

黄芩関連フラボノイドの中樞作用とその情報伝達機構

東田 道久,^{a)} 東田 千尋,^{a)} 真鍋いづみ,^{a)} 丹代 優香,^{a)} 清水 岑夫,^{b)}
宮一諭起範,^{c)} 富森 毅,^{c)} 野村 靖幸^{*a,d)}^{a)}北海道大学薬学部薬効学教室 ^{b)}富山医科薬科大学薬学部生薬学教室^{c)}北陸大学薬学部生薬学教室 ^{d)}富山医科薬科大学和漢薬研究所高次神経機能制御部門

Central effects of flavonoids and the signal transducing mechanisms

Michihisa TOHDA,^{a)} Chihiro TOHDA,^{a)} Izumi MANABE,^{a)} Yu-uka TANDAI,^{a)}
Mineo SHIMIZU,^{b)} Yukinori MIYAICHI,^{c)} Tsuyoshi TOMIMORI^{c)} and Yasuyuki NOMURA^{*a,d)}^{a)}Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University^{b)}Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama
Medical and Pharmaceutical University^{c)}Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Hokuriku University^{d)}Department of Neuroscience, Research Institute for Wakan-yaku,
Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received June 10, 1993. Accepted October 8, 1993.)

Abstract

Effects of flavonoids extracted from *Scutellariae Radix* and related galenicals on adenylate cyclase (AC) activity in NG108-15 cells and on behavior in mice were examined. Ten compounds of 27 tested flavonoids inhibited forskolin-stimulated activity of AC. Seven of those were OMe- or OH-substitution products at positions of 5, 6 and 7. Double bond between 2 and 3 was essential to the activity. The most effective compound was eupafolin. Pretreatment with pertussis toxin or yohimbine suppressed inhibitory effects of eupafolin, although atropine and naloxone did not affect. Intraperitoneal administration of eupafolin as well as clonidine caused sedation, reduction of locomotor activity and prolongation of loss of righting reflex in mice. The eupafolin caused decrease in locomotor activity was inhibited by yohimbine. These results suggest that 1) some flavonoids have inhibitory effects of AC activity and 2) eupafolin, the most effective flavonoids, inhibits AC via α_2 -adrenoceptor.

Key words flavonoids, adenylate cyclase, central effects, sedation, α_2 -adrenoceptor.**Abbreviation** AC, adenylate cyclase.

緒 言

神経伝達物質の受容体・情報伝達機構の研究の発展はめざましく、最近では、遺伝子発現、発生分化、さらには老化をも含めて、広い観点からそれらの研究が進められている。中でも、アデニル酸シクラーゼ (AC) とリン脂質代謝に関する研究は枚挙にいとまがないが、これは選択的な毒素や抑制薬、活性化薬といった研究のためのよきツールが存在している

ことに起因しているといえよう。それらの中には天然物にその起源のあるものも多く、例えば AC 活性化薬の forskolin¹⁾ は、インドの民間生薬 *Coleus Forskohli* より抽出されたもので²⁾、また、プロテインキナーゼ C 活性化薬であるホルボールエステル類³⁾ は、峻下剤として用いられてきたハズの種子より精製されたもの⁴⁾ である。

今回、各種生薬抽出液の中樞神経系情報伝達機構に及ぼす効果を、ニューロンのモデルとしての NG108-15 細胞を用いて検討し、その結果、黄芩を

*〒060 札幌市北区北12条西6丁目
Kita-ku, Sapporo 060, Japan

じめ数種の生薬抽出液が AC 活性調節系に作用することを見いだした。さらに、黄芩の主成分である各種のフラボノイドの AC 活性におよぼす効果についても検討し、その構造活性相関ならびに作用機序の解明を *in vivo*, *in vitro* 両面から試みたので以下に詳述する。

