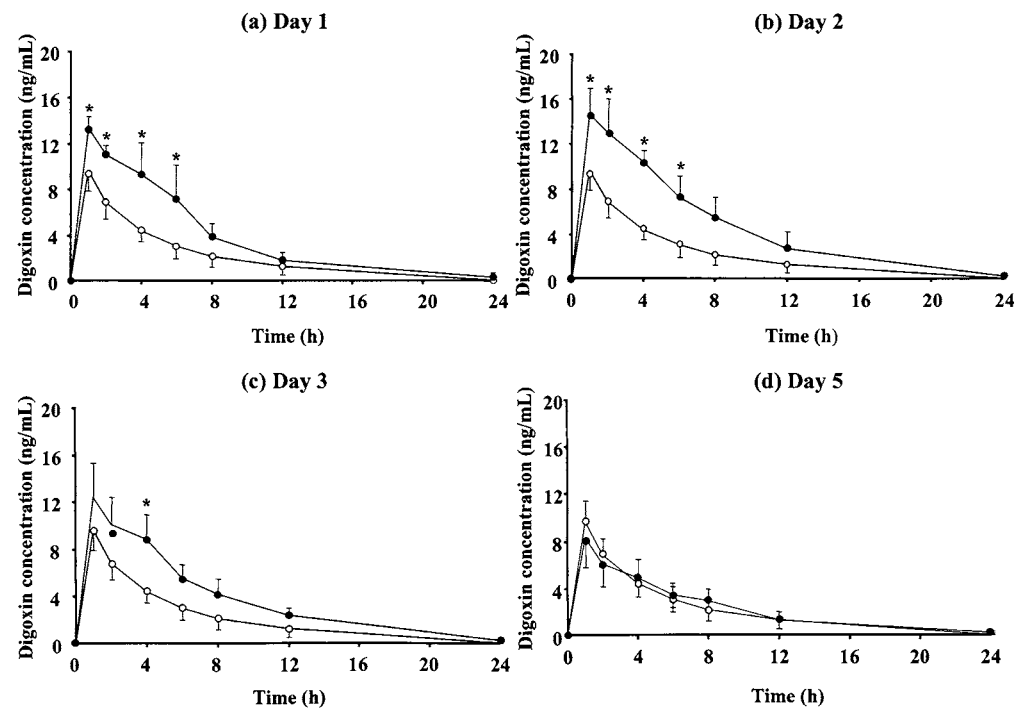


Figure 2. Plasma digoxin concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). CpG-DNA was administered to rats intraperitoneally, and digoxin (0.1 mg/kg) was then administered orally on Day 1-3, and Day 7. CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs. Each bar indicates the standard deviation (mean ± SD, n = 4-5). **P* < 0.05, compared with the control group.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of digoxin in LPS-treated rats

	Control	LPS (5 mg/kg, ip)			
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
AUC _{po} (ng·h/mL)	50.7 ± 15.3	88.8 ± 19.6*	94.1 ± 19.4*	85.4 ± 36.7*	43.9 ± 6.32
CL/F (mL/min)	505 ± 141	284 ± 62.6**	252 ± 40.4**	283 ± 110**	581 ± 80.1
Kel (h ⁻¹)	0.10 ± 0.06	0.13 ± 0.05	0.20 ± 0.12	0.18 ± 0.11	0.07 ± 0.02

Digoxin was orally administered on Day 1-3, and Day 5 after LPS administration. Control is no LPS treated group.
LPS, lipopolysaccharide; ip, intraperitoneal administration; AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total clearance, F, bioavailability; Kel, elimination rate constant.
Data are means ± SD (n = 4-5). Statistical analysis was performed with the use of the Dunnett's test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with Control.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of digoxin in CpG-DNA-treated rats

	Control	CpG-DNA (5 mg/kg, ip)			
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
AUC _{po} (ng·h/mL)	41.3 ± 5.0	75.7 ± 16.8*	70.3 ± 4.1*	68.1 ± 18.9*	53.7 ± 17.7
CL/F (L/h)	0.60 ± 0.06	0.38 ± 0.10*	0.36 ± 0.03*	0.43 ± 0.11	0.59 ± 0.20
Kel (h ⁻¹)	0.17 ± 0.04	0.18 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.07

Digoxin was orally administered on Day 1-3, and Day 7 after CpG-DNA administration. Control is no CpG-DNA treated group.
CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs; ip, intraperitoneal administration; AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total clearance, F, bioavailability; Kel, elimination rate constant.
Data are means ± SD (n = 4-5). Statistical analysis was performed with the use of the Dunnett's test. **P* < 0.05, compared with Control.

