

キアンコウ (*Lophius litulon*) におけるレクチン活性の探索

細野 雅祐, 村上 奈緒, 高松友里恵, 菅原 栄紀, 立田 岳生, 仁田 一雄

Lectin hunting in Goose fish, *Lophius litulon*

Masahiro HOSONO, Nao MURAKAMI, Yurie TAKAMATSU, Shigeki SUGAWARA,
Takeo TATSUTA, and Kazuo NITTA

(Received November 20, 2012)

Fish eggs or roe often contain rhamnose-binding lectins (RBLs) that have unique properties among animal lectins in the carbohydrate recognition and the domain structure. To investigate new lectin activity in deep-sea fishes, we attempted to extract proteins from eggs (GFE) and liver (GFL) of goose fish, *Lophius litulon*. The crude saline-extracted fraction (SEF) was obtained from acetone-dried powders of GFE and GFL. Each SEF was separated by DEAE-ion exchange chromatography. Contrary to our expectation, any DEAE fractions had no hemagglutination activity on rabbit erythrocytes. On the other hand, S-180 mouse ascites tumor cells were strongly agglutinated by GFL D100, D200 and SC fractions with the final concentrations required minimum agglutination, 65.0, 98.75 and 112.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Whereas any typical ligand molecules including carbohydrates and glycoconjugates showed no inhibitory effect for such tumor cell agglutination, several protease inhibitors including phenylmethanesulfonyl fluoride and EDTA could do that. Therefore, GFL fractions-induced tumor cell agglutination was caused by their proteolytic activity on the tumor cell surface components. The results from additional separation by hydroxyapatite column chromatography, SDS-PAGE and zymography indicated that putative candidates possessing proteolytic activity might be ca. 100 or 45 kDa proteins.

Key words — lectin; fish; proteolytic activity

緒 論

海洋生物由来成分のあるものは、動物に対して強い毒性をもつことを、人類は長い歴史のなかで経験的に知識として獲得してきたことは言うまでもない。反対に、抗腫瘍作用、抗菌作用あるいは血圧降下作用など、人類にとって有益な医薬品の原料となりうる化合物もまた、数多く見つかっている。したがって、生理活性物質を天然物に求める際、微生物から脊椎動物にいたる多彩で、しかも種によっては豊富な存在量を擁する海洋生物は、有力な資源であることは明らかである。多種多様な生物種のうち、医薬品のシーズとして用いられてきたのは海綿動物や海藻類が多く、化合物としてはテルペノイドやマクロライド、ペプチド誘導体あるいは多糖類などが知られている。^{1,2)} 特に、ホヤ由来の ecteinascidin 743 (trabectedin)³⁾ や海綿由来の halichondrin B (eribulin)⁴⁾ などは抗腫瘍薬として既に市販され、医療に応用されている。

海洋生物から得られる生理活性物質のひとつのカテゴリーとして、毒素およびレクチンを主とす

る生理活性タンパク質がある。^{1,5-7)} レクチンとは、糖と特異的に結合するタンパク質もしくは糖タンパク質の総称で、分子内に2個以上の糖結合部位をもつ場合、細胞凝集や複合糖質の沈降を惹起する。この反応は、通常簡単な糖あるいは糖鎖によって拮抗的に阻害される。⁵⁾ レクチンの生理活性は多岐にわたり、細胞間の認識、接着、情報伝達、分化・増殖からアポトーシスにいたるまで、あらゆる生命現象に関わっているといても過言ではない。

我々はこれまでに魚卵を材料として、主にL-ラムノースに高い親和性を有する rhamnose-binding lectin (RBL) の単離とその生物活性、特にがん細胞に対する作用について研究し、多くの知見を得てきた。⁸⁻¹⁰⁾ RBLは他の動物レクチンと比較し、構造、糖結合性あるいは生物活性においても異なる存在であるが、すべての魚卵中に普遍的に存在しているものではなく、コイ科の魚には少ないが、サケ科からは多く見つかっているなど、偏在性がみられる。¹¹⁾ 今回我々は、深海魚として名前はよく知られているが、生物活性物質の探索にはあま

り用いられたことのないキアンコウ (鮫鱈) に着目し, その卵巣あるいは肝臓中にレクチン活性が存在するか否か検討した. キアンコウ (*Lophius litulon*) は, キアンコウ目, キアンコウ科に属する魚の総称で, 肉食性であり, 北海道以南の太平洋, 黄海, 東シナ海北部に生息している. 深海生物は, 魚類に限らず, その過酷な棲息環境から, 海洋表層に暮らすものたちとは多くの点で異なるユニークな物質を産生している可能性が考えられている.