材料と方法

(1) 生薬エキス：以下の生薬の熱水抽出画分を用いた。黄耆 (*Astragali Radix*), 黄芩 (*Scutellariae Radix*), 甘草 (*Glycyrrhizae Radix*), 桔梗 (*Platycodi Radix*), 菊花 (*Chrysanthemi Flos*), 枸杞子 (*Lycii Fructus*), 桂皮 (*Cinnamomi Cortex*), 決明子 (*Cassiae Torae Semen*), 柴胡 (*Bupleuri Radix*), 山茱萸 (*Corni Fructus*), 山薬 (*Dioscoreae Rhizoma*), 蒺藜子 (*Tribuli Fructus*), 芍薬 (*Paeoniae Radix*), 生姜 (*Zingiberis Rhizoma*), 女貞子 (*Ligustri Fructus*), 白南天 (*Nandinae Fructus*), 川芎 (*Ligustici Rhizoma*), 桑白皮 (*Mori Radicis Cortex*), 大棗 (*Zizyphi Fructus*), 沢瀉 (*Alismatis Rhizoma*), 地黄 (*Rehmanniae Radix*), 竹節人參 (*Panacis Japonici Rhizoma*), 知母 (*Anemarrhenae Rhizoma*), 陳皮 (*Citri Leiocarpae Exocarpium*), 当帰 (*Angelicae Radix*), 菟糸子 (*Cuscutae Semen*), 南蜜毛 (*Maydis Stigmata*), 人參 (*Ginseng Radix*), 白朮 (*Atractylodis Rhizoma*), 茯苓 (*Poria*), 牡丹皮 (*Moutan Radicis Cortex*), 蜜蒙花 (*Buddleiae Flos*)。

(2) 各種フラボノイドの抽出, 単離, 精製：市販の黄芩ならびに関連生薬をメタノールで逆流抽出したエキスを, 溶媒分離, 各種カラムクロマトグラフィーにより精製単離し, 各スペクトルから化合物を同定した。

(3) 細胞培養：NG108-15 細胞は, 5 % 牛胎児血清, 100 μ M hypoxanthine, 16 μ M thymidine, 1 μ M aminopterin を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium 中で 10 % CO₂ 存在下 4~6 日間培養した。

(4) 細胞ホモジネイトを用いたアデニル酸シクラーゼ活性測定：飽和状態となった NG108-15 細胞を phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ 12H₂O, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) により dish よりはずし洗浄後, 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂ を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁し, ガラストフロンホモジナイザーによりホモジナイズすることにより, 細胞ホモジネイトを調製した。反応液 (組成: 0.4 mM cAMP, 0.4

mM ATP, 0.5 μ Ci [³H] ATP, 1 mM IBMX, 15 mM creatine phosphate, 25 U creatine phosphokinase, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 μ M GTP, 2 mM DTT) 中に NG108-15 細胞ホモジネイトと試験生薬エキスを加え, 37°C で 10 分間インキュベートし, 反応させた。過剰量の cAMP の添加ならびに 100°C で 3 分間煮沸することにより反応を停止した後, 生成された [³H] cAMP を陽イオン交換樹脂 Dowex 50w-X4 およびアルミナカラムで分離しその放射活性を測定した。

(5) 無傷細胞中の cAMP 含量測定：35 mm dish 上に単層培養した NG108-15 に AC 活性化薬 10 μ M forskolin ならびにフラボノイドあるいはモルヒネ等の各種薬物を添加, 10 分間反応させた後, HCl により反応を停止, 上清中の cAMP 量をラジオイムノアッセイキット (ヤマサ) を用いて定量した。百日咳毒素処置は, 反応開始 4 時間前に培地中に毒素を添加することにより行った。

(6) マウス自発運動量の測定：ddY 系雄性マウス (体重 23-26 g) 4 匹一群に, 0.5 % カルボキシメチルセルロース懸濁した薬物を腹腔内投与し, 10 分後から 50 分後までの自発運動量を 10 分間隔に運動量測定装置 (Medical Agent 社, Actomonitor II) を用いてカウントし, 投与 24 時間前ならびに後の結果と比較した。