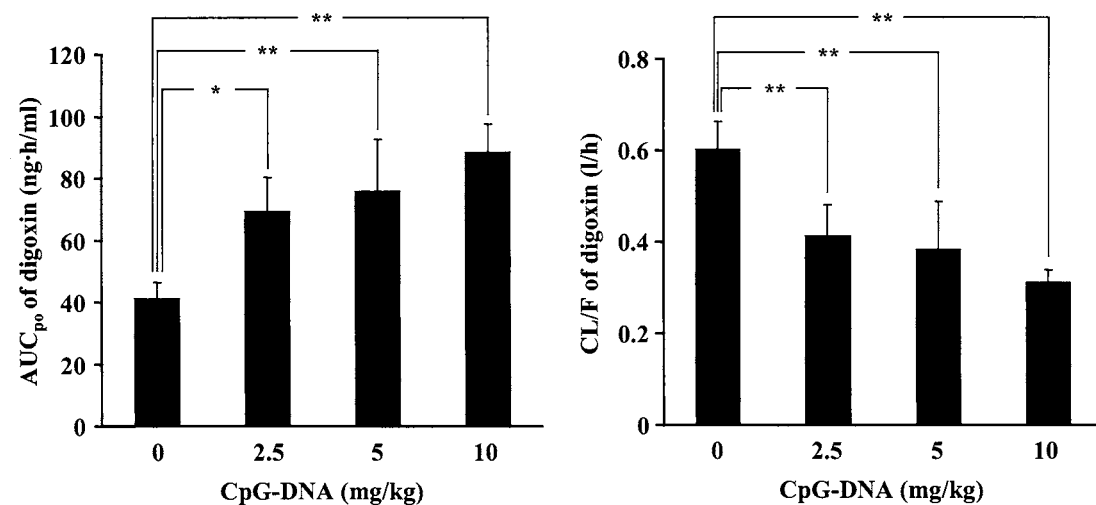


Figure 3. Effects of CpG-DNA (2.5, 5, and 10 mg/kg) on AUC_{po} and CL/F of digoxin.

CpG-DNA or endotoxin-free distilled water was administered to rats intraperitoneally, and digoxin (0.1 mg/kg) was then administered orally on Day 1. No significant differences were observed among the CpG-DNA (2.5, 5, and 10 mg/kg) groups in AUC_{po} and CL/F. AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total clearance; F, bioavailability; CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs. Data are means $\pm$ SD (n = 4-5). Statistical analysis was performed with the use of the Tukey test. * P < 0.05 and ** P < 0.01, compared with the control group (without CpG-DNA administration).

3-2. 血漿中 TNF- α , IL-1 β および NOx 濃度

3-2-1. LPS 投与群

血漿中 TNF- α 濃度は、コントロール群では血漿中 TNF- α は検出されなかったのに対し、LPS 投与群では LPS 投与後 3, 6 時間に有意に上昇した (P < 0.05). また、その挙動については LPS 投与後 3 時間後に最大値に達し、その後は経時的に減少した (Figure 4a). 血漿中 IL-1 β 濃度は、コントロール群では血漿中 IL-1 β 値は検出されなかったのに対し、LPS 投与群では LPS 投与後 3, 6, 9 時間に有意に上昇した (P < 0.05). また、その挙動については LPS 投与後 6 時間に最大値に達し、その後は経時的に減少した。LPS 投与後 12 時間後ではコントロール群との間に有意な差は認められなかった (Figure 4b). 血漿中 NOx 濃度は、コントロール群と比較して、LPS 投与群では LPS 投与後

6, 9, 12 時間に有意に上昇した (P < 0.05). また、LPS 投与 12 時間までの検討においては、NOx 濃度は LPS 投与 12 時間後が最大であった (Figure 4c).