材料および実験方法

1. 材料

今回使用したキアンコウは, 福島県沖で捕獲されたものを用いた. ウシ血清アルブミン, トリプシン, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) および各種糖タンパク質は Sigma, カゼインは和光純薬, 単糖類および多糖類は Nacalai, PMSF を除くプロテアーゼ阻害剤はペプチド研究所の製品をそれぞれ使用した.

2. キアンコウ卵および肝抽出物の部分精製

キアンコウの卵巣および肝臓をアセトンで脱脂後風乾して得られたアセトン脱脂粉末を, 20 倍量の冷生理食塩水中でホモジナイズし, 遠心分離 (10,000 rpm, 20 min) 後, 上清を綿栓ろ過し, 濃縮した. 濃縮したものを H₂O に対して 48 h 透析し, 凍結乾燥したものを生理食塩水抽出画分 (Saline Extracted Fraction, SEF) とした.

SEF (1.5 g~2.0 g) を 10 mM リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.2) で平衡化した DEAE-Toyopearl カラム (Tosoh, 2.2×40 cm) に添加し, PB による段階的溶出 (10, 50, 100, 200 mM PB および 1 M NaCl) を行った. 各溶出画分を H₂O に対して 48 h 透析し, 凍結乾燥した. 以後, 卵由来画分を GFE (Goose Fish Egg), 肝由来を GFL (Goose Fish Liver), また溶出緩衝液の濃度に応じてそれぞれ D10, D50, D100, D200, SC 画分と略記する.

D100 (10 mg) を 1 mM PB (pH 6.8) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (生化学工業, 1.3×30 cm) で分画した. PB のモル濃度を 200 mM まで段階的に上昇させ, 得られた各画分を HA1~HA7 とした.

タンパク質の確認における SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は, Laemmli 法¹²⁾ により行い, Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色

した. またタンパク質含量測定は, 標準液としてウシ血清アルブミン溶液を用い, DC protein assay (BIO-RAD) kit (Lowry 法) により行った.

3. 細胞凝集反応および凝集阻害反応

赤血球凝集反応は Nitta らの方法¹³⁾ に準じ, 2% ウサギ赤血球およびヒト赤血球を用いて U 型マイクロタイタープレートにて行った. また, がん細胞凝集 (阻害) 反応は仁田らの方法¹⁴⁾ に準じ, マウス腹水がん細胞 S-180 (1×10⁶ 個/tube) を用いてガラス小試験管にて行った. また, 凝集阻害剤 (括弧内は終濃度) として以下の試薬を使用した. 単糖・二糖類 (125 mM): D-ガラクトース, D-マンノース, N-アセチル-D-グルコサミン, N-アセチル-D-ガラクトサミン, メリビオース, ラクトース, スクロース; (糖) タンパク質 (1 mg/mL): チログロブリン, オボアルブミン, フェツイン, アシアロフェツイン, ムチン, ヒストン; その他: ヘパリン (200 μg/mL); DNA (1 mg/mL); アルギニン (0.1 M); PMSF (0.1 mM).

4. プロテアーゼ活性の測定

プロテアーゼ活性は, カゼイン (6 mg/mL, 100 μL) を基質とし, 試料溶液を 50 μL 加え, 37°C で加温した後, 等量の 10% トリクロロ酢酸を加え遠心分離 (15000 rpm, 30 min) 後, 上清 (可溶性画分) の 280 nm における吸光度を GeneQuant (GE 社製) により測定した. また, ザイモグラフィーには分離用ゲルとしてゼラチン (1 mg/mL) を含むポリアクリルアミドゲル (10%) を用いた. 上述した SDS-PAGE 法に準じて電気泳動を行い, ゲルを H₂O でリンスした後, 再生緩衝液 [50 mM Tris HCl (pH 7.2)+0.1M NaCl] 中, 室温で 1.5 h 振とうして SDS を除去した. その後, 反応液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.2)+0.01 M CaCl₂] 中, 37°C で一晚反応させ, CBB R-250 で染色した. ゲルの脱色は 1 液 (エタノール: 酢酸: H₂O = 25: 8: 65) で 30 min 振とう後, 2 液 (エタノール: 酢酸: H₂O = 10: 15: 175) で適度な色になるまで行い, バンドを観察した.