(7) 睡眠時間の測定：ddY 系雄性マウス (体重 26-30 g) に, 0.5 % カルボキシメチルセルロースで懸濁した薬物を腹腔内投与し, 5 分後に 90 mg/kg チオペンタールを皮下に投与, 正向反射消失時間を測定し, 睡眠時間とした。

(8) 有意差検定：有意差検定は, Student's *t*-test により行った。

結 果

1. NG108-15 細胞ホモジネイト AC 活性に及ぼす生薬エキスの影響

32 種生薬エキスの NG108-15 細胞膜ホモジネイトに及ぼす影響を検討したところ, 10 μ M forskolin により活性化された本細胞 AC に対し 1 mg/ml 人參はその活性をさらに増強する傾向を示し, 1 mg/ml 黄芩, 桂皮, 竹節人參, 知母, 蜜蒙花は抑制することが見いだされた (Fig. 1)。その他の生薬エキスは無効であった。

2. 各種フラボノイドの無傷 NG108-15 細胞 AC 活性に及ぼす影響

Forskolin 誘発 AC 活性抑制作用を有する生薬エ

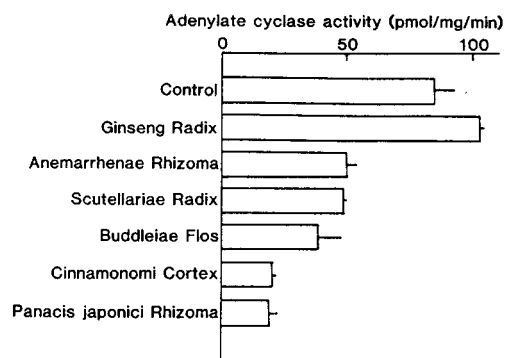


Fig. 1 Effects of oriental herbs' extract on adenylate cyclase activity in NG108-15 cells. Cell homogenates were incubated with [3 H]ATP and herb extract in reaction medium at 37°C for 10 min. [3 H] cAMP was separated by cation exchanged chromatography column and alumina column. The results show data about only effective extracts among the 33 oriental herbs examined.

キス中、黄芩より分画、精製したフラボノイドならびに構造類似のフラボノイドの AC 抑制作用について、無傷 NG108-15 細胞を用いて検討した。被験 26 種のフラボノイドのうち 10 種が AC 活性を抑制した。5, 6, 7 位に置換基を有するものに AC 抑制活性がある場合が多く、100 μ M においては、eupafolin が最もその活性が強かった (Table I)。Eupafolin の B 環の OH 基がない oroxylin A も強い AC 抑制活性を示した。Oroxylin A の 2, 3 位間二重結合が還元された dihydrooroxylin A には AC 抑制活性は認められなかった。また、5, 6, 7 位のいずれかにグルコースまたはグルクロン酸を有するものは一例を除いて活性が認められなかった。5, 6, 8 位に置換基を有するものには AC 抑制活性を示すものは少なく、いずれかの位置に OMe を含むものは一例を除いて全てその活性がなかった (Table I)。

3. Eupafolin の AC 活性抑制の作用機序の検討

Eupafolin を用いてフラボノイドの作用機序を検討した。Eupafolin は 10 μ M forskolin により活性化される AC を濃度依存的に抑制し、その EC₅₀ 値は約 1 μ M であった。さらに抑制性 GTP 結合蛋白質を失活させる百日咳毒素 (IAP) 100 ng/ml を 4 時間処置した細胞では EC₅₀ 値は約 10 μ M に上昇した (Fig. 2)。NG108-15 細胞中には AC を抑制する受容体として、オピオイド⁵⁾、ムスカリン性アセチルコリン⁶⁾、および α_2 アドレナリン受容体⁷⁾ の存在が示されている。これら各々の受容体作働薬である mor-