3-2-2. CpG-DNA 投与群

血漿中 TNF- α 濃度は、コントロール群と比較して CpG-DNA (5 mg/kg) 投与 3 時間後に有意に上昇し、その後は経時的に減少し 6, 12, 24 時間後には有意な差は認められなかった (Figure 5a). 血漿中 IL-1 β 濃度は、コントロール群と比較して CpG-DNA 投与 6 時間後に有意に上昇し、その後は経時的に減少し 9, 12, 24 時間後には有意な差は認められなかった (Figure 5b). 血漿中 NOx 濃度は、コントロール群と比較して CpG-DNA 投与 12 時間後に有意に上昇し、その後は経時的に

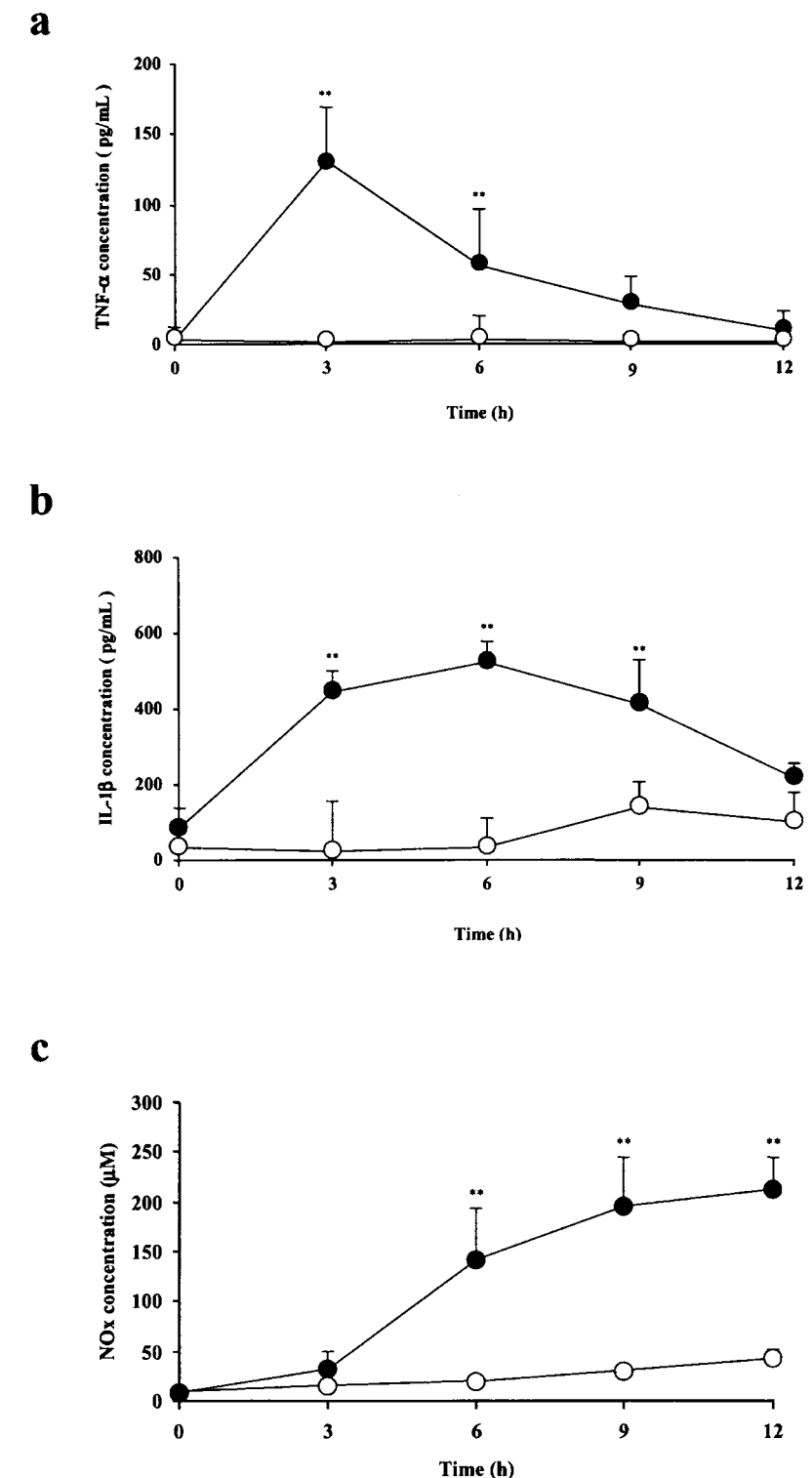


Figure 4 (a) Plasma TNF- α concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). Data are means $\pm$ SD (n = 6-10). (b) Plasma IL1- β concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). Data are means $\pm$ SD (n = 4-6). (c) Plasma NOx concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). Data are means $\pm$ SD (n = 4-7). LPS, lipopolysaccharide; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-1 β , interleukin-1 β ; NOx, nitrite/nitrate. * P < 0.05, compared with the control group (without LPS administration) at each time point.