結 果

1. DEAE クロマトグラフィーにより得られた各画分の細胞凝集活性

(1) 赤血球凝集活性

GFE (卵) および GFL (肝) から調製した SEF

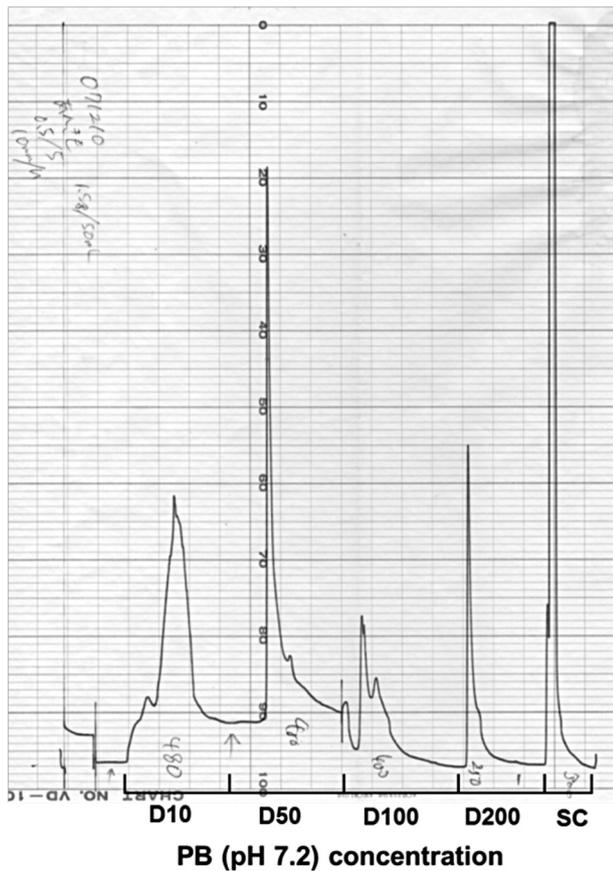


Fig. 1. DEAE-Toyoperal Column Chromatography of GFL SEF

DEAE- ion exchange chromatography was performed using DEAE-Toyoperal column (2.2×40 cm) by stepwise gradient of phosphate buffer (pH 7.2) (PB) concentration indicated as in the chromatogram. The absorbance of eluate was monitored at 280 nm.

を、それぞれ DEAE-Toyopearl カラムにより分画した。Fig. 1 は GFL クロマトグラムの典型例である。また、得られた各画分の重量ベースによる収量、タンパク質量およびウサギ赤血球凝集活性を Table 1 および Table 2 に示した。

結果として、GFE SC で弱いながら (0.962 ~ 0.481 mg protein/mL) ウサギ赤血球の凝集が認められたものの、その他の画分に凝集活性は観察されなかった。また、結果は示さないが、ヒト赤血球 (A, B, O 型) においてもすべての画分で凝集活性は認められなかった。

(2) S-180 細胞凝集反応および凝集阻害反応

GFE と GFL の DEAE カラム溶出画分について、S-180 細胞を用いた凝集反応を行った。すべての GFE 画分で活性は認められなかったが、GFL 画分では D100, D200, SC 画分で凝集が観察され、なかでも、比較的 D100 と D200 に強い凝集が認められた (Table 3)。

しかし、この凝集形態は一般的なレクチンによるものとは異なり、処理した細胞全体で大きな凝集塊を形成するものだった。一般的にレクチンのリガンドとして知られる種々の糖および複合糖質を用い、GFL D200 のがん細胞凝集阻害反応を行った。その結果、実験方法の項に記載した単糖、オリゴ糖、糖タンパク質、グリコサミノグリカンおよび DNA では阻害されず、プロテアーゼ阻害剤で

Table 1. Protein yields and hemagglutination activities of DEAE fractions from GFE

Fractions	Yield (mg) ^{a)}	(%)	Protein (%)	Hemagglutination (mg/mL) ^{b)}
D10	998.0	25.0	66.0	NA3.3
D50	321.1	8.0	65.5	NA3.3
D100	352.8	8.8	66.5	NA3.3
D200	596.4	14.9	37.5	1.88
SC	341.0	8.5	38.5	0.48

a) Lyophilized powder weight obtained from 4 g of GFE SEF.

b) Hemagglutination activity was estimated as the minimum concentration of sample required for the positive hemagglutination of a 2% rabbit erythrocytes suspension. NA3.3 means "emagglutination negative at 3.3 mg/mL."