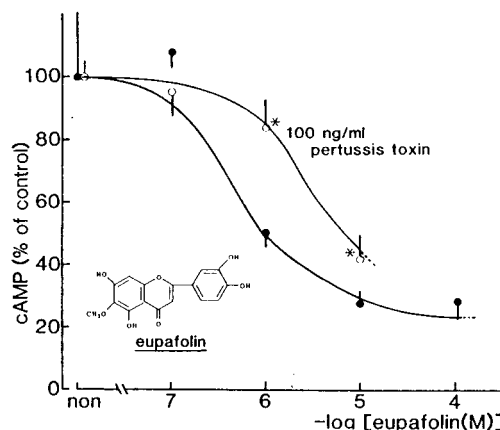


Fig. 2 Effects of eupafolin and pertussis toxin treatment on the cAMP content in NG108-15 cells. Cells were treated with pertussis toxin for 4 h. The treated or non-treated cells were incubated with eupafolin and 10 μ M forskolin at 37°C for 10 min. The cAMP content was determined by radioimmunoassay. Each value shows the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments.

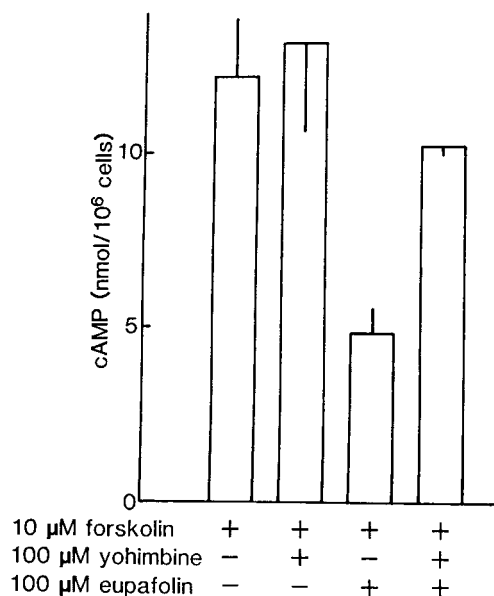
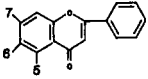
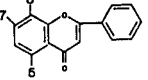
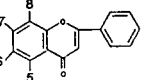


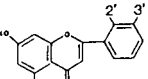
Fig. 3 Effects of yohimbine on eupafolin-induced decrease in the cAMP content in NG108-15 cells. Cells pretreated with yohimbine for 5 min were incubated with eupafolin and 10 μ M forskolin at 37°C for 10 min. The cAMP content was determined by radioimmunoassay. Each value shows the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments.

Table I Effects of flavonoids on the cAMP content in intact NG108-15 cells.

	5	6	7	B ring	activity (% of control)
eupafolin	OH	OMe	OH	OH(3',4')	39.5 ± 6.1
cirsimaritin	OH	OMe	OMe	OH(4')	41.9 ± 3.5
oroxylin A	OH	OMe	OH		48.4 ± 9.6
baicalein	OH	OH	OH		52.8 ± 4.8
baicalein 7-oglu	OH	OH	Glu		56.9 ± 9.0
hispidulin	OH	OMe	OH	OH(4')	59.0 ± 5.8
circilineol	OH	OMe	OMe	OMe(3'), OH(4')	67.9 ± 2.6
oroxylin A 7-GlcA	OH	OMe	GlcA		88.5 ± 11.3
swertiajaponin	OH	Glu	OMe	OH(3',4')	90.1 ± 3.0
homoorientin	OH	Glu	OH	OH(3',4')	90.6 ± 3.0
baicalin	OH	OH	GlcA		95.7 ± 7.3
dihydrooroxylin A					134.8 ± 8.2

	5	7	8	B ring	activity (% of control)
5,7,2'-OH 8,6'-OMe flavone	OH	OH	OMe	OH(2'), OMe(5')	46.2 ± 3.0
norwogonin	OH	OH	OH		57.6 ± 3.6
scutevulin	OH	OH	OMe	OH(2')	99.3 ± 12.2
wogonin	OH	OH	OMe		114.0 ± 5.6
wogonin 7-GlcA	OH	GlcA	OMe		114.2 ± 2.2
5,7,4'-OH 8-OMe flavone	OH	OH	OMe	OH(4')	115.8 ± 3.2
5-OH 7,8-OMe flavone	OH	OMe	OMe		124.5 ± 5.0