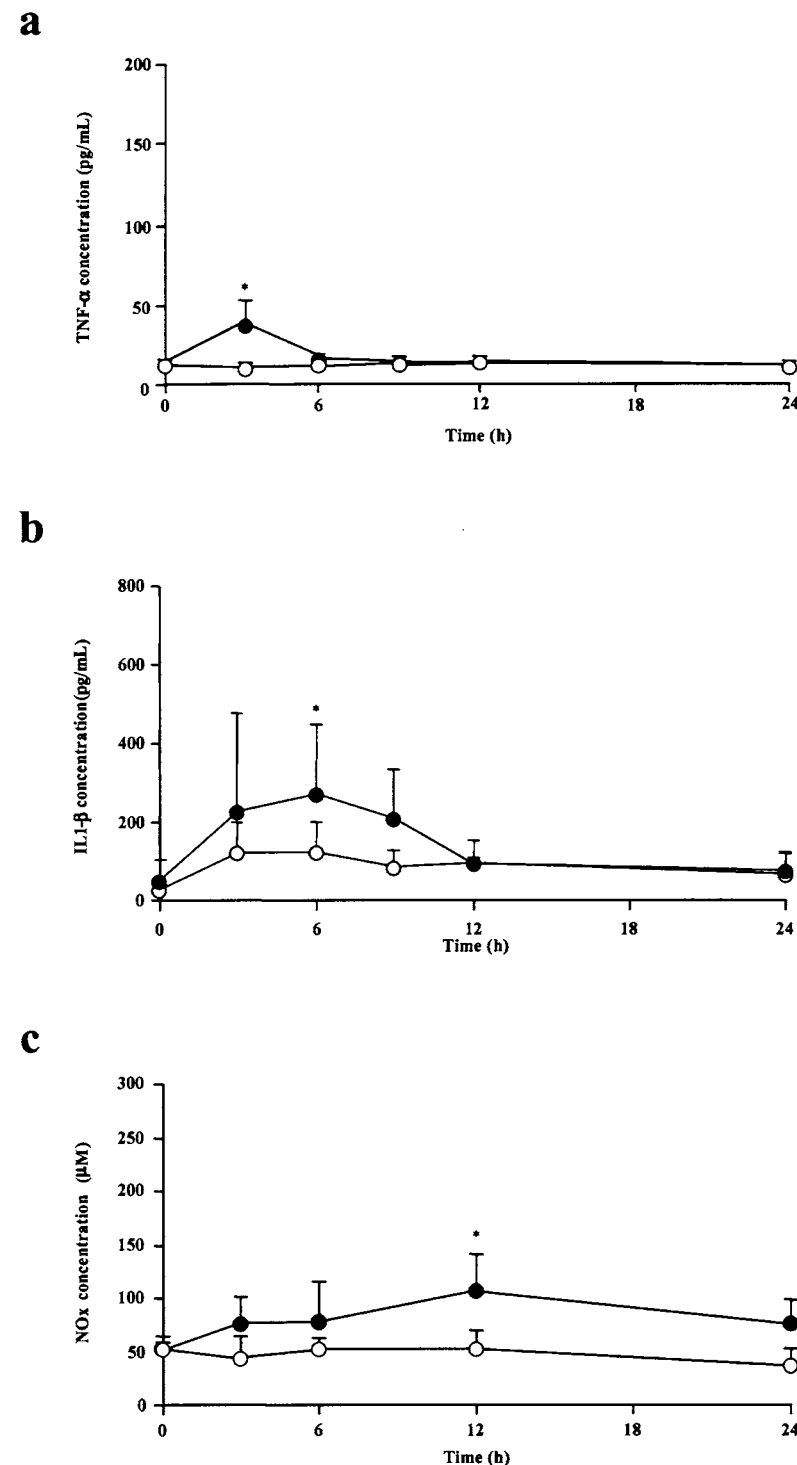


Figure 5 (a) Plasma TNF- α concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). Data are means $\pm$ SD (n = 6-10). (b) Plasma IL-1 β concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). Data are means $\pm$ SD (n = 4-6). (c) Plasma NOx concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). Data are means $\pm$ SD (n = 4-7). CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-1 β , interleukin-1 β ; NOx, nitrite/nitrate. * P < 0.05, compared with the control group (without CpG-DNA administration) at each time point.