Table 2. Protein yields and hemagglutination activities of DEAE fractions from GFL

Fractions	Yield (mg) ^{a)}	(%)	Protein (%)	Hemagglutination (mg/mL) ^{b)}
D10	829.7	11.8	21.0	NA1.1
D50	626.4	8.9	32.0	NA1.6
D100	445.5	6.4	52.0	NA2.6
D200	289.2	4.1	39.5	NA2.0
SC	367.7	5.3	22.5	NA1.1

a) Lyophilized powder weight obtained from 7 g of GFE SEF.

b) NA 1.1~2.6 mean "hemagglutination negative at each concentration" on 2% rabbit erythrocytes suspension.

ある PMSF (終濃度 0.1 mM) によって阻害された (結果は示さない). これらの結果から, D200 はプロテアーゼ活性を有している可能性があり, S-180 細胞の凝集は, 細胞膜表面のプロテオリシスに起因するアグリゲーションであると推測された.

Table 3. Tumor cell agglutination activity of DEAE fractions from GFL

Fractions	Agglutination ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^{a)}
D10	NA1,100
D50	NA1,100
D100	65
D200	98.75
SC	112.5

a) Tumor cell agglutination activity was estimated as the minimum concentration of sample required for the positive agglutination of mouse ascites S-180 cells (1×10^6). NA1,100 means "agglutination negative at 1,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$."

2. GFL 画分のプロテアーゼ活性

カゼインの分解を指標に, GFL 画分のプロテアーゼ活性を検討した. Fig. 2A に示すように, D100 の活性が最も高く, D200 および SC にも弱いプロテアーゼ活性が認められた. 一方, D10 および D50 には活性が認められなかった (結果は示さない). また, Fig. 2B に示すように, D100 のプロテアーゼ活性には濃度依存性が認められた.

各画分の SDS-PAGE パターンを Fig. 3 に示した. プロテアーゼ活性のない D10 および D50 のバンドと比較し, 目的の酵素タンパク質は, 分子量約 100 kDa である可能性が示唆された (Fig. 3, 点線囲み).

次に, プロテアーゼの性質 (あるいは分類) を探る目的で, 阻害剤の検討を行ったところ, Fig. 4 に示した種々のプロテアーゼ阻害剤には, 弱い阻害が認められた. 中でも EDTA に比較的強い阻害活

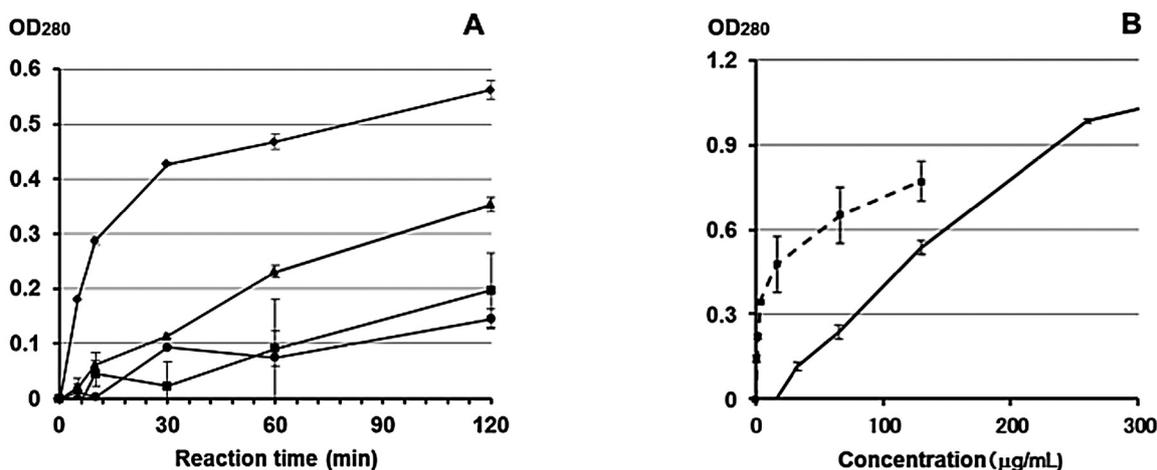
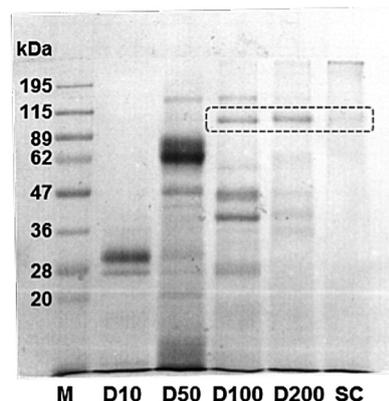