	5	6	7	8	B ring	activity (% of control)
5,8-OH, 6,7-OMe flavone	OH	OMe	OMe	OH		85.8 ± 9.5
skullcapflavone II	OMe	OMe	OMe	OH	OH(2') OMe(6')	*97.1
chrysin 7-GlcA	H	GlcA	H	OH		127.0 ± 8.7
3,5,7,2',6'-OH flavone	H	OH	H	OH	OH(2',6')	127.3 ± 8.6

	2'	3'	activity (% of control)
chrysin	H	H	61.9 ± 13.2
5,7,2'-OH flavone	OH	H	86.0 ± 15.7
5,7,2',3'-OH flavone	OH	OH	115.8 ± 3.4

Cells were incubated with each of the flavonoids and 10 μ M forskolin at 37°C for 10 min. The cAMP content was determined by radioimmunoassay. Each value shows the mean $\pm$ S.E. of 4 or 5 experiments (Δ : 2 experiments)

phine, carbachol, norepinephrine はいずれも本細胞の AC 活性を濃度依存的に抑制した (データ非提示)。Eupafolin による AC の抑制が、これらの受容体を介するか否かを検討するために、これらの受容体の拮抗薬の eupafolin 誘発 AC 活性抑制に及ぼす効果を検討した。Eupafolin (100 μ M) による AC 抑制は、 α_2 拮抗薬である 100 μ M yohimbine 前処置により抑制されたが (Fig. 3), 10 μ M atropine, 10 μ M naloxone は無効であった (データ非提示)。

4. Eupafolin のマウス自発運動量に及ぼす影響

Eupafolin 100 mg/kg および 500 mg/kg をマウスに腹腔内投与したところ、自発運動の低下が認め

られた。また、群行動の欠如や眼球突出も観察されたが、外来性刺激に対する応答性の変化ならびに催眠作用は認められなかった。これらの結果は代表的な α_2 受容体作動薬である clonidine とほぼ同様であった。この様に、clonidine 様の鎮静作用が認められたことにより、自発運動に及ぼす eupafolin の効果を定量的に検討した。Eupafolin は濃度に依存して、著しく自発運動量を抑制することが認められた (Fig. 4)。この eupafolin による自発運動抑制作用を clonidine によるものと比較検討した。0.1 mg/kg clonidin 腹腔内投与は自発運動を著しく減弱させたが、その作用は 2 mg/kg yohimbine を clonidine 投