減少し 24 時間後にはコントロール群との間に有意な差は認められなかったもののコントロール群よりも高い値を示した (Figure 5c).

4. 考察

4-1. 最初の選択的 hH₄R アゴニスト OUP-16

LPS (5 mg/kg) を投与したラットにおいて digoxin 体内動態について検討を行った. Digoxin 経口投与の結果から, LPS 投与 1, 2, 3 日後において AUC_{po} の有意な上昇が認められ, また, LPS 投与 1, 2, 3 日後では CL/F が有意に減少した (Table 1). しかし, LPS 投与 5 日後ではコントロール群に対して有意な差は認められなかったことから LPS 投与による digoxin 体内動態に対する影響は, LPS 投与 1, 2, 3 日後が大きいと考えられた. また, K_{el} が一定であったことから, AUC_{po} が上昇した原因は digoxin の吸収量が増大した可能性が示唆された (Table 1).

次に, CpG-DNA (5 mg/kg) を投与したラットにおいて digoxin 体内動態について検討を行った. CpG-DNA 投与 1, 2, 3 日後ではコントロール群と比較して, AUC_{po} が有意に増加し, また, CpG-DNA 投与 1, 2 日後では CL/F が有意に減少した (Table 2). CpG-DNA 投与 7 日後においては AUC_{po} および CL/F とも有意な差は認められなかった. K_{el} に関しては, コントロール群と比較して, CpG-DNA 投与群において有意な差は認められなかった. これらの結果から, CpG-DNA 投与 1, 2, 3 日後において digoxin の AUC_{po} および CL/F は変動し, その影響は CpG-DNA 投与 1, 2, 3 日後が特に大きいことが明らかとなった. CpG-DNA 投与群において, コントロール群と比較して Cmax は 10mg/kg 投与で有意な上昇が認められたが, 各投与量群間では有意な変動は認められなかった. AUC についてはコントロール群と比較して各投与量群で有意な増加が認められたが, 各投与量群間では有意な変動は認められなかった. したがって,

投与量と体内動態の変動に関連性が小さいことが示唆された.

LPS 投与ラットにおいて, 炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-1 β) および NOx の産生増加が認められた (Figure 4). サイトカインの発現機序としては LPS が TLR 4 により認識され NF- κ B の活性化が起こり, それにより炎症性サイトカインが産生されると考えられている⁴⁾. CpG-DNA (5 mg/kg) 投与ラットにおける血漿中 TNF- α , IL-1 β および NOx についても, 有意な産生増大が認められた (Figure 5). 血漿中の TNF- α , IL-1 β , および NOx 濃度はそれぞれ CpG-DNA 投与後 3, 6, 12 時間に一過性に上昇し, その後経時的に減少した. サイトカインの発現機序としては, エンドサイトーシスにより細胞内に侵入した CpG-DNA が後期エンドソーム/リソソームにて TLR 9 により認識され NF- κ B の活性化が起こり, それにより炎症性サイトカインが産生されると考えられている⁴⁾.

LPS および CpG-DNA 投与時, TNF- α と比較して IL-1 β および NOx の産生増大が遅れた理由としては, NF- κ B の活性化により TNF- α の産生が誘導され, それに引き続いて IL-1 β および NOx が CpG-DNA 単独または TNF- α を介して誘導されたものと考えられた.

ラットにおいて, digoxin は CYP3A2 で代謝および P-gp で排泄を受けることが報告されている^{7,8)}. また, 炎症時において, CYP3A2 および P-gp の発現量および活性が低下することが報告されている. その原因としては, 炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-1 β など) や NOx の関与が考えられている⁹⁻¹¹⁾. したがって, LPS および CpG-DNA (5 mg/kg) 投与による digoxin 体内動態変動は, 一過性の炎症状態が誘起されたことにより, 炎症性サイトカインや NOx の産生が増大したことによるものと考えられた.