Fig. 2. Protease activity of DEAE fractions from GFL SEF

Protease activities of D100, D200 and SC fractions of GFL SEF were measured using casein as a substrate. The undigested protein was precipitated with equal volume of 10% trichloroacetic acid and then the digested soluble protein fragments in the supernatant were measured at 280 nm. (A) Time course measurement of D100 (\blacktriangle), D200 (\blacksquare), SC (\bullet) and trypsin (\blacklozenge). The final concentrations of three GFL fractions and trypsin were 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. (B) Dose dependency of D100 (solid line) and trypsin (dotted line) as a reference. Each data point represents the mean of three independent assays. The data are presented with the mean \pm standard error.

Fig. 3. SDS-PAGE of DEAE fractions from GFL SEF

Electrophoresis was performed using homologous 10% polyacrylamide gel with 2-mercaptoethanol. The bands of putative target enzyme molecule were boxed with dotted line. The prestained marker proteins (lane M) used were: myosin (195,000), β -galactosidase (115,000), bovine serum albumin (89,000), glutamate dehydrogenase (62,000), ovalbumin (47,000), carbonic anhydrase (36,000), myoglobin (28,000) and lysozyme (20,000).



性が認められたので、前述した S-180 細胞凝集反応の系に EDTA を阻害剤として添加したところ、終濃度 5 mM 以上で凝集阻害が認められた（結果は示さない）。以上の結果から、目的の酵素タンパク質は、活性に金属イオンを必要とするものであることが明らかとなった。

D100 画分を、ハイドロキシアパタイトを用いた

吸着クロマトグラフィーによりさらに分画した (Fig. 5A)。各画分の SDS-PAGE およびザイモグラフィーパターン (Fig. 5B および C) から、前述した 100 kDa タンパク質に酵素活性のバンドが認められた。また、HA5 のメジャーバンドである約 40 kDa タンパク質は、ザイモグラフィーではバンドが認められなかったが、一方、HA6 において 45