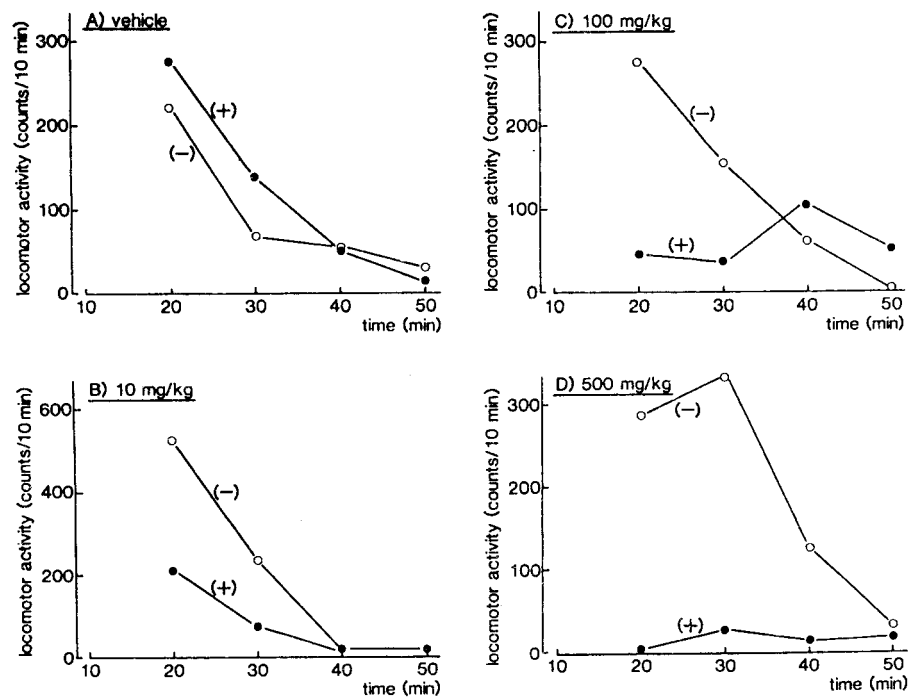


Fig. 4 Effects of eupafolin on spontaneous locomotor activity in mice. Locomotor activity was measured every 10 min after the administration of eupafolin (*i.p.*). Each value shows the data in the same group of 4 mice. ○ : locomotor activity 24 h before eupafolin administration, ● : after eupafolin administration.

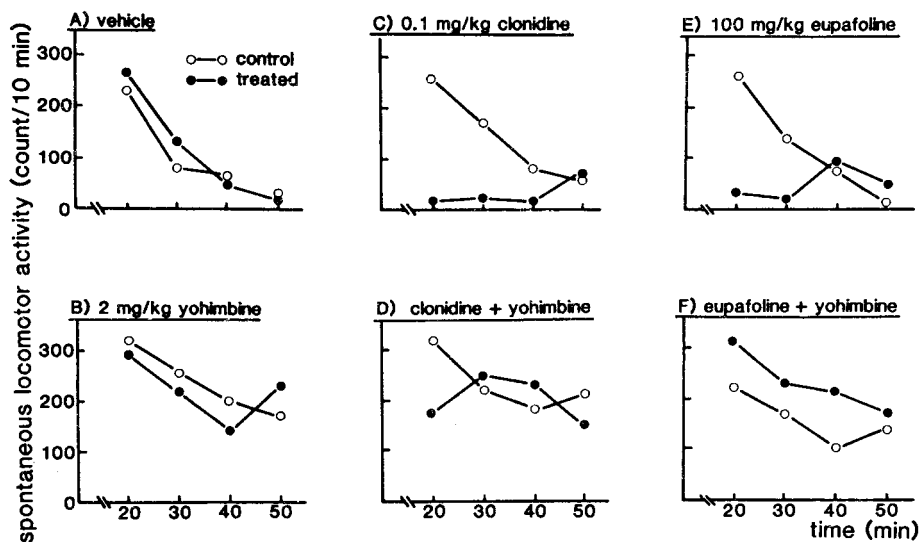


Fig. 5 Effects of yohimbine on clonidine- and eupafolin-induced inhibition of spontaneous locomotor activity in mice. Locomotor activity was measured every 10 min after the administration of eupafolin (*i.p.*). Yohimbine was administered (*s.c.*) 5 min before eupafolin administration. Each value shows the data in the same group of 4 mice. ○ : locomotor activity 24 h before eupafolin administration, ● : after eupafolin administration.

与5分前に皮下投与することによりほぼ完全に抑制された。一方, 100 mg/kg eupafolin による運動抑制効果も yohimbine 前処置により減弱した (Fig. 5)。

5. Eupafolin のバルビツール酸誘発睡眠に及ぼす影響

Eupafolin のバルビツール酸誘発睡眠に及ぼす影響を, clonidine によるものと比較検討した。超短期型睡眠誘発薬であるチオペンタール 90 mg/kg の皮下投与は, 86 ± 6 分間 ($n=4$) の正向反射消失をもたらしたが, 1.0 mg/kg clonidine の腹腔内投与はこれを 138 ± 7 分間 ($n=4$) に有意に延長させた (Fig. 6)。一方, eupafolin は 100 および 500 mg/kg 腹腔内投与により, 正向反射消失時間の有意な延長をもたらした, それぞれ 110 ± 15 分間 ($n=7$) および 170 ± 27 分間 ($n=7$) の睡眠時間を示した (Fig. 6)。