LPS および CpG-DNA (5 mg/kg) 投与時の digoxin (0.1 mg/kg) 投与後の薬物体内動態パラメータを比較すると, 同様の変動を示した (Table

1, Table 2). 一方, LPS (5 mg/kg) 投与時と比較して, CpG-DNA (5 mg/kg) 投与時の TNF- α , IL-1 β および NOx の産生量は少ないことが明らかとなった. TNF- α , IL-1 β および NOx の産生量を炎症の程度の指標とした場合, CpG-DNA (5 mg/kg) 投与時のほうが LPS (5 mg/kg) 投与時と比べて, 炎症の程度は弱いと考えられた.

以上, 本研究から CpG-DNA の投与量と digoxin 体内動態変動には関連性がないことが明らかとなった. また, CpG-DNA (5 mg/kg) 投与時のほうが LPS (5 mg/kg) 投与時と比べて, 炎症の程度は弱いと考えられたが, digoxin (0.1 mg/kg) 投与後の薬物体内動態パラメータを比較すると, 同様の変動を示すことが明らかとなった. したがって, digoxin 体内動態は全身性の炎症の大きさの指標 (定量) ではなく, 炎症の有無 (定性) が薬物動態に影響を及ぼす可能性が示唆された.

5. 結語

CpG-DNA の投与量と digoxin 体内動態変動には関連性がないことが明らかとなった. また, CpG-DNA (5 mg/kg) 投与時のほうが LPS (5 mg/kg) 投与時と比べて, 炎症の程度は弱いと考えられたが, digoxin (0.1 mg/kg) 投与後の薬物体内動態パラメータを比較すると, 同様の変動を示すことが明らかとなった.

REFERENCES

- 1) 川原一芳, 医学のあゆみ, **175**, 389-392 (1995).
- 2) 山本俊輔, 片岡晶志, 樋口安典, 松浦恵子, 病理と臨床, **16**, 1100-1111 (1998).
- 3) 奥田昌彦, 古川清憲, 小玉正智, 中野昌康編集, 菜根出版, 221-226 (1999).
- 4) Akira S., Uematsu S., Takeuchi O., *Cell*, **124**, 783-801 (2006).
- 5) Kato R., Fujiwara A., Kawai T., Moriguchi J., Nakagawa M., Tsukura Y., Uchida K., Amano F., Hirotani Y., Ijiri Y., Tanaka K., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1221-1225 (2008).
- 6) Kato R., Tokunaga Y., Kawai T., Tsukura Y., Amano F., Hirotani Y., Ijiri Y., Tanaka K., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1226-1229 (2008).
- 7) Ideura T., Yoshimura A., Shirai M., Taira T., Koshikawa S., *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **27**, 433-439 (1993).
- 8) Harrison LI., Gibaldi M., *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1138-1142 (1977).
- 9) Kitaichi K., Li W., Takagi K., Iwase M., Shibata E., Nadai M., Hasegawa T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2697-2701 (1999).
- 10) Kitaichi K., Nakayama H., Ueyama J., Nadai M., Baba K., Takagi K., Takagi K., Ohta M., Hasegawa T., *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 1427-1435 (2004).
- 11) Takemura S., Minamiyama Y., Imaoka S., Funae Y., Hirohashi K., Inoue M., Kinoshita H., *J. Hepatol.*, **30**, 1035-1044 (1999).