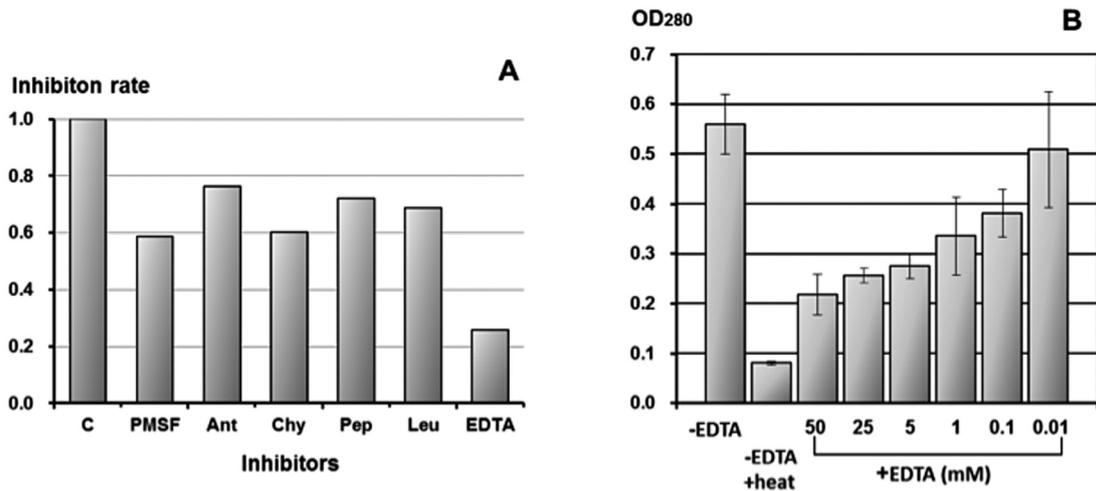


Fig. 4. Inhibition of proteolytic activity of GFL D100

Casein digestion reaction was performed using 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of D100 in the presence of PMSF (0.1 mM), antipain, chymostatin, pepstatin and leupeptin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and EDTA (20 mM). (A) The inhibition rates of inhibitors were represented by the absorbance of control (without inhibitor) as 1. (B) Dose-dependent inhibition by EDTA.

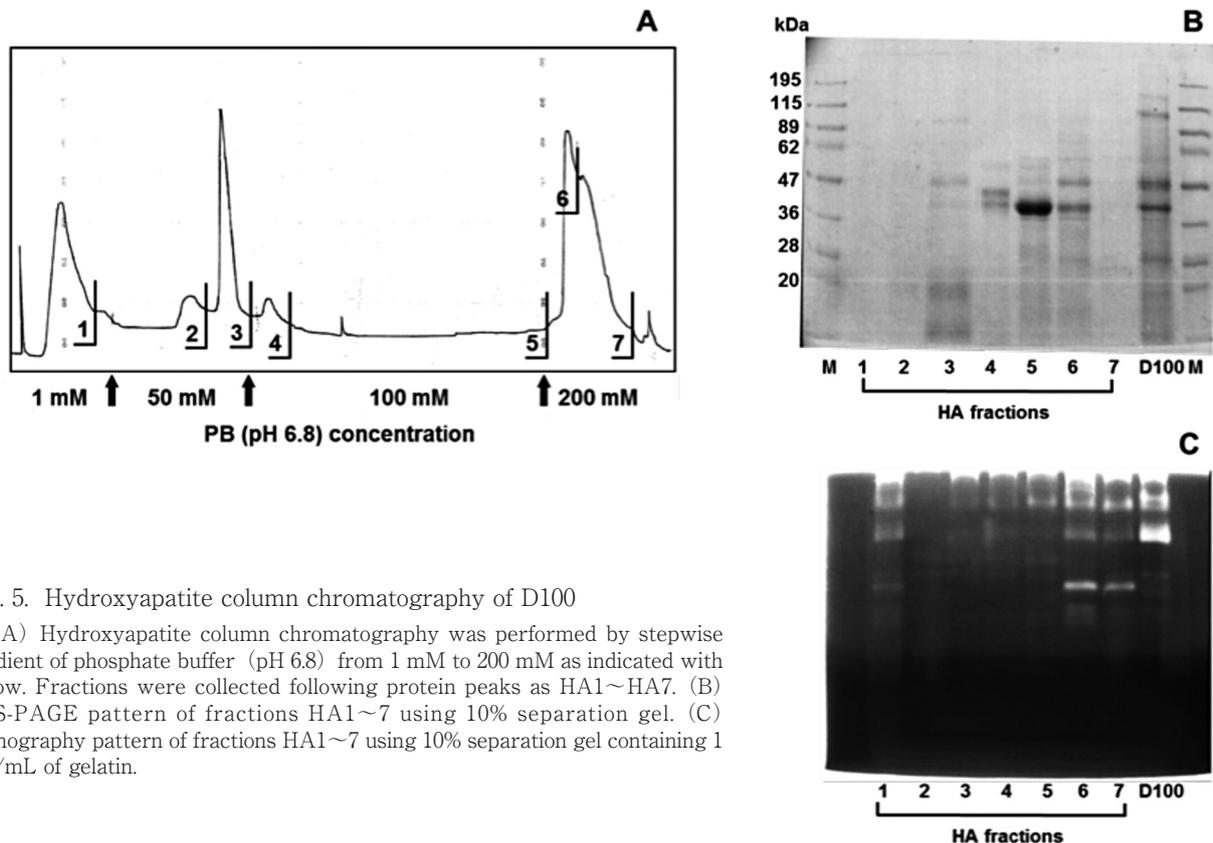


Fig. 5. Hydroxyapatite column chromatography of D100

(A) Hydroxyapatite column chromatography was performed by stepwise gradient of phosphate buffer (pH 6.8) from 1 mM to 200 mM as indicated with arrow. Fractions were collected following protein peaks as HA1~HA7. (B) SDS-PAGE pattern of fractions HA1~7 using 10% separation gel. (C) Zymography pattern of fractions HA1~7 using 10% separation gel containing 1 mg/mL of gelatin.