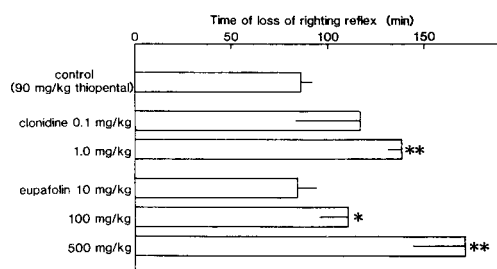


Fig. 6 Effects of eupafolin and clonidine on thiopental-induced loss of righting reflex in mice. Clonidine and eupafolin were administered (*i.p.*) 5 min before 90 mg/kg thiopental administration (*s.c.*). Each value shows the mean $\pm$ S.E. of 4 (control, clonidine) or 7 (eupafolin) experiments.

考 察

各種生薬の熱水抽出エキスの AC 活性に及ぼす影響を検討したところ, 被験 32 種中, 桂皮, 竹節人參, 黄芩, 知母, 蜜蒙花が forskolin 誘発 AC 活性を有意に抑制した。そのうち, 竹節人參はサポニンを多く含んでいるため, その可溶化剤的效果により非特異的にその作用が現れている可能性は否定できない。実際, ラット脳シナプス膜を用いた AC 活性測定では竹節人參は forskolin 誘発 AC 活性をむしろ増強した (データ非提示)。

Forskolin 誘発 AC 活性を抑制した生薬のうちで, 抑制作用が強く, 相対的に広く用いられている黄芩について, その活性成分の検索を試みた。黄芩

の主成分はフラボノイドであり, 現在まで 100 種近くが単離精製されている。その薬理作用に関しては, 胆汁分泌促進, 利尿, 抗炎症等が報告されているが, 分子薬理学的観点からは, アラキドン酸代謝⁸⁾, チロシン脱水素酵素⁹⁾, およびホスホジエステラーゼ¹⁰⁾への作用が研究されている。しかしながら AC 活性制御系への影響に関する報告はない。黄芩より抽出精製されたフラボノイドならびに構造類似のフラボノイド 27 種のうち 10 種が forskolin 誘発 AC 活性抑制を示した。そのなかには, 5, 6, 7 位が OH または OMe で置換されているものが 6 種存在しており, この構造を有するものは全て例外なく AC 活性を抑制した。しかしながら, 同じ 5, 6, 7 置換体でもこの何れかの位置にグルコースまたはグルクロン酸を有するものは 1 例を除いて活性がなく, この 5, 6, 7 位が活性と関与していることが示唆された。Eupafolin, oroxylin A ならびに dihydrooroxylin A の構造活性相関により, 2-3 位間の二重結合が活性に強く関与することおよび, B 環の置換基は活性に直接は関与しないことが示唆された。しかし, chrysin 類ならびに eupafolin, oroxylin A, hispidulin 間の例に見られるように, B 環の OH 基が活性の強さを修飾していることも考えられる。

AC 抑制活性の最も強かった eupafolin を用い, その作用機序について検討を行った。Eupafolin の AC 抑制作用は IAP により脱抑制されたことにより, その作用部位は受容体, または, G 蛋白質上に存在していることが推定された。NG108-15 には, オピオイド⁵⁾, ムスカリン性アセチルコリン⁶⁾, および α_2 アドレナリン受容体⁷⁾ の 3 種の抑制性受容体の存在していることが示されている。これらの受容体作動薬, すなわち noradrenaline, carbachol, morphine はいずれも濃度依存的に forskolin 誘発 AC 活性を抑制し, それぞれ選択的 antagonist である yohimbine, atropine, naloxone によって脱抑制された。Eupafolin の AC 抑制作用は yohimbine によってのみ抑制されたことにより, eupafolin は α_2 受容体の作動薬として作用することが示唆された。