大阪薬科大学紀要発行・投稿規定

大阪薬科大学紀要編集委員会

- 第 1 条 本紀要は「大阪薬科大学紀要」と称する。
- 第 2 条 本紀要は第 1 部，第 2 部の二部構成とする。第 1 部（旧「ばいでいあ」）は総合科学系の分野の論文等を収める。第 2 部は医療・薬学関連の分野の論文等を収める。
- 第 3 条 本紀要は前条に定める分野の研究発表を通じて，学的水準の維持向上を図る。
- 第 4 条 本紀要は，原則として毎年 1 回発行する。
- 第 5 条 本紀要の投稿資格は，本学教員（非常勤を含む）および本学関係者であることを原則とする。
- 第 6 条 投稿内容は，原則として，第 1 部は論文，書評，資料，および翻訳とする。
第 2 部は総説，論文，および資料などとする。
- 第 7 条 投稿される論文等は，独創的な知見あるいは大学教育に資する内容を含むものであって，印刷物として未発表であるものとする。
- 第 8 条 投稿希望者は，紀要編集委員会（以下，委員会という）が公示する期限までに所定の用紙に必要事項を記入し，委員会が定める締切日までに提出しなければならない。
- 第 9 条 原稿作成のための執筆要領は別に定める。
- 第 10 条 校正は原則として著者校正は第 1 校までとし，本文については執筆者が，表紙，奥付け，その他については委員会がその責任を負う。
- 第 11 条 抜き刷りは 1 論文等につき 50 部とする。それを超える部数の抜き刷りの費用は執筆者の実費負担とする。またカラー印刷など，特殊な場合に発生した費用も執筆者の実費負担とする。
- 第 12 条 本紀要は大学その他各種学術団体に寄贈し，学問研究の交流を期するものである。
- 第 13 条 本紀要の編集・発行の責任は，本学専任教員によって構成された委員会が負う。
- 第 14 条 委員会の編集委員は，総合科学系の分野より 3 名，医療・薬学関連の分野より 4 名を選び，必要に応じて若干名を加えることができるものとする。
- 第 15 条 委員会は論文等の査読委員として，編集委員のうちから 1 名，編集委員以外から 2 名を選ぶものとし，場合により学外に委嘱することがある。
- 第 16 条 投稿原稿の採否は委員会が決定する。修正を求められた原稿は速やかに再提出しなければならない。
- 第 17 条 この規定の変更等は，拡大教授会の承認を得るものとする。

附則

この規定は，平成 18 年 9 月 11 日から施行する。

「紀要編集委員会」委員（紀要編集委員）

井上 晴嗣， 大野 行弘， ◎加藤 義春， 楠瀬 健昭， ○田中 一彦，
土井 光暢， 濱中 久美子， 春沢 信哉， 藤田 芳一 （五十音順）

◎：委員長， ○：副委員長

編 集 後 記

「本紀要」Vol.3 が刊行の運びとなった。これ偏に，皆様方のご協力のたまものであり，厚く御礼申し上げます。

今号は，第 1 部（総合科学系）3 編・第 2 部（薬学系）8 編，計 11 編となった。各編，力作であり，おかげで充実した内容となっている。しかし，今号までの掲載論考の多くが，依頼や勧誘によるものである。「本紀要」を一層充実した「大学紀要」とするためには，積極的な投稿原稿をもっと増やさなければならない。そのためには，編集委員会の努力は必要であるが，なんといっても本学の先生方に「本紀要」を育てるという気持ちを持っていただき，奮って投稿していただきたい。

6 年制の学生も新学期より 4 年次生となり，また，4 + 2 年制も始まろうとしている。新学舎も完成間近である。「本紀要」の更なる発展のため，編集委員会は気持ちを新たに組み直す所存である。読者の方々のより一層のご協力を宜しくお願い申し上げます。

（田中一彦）

諺に「石の上にも三年」という。「本紀要」創刊の際には，継続刊行の基礎固めに三年は掛かる，いや，3 号でほぼ土台を固めきろうと考えていた。今号の編集作業を終えるに当たって，無事にここまで辿り着いたという安堵の気持ちと同時に，当初の目標には未だ「道半ば」の感がすることも否めない。

掲載論考の編数（総ページ数）も適度な量となり，その内容も総体として充実しつつあるかに思える。また，編集校正面でも，地道な試行錯誤を重ねつつ表記方法の改良を図るなど，本誌面は論文集として十分に誇れる構成になった、といえよう。

しかし，「大阪薬科大学紀要」ここにありと高々と旗を挙げるには，まだまだ心許無いと言わざるを得まい。田中一彦先生が指摘するとおり，本学の教員皆が「本紀要」を育てるという気持ちを持ち，競って投稿してもらうためには何が必要か，原点に戻り，腰を据え直して考えたい。

（加藤義春）

大阪薬科大学紀要 Vol.3 (2009)

2009 年 2 月 23 日発行

(非売品)

編 集 大阪薬科大学紀要編集委員会

編集責任者 加 藤 義 春

発 行 大 阪 薬 科 大 学

〒 569-1094 大阪府高槻市奈佐原 4 丁目 20 番 1 号

電話 072-690-1000 (代) URL: <http://www.oups.ac.jp/>

製作 スリーアイズ企画 (株)

印刷 (株) 田中プリント

表紙デザイン 小坂典子



大阪薬科大学
Osaka University of Pharmaceutical Sciences