kDa 付近にバンドが認められた。これと同じバンドが CBB 染色では D100 画分にも見られるが、ザイモグラフィーでは D100 画分にそのバンドが認められないことから、D100 画分の 100 kDa タンパク質と HA6 の 45 kDa タンパク質の関係について、今後検討する必要がある。

考 察

海洋動物からは、多様なレクチンが報告されている。¹⁾ 分類としては C-タイプレクチンおよびガレクチン類が多くを占めるが、これは動物全般にもあてはまる傾向でもある。一方、海洋に限らないが、魚卵には前述した RBL というレクチンが豊富に存在する。¹¹⁾ RBL は、動物が産生するレクチンとしては大変めずらしく L-ラムノース（動物細胞成分としてはほとんど存在しない）に対して高い親和性を有し、よく保存されたコンセンサス配列（-ANYGR-および-DPC~KYL-）をもつドメインのタンデムリピート構造をもつ。⁸⁾ 卵中に存在する可溶性レクチンであるため、機能的なリガンドが L-ラムノースであるとは考えにくく、その生物学的存在意義は現在でもよくわかっていない。しかし近年、ナマズ卵より精製したレクチン（*Silurus asotus* lectin, SAL）⁹⁾ が、細胞表面上に存在するスフィンゴ糖脂質であるグロボトリアオシルセラミド（Gb3）や糖タンパク質中のガラクトシル- α 結合糖鎖を認識して結合すること、また Gb3 を発現しているヒトバーキットリンパ腫細胞株 Raji および Daudi 細胞に対して増殖抑制効果を示すことが明らかにされた^{15,16)} ことで、新たな展開が期待されている。

本研究では、キアコウの卵および肝臓中に RBL を含むレクチン活性を探索した。出発材料であるアセトン脱脂粉末は、1 回の操作で組織から脂質を除き、タンパク質を沈渣として回収できるため、簡便な方法ではあるが、一方でタンパク質の高次構造も破壊してしまうため、その後の操作中にうまくリフォールドできない生理活性タンパク質（特に酵素など）は失活してしまう危険性が高い。我々は、従来よりこの方法で魚卵から RBL を抽出・精製しており、レクチンを可溶性タンパク質として得る方法を確立している。レクチン活性は、ウサギ赤血球凝集活性を指標に検索したが、これは細胞表面にガラクトシル- α 結合糖脂質（GalnLc4:

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1Cer）を多くもつことが知られており、RBL の探索には最も適している。しかし、結果的にキアコウ卵（GFE）および肝（GFL）抽出物からは、いずれも RBL 活性を見いだすことはできなかった（Table 1 および 2）。唯一、弱い凝集活性が回収された GFE SC 画分にしても、次の精製ステップ（ゲルろ過クロマトグラフィー、結果は示さない）を経ることにより活性が認められなくなることから、非特異的な凝集であったと考えられる。

一方、マウス腹水がん S-180 細胞を用い、がん細胞凝集活性の有無を検討したところ、GFE 画分では凝集活性は認められなかったが、GFL 画分の D100, D200, および SC 画分で凝集が認められた（Table 3）。なかでも、D100 と D200 の活性が比較的強く、投入した細胞の大部分で凝集塊（クロット）をつくった。しかし、この凝集は一般的にレクチンで見られる細胞凝集反応（数個~数十個の細胞が接着し、凝集塊をつくる）とは異なっており、また、凝集阻害剤のスクリーニングを行ったところ、糖および複合糖質による阻害は認められず、セリンプロテアーゼインヒビターである PMSF の添加により阻害された。すなわち、GFL 画分による S-180 細胞の凝集は、プロテアーゼによる細胞膜タンパク質の消化の結果もたらされたものであると推測された。そこで、GFL 画分のプロテアーゼ活性について検討することとした。