α_2 受容体は中枢抑制作用, とくに鎮静作用を有することが知られている。そこで, eupafolin の中枢抑制作用の有無を行動薬理学的に検討した。Eupafolin をマウスの腹腔内に投与したところ, clonidine と類似の鎮静作用が認められた。また, 自発運動量は, eupafolin の濃度に依存して減弱し, この作用は α_2 拮抗薬である yohimbine の前処置により解除された。さらに, eupafolin は clonidine と同様, バルビツール酸により誘発させる睡眠を増強す

ることが認められた。以上の事より, eupafolin は clonidine と同様の中枢抑制・鎮静作用を有していることが明らかとなった。

今回得られた知見より, フラボノイドの一種 eupafolin は, *in vivo*, *in vitro* の両系において, α_2 受容体作動薬として作用することが示唆された。しかしながら, α_2 受容体活性化以外の機構により, AC を抑制する可能性も残されている。黄芩は古くから, 熱病, 黄疸, 腹痛, 下痢などの要薬とされているが, 例えば胃潰瘍は H_2 受容体の活性化による cAMP の上昇が関与することや¹¹⁾や, 下痢にも cAMP の上昇が関与していること¹²⁾がよく知られており, 今回得られたフラボノイドの AC 抑制作用とこれらとの関係にも興味を持たれる。今後, 各種フラボノイドについてもその作用機序の詳細な解明を行う予定である。

文 献

- 1) Seamon, K.B., Padgett, W. and Daly, J.W.: Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **78**, 3363-3367, 1981.
- 2) Bhat, S.V., Bajwa, B.S., Dornauer, H. and de Souza, N. J.: Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *coleus forskohlii* briq. *Tetrahedron Lett.* **19**, 1669-1672, 1977.
- 3) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**, 7847-7851, 1982.
- 4) Hecker, E., Kubinyi, H., Bresch, H. and von Szczepanski, C.: The chemical structure of a cocarcinogen and of phorbol isolated from croton oil. *J. Med. Chem.* **9**, 246-247, 1967.
- 5) Law, P.Y., Hom, D.S. and Loh, H.H.: Effect of chronic D-Ala², D-Leu⁵-enkephalin or pertussis toxin treatment on the high-affinity state of delta opioid receptor in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells. *J. Pharm. Exp. Ther.* **256**, 710-716, 1991.
- 6) Ashkenazi, A., Peralta, E.G., Winslow, J.W., Ramachandran, J. and Capon, D.J.: Functional role of muscarinic acetylcholine receptor subtype diversity. *Cold Spring Harbor Symp. Q. Biol.* **53**, 263-272, 1988.
- 7) Bylund, D.B. and Ray-Prenger, C.: Alpha-2A and Alpha-2B adrenergic receptor subtypes: attenuation of cyclic AMP production in cell lines containing only one receptor subtype. *J. Pharm. Exp. Ther.* **251**, 640-644, 1989.
- 8) Matsuda, H., Tani, T., Arichi, S., Kimura, Y. and Okuda, H.: Studies on *Scutellariae Radix*. XII. Anti-thrombic actions of various flavonoids from *scutellariae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 2411-2415, 1985.
- 9) Morita, K., Teraoka, K., Hamano, S., Oka, M. and Azuma, M.: Effects of bioflavonoids on catecholamine biosynthetic activity in the adrenal gland: in vitro studies using partially purified tyrosine hydroxylase and chromaffin cell cultures. *Neurochem. Int.* **17**, 21-26, 1990.
- 10) Picq, M., Dubois, M., Prigent, A.F., Nemoz, G. and Pacheco, H.: Inhibition of the different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms separated from rat brain by flavonoid compounds. *Biochem. Int.* **18**, 47-57, 1989.
- 11) 佐伯清美: ヒスタミン受容体. 蛋白質核酸酵素 **26**, 1628-1636, 1981.
- 12) Harris, R.C.: Review of selected bacterial enterotoxins and their role in gastroenteritis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **18**, 102-108, 1988.