Fig. 2 からわかるように、GFL D100 には時間および濃度依存的なプロテアーゼ活性が認められた。このプロテアーゼは、SDS-PAGE の結果から D100 および D200 に共通して見られる分子量約 100 kDa のバンドに相当する可能性が示唆された（Fig. 3）。一般的にプロテアーゼ（エンドペプチダーゼ）は、触媒機構により大きく (1) セリンプロテアーゼ、(2) アスパラギン酸プロテアーゼ、(3) システインプロテアーゼおよび (4) 金属プロテアーゼに分類される。また、それぞれに阻害剤が知られており、PMSF は (1)、ペプスタチンは (2)、アンチパインは (3)、ロイペプチンは (1) および (3)、キモスタチンは (1:特にキモトリプシン)、EDTA は (4) の阻害剤とされている。D100 のプロテアーゼ活性は、どの阻害剤によってもある程度阻害されたが、特に EDTA によって比較的強く阻害された（Fig. 4）。がん細胞凝集反応でも同様に EDTA は阻害的に作用したことから、D100 によるがん細胞

の凝集は、金属を介したプロテアーゼ活性によるものである可能性が示唆された。一方、EDTA 処理後、阻害された D100 のプロテアーゼ活性が 2 価金属イオンの添加によりレスキューされるか否かを確認する実験を行ったが、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} および Fe^{2+} によって顕著な活性の回復が認められなかった（結果は示さない）ことから、EDTA 阻害のメカニズムがどのようなものなのか、現時点では不明である。

GFL 画分から回収されたプロテアーゼ活性が低い（収量が少ない）ことから、今回の実験では酵素タンパク質の精製までには至らなかった。DEAE 後の精製手段としてヒドロキシアパタイトカラムを用いたところ、プロテアーゼ活性はここでも樹脂に強く吸着し、ある程度の精製が可能であることが分かった (Fig. 5A)。しかし、サイモグラフィーにより活性のあるバンドを検出したところ、D100 画分では当初目的とした約 100 kDa のバンドが濃く見られるものの、ヒドロキシアパタイト吸着性の HA6 および 7 には、このバンドの他に、約 45 kDa のバンドが顕著に認められた (Fig. 5B および C)。目的のプロテアーゼ活性がどちらのバンドに帰属するものかを明らかにするために、現在、試料の量的確保と精製方法の効率化について鋭意検討を行っている。

REFERENCES

- 1) 伏谷伸宏監修, “海洋生物成分の利用—マリンバイオのフロンティア”, シーエムシー出版, 東京, 2005.
- 2) 伏谷伸宏, 化学と生物, 35, 245–249 (1997).
- 3) Rinehart K. L., *Med. Res. Rev.*, **20**, 1–27 (2000).
- 4) Hirata Y., Uemura D., *Pure Appl. Chem.*, **58**, 701–710 (1986).
- 5) Sharon N., Lis H., “Lectins”, Second Edition, Kluwer Academic Publishers, London, 2003.
- 6) 村本光二, 館野浩章, 小川智久, 神谷久男, 化学と生物, 41, 379–388 (2003).
- 7) Ogawa T., Watanabe M., Naganuma T., Muramoto K., *J. Amino Acids*, vol.2011, ID 838914 (2011).
- 8) Nitta K., Kawano T., Sugawara S., Hosono M., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 553–561 (2007).
- 9) Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1–5 (1993).
- 10) Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Murayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochem Biophys. Acta*, **1472**, 668–675 (1999).
- 11) Krajhanzl A., *Adv. Lectin Res.*, **3**, 83–131 (1990).
- 12) Laemmli U. K., *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 13) Nitta K., Takayanagi G., Kawauchi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 315–320 (1983).
- 14) 仁田一雄, 古関知子, 高柳義一, 寺崎 豊, 梶 成二, 川内廣明, 東北薬科大学研究年報, **28**, 123–128 (1981).
- 15) Sugawara S., Masahiro H., Ogawa Y., Sasaki S., Nitta K., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **51**, 125–132 (2004).
- 16) Sugawara S., Sasaki S., Ogawa Y., Masahiro H., Nitta K., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 327–334 (2